



研究报告

基于盲肠菌群和回肠粘膜基因表达探讨解淀粉芽孢杆菌提高蛋鸡生产性能的潜在机制

张红娜^{Δ1} 周玉法^{Δ2} 崔娜¹ 庞全海^{*2} 常维山^{*3}

1 河北经贸大学生物科学与工程学院 河北 石家庄 050061

2 山西农业大学动物科技学院 山西 晋中 030801

3 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271000

摘要:【背景】我们的前期工作表明,在蛋鸡饲料中添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 可显著提高产蛋性能和蛋品质,但其益生机制还不清楚。【目的】从基因组学和转录组学的视角去揭示益生菌提高蛋鸡生产性能的潜在机制。【方法】利用高通量测序技术比较分析基础日粮组(C组)和解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 添加组(0.06%, 2.0×10^{10} CFU/g, T组)盲肠微生物菌群和回肠粘膜基因表达的差异。

【结果】基因组学分析发现,与对照组相比,益生菌添加组的盲肠菌群 Chao1 和 Shannon 指数升高;在门水平上,厚壁菌门/拟杆菌门(*Firmicutes/Bacteroidetes*)的比例显著增加,梭杆菌门(*Fusobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度降低;在属水平上,厚壁菌门中的考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、瘤胃球菌科 UCG-014 属(*Ruminococcaceae* UCG-014)、厌氧棍状菌属(*Anaerotruncus*)、瘤胃梭菌属(*Ruminiclostridium* 9)、克里斯滕森氏菌(*Christensenellaceae_R-7_group*)相对丰度明显增加。转录组学结果表明,回肠粘膜组织中共有 356 个差异表达基因,其中,上调基因 199 个,下调基因 157 个。生物信息学分析提示,上调基因参与了淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等促进物质代谢和营养吸收的过程。

【结论】日粮中添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238,可通过改善盲肠菌群多样性和肠道营养吸收能力提高蛋鸡的饲料利用率和产蛋性能,具有潜在的实用价值。

关键词: 蛋鸡, 解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238, 基因组学, 转录组学, 生产性能

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81903282); Key Research and Development Project of Shandong Province (2015GSF19023)

ΔThese authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: PANG Quan-Hai: sxpangquanhai@126.com; CHANG Wei-Shan: sdauwschang@sina.com

Received: 15-01-2020; **Accepted:** 06-03-2020; **Published online:** 09-04-2020

基金项目: 国家自然科学基金项目(81903282); 山东省重点研发计划项目(2015GSF19023)

Δ对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: 庞全海: sxpangquanhai@126.com; 常维山: sdauwschang@sina.com

收稿日期: 2020-01-15; **接受日期:** 2020-03-06; **网络首发日期:** 2020-04-09

Exploring mechanisms for *Bacillus amyloliquefaciens*-mediated production performance improvement of laying hens based on cecal microflor and ileum mucosal gene expression

ZHANG Hong-Na^{Δ1} ZHOU Yu-Fa^{Δ2} CUI Na¹ PANG Quan-Hai^{*2} CHANG Wei-Shan^{*3}

1 College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061, China

2 College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

3 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271000, China

Abstract: [Background] *Bacillus amyloliquefaciens* BLCC1-0238 supplementation has been reported to effectively improve production performance and egg quality of laying hens in our previous study, the underlying mechanism, however, remains poorly understood. [Objective] The current study was conducted to examine the potential mechanism of *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 to increase production performance of laying hens by evaluating cecal microflora and gene expression in ileum mucosa. [Methods] High-throughput sequencing technology was used to compare the differences of cecal microflora composition and gene transcription level of ileum mucosa between the basal diet group (group C) and *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 supplementation group (0.06%, 2.0×10^{10} CFU/g, group T). [Results] *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 supplementation can produce higher indexes of Chao1 and Shannon, which demonstrated increased diversity of cecal microflora. At the phylum level, the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* was significantly increased, while relative abundances of *Fusobacteria* and *Proteobacteria* were reduced, and at the genus level, the relative abundances of *Phascolarctobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcaceae* UCG-014, *Anaerotruncus*, *Ruminiclostridium* 9, and *Christensenellaceae_R-7* group were all elevated, which indicated that *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 supplementation altered the cecal microflora composition from different levels. With respect to gene expression change in ileum mucosa, 356 differentially expressed genes were identified, among which 199 genes were up-regulated and 157 genes were down-regulated. Bio-informatics analysis found that these up-regulated genes were involved in numerous signaling pathways associated with nutrition metabolism, such as glycine, serine and threonine metabolism, starch and sucrose metabolism, and galactose metabolism, which may accelerate nutrition absorption of laying hens. [Conclusion] *B. amyloliquefaciens* BLCC1-0238 supplementation can effectively improve laying hen production performance via increasing the diversity of cecal microflora and promoting nutrition absorption of laying hens, providing solid evidence for its further practical application.

Keywords: Laying hens, *Bacillus amyloliquefaciens* BLCC1-0238, Genomics, Transcriptomics, Production performance

抗生素在畜禽生产中的应用为畜牧业的健康快速发展提供了有力保障,但养殖过程中对抗生素的过度依赖,以及不合理使用甚至是滥用抗生素,导致动物产品中的药物残留严重超标,动物源耐药菌株大面积散播,已经对公共安全和生态环境造成了严重威胁^[1-2]。欧盟等国家已经通过颁布法令的形式严禁在畜禽日粮中添加抗生素作为促生长剂^[3]。目前在动物生产中,选择添加抗生素替代品已经引起了各国科学家的密切关注。大量的研究证实了益

生菌能提高动物的生产性能、增强免疫力、缓解热应激,甚至预防和控制疾病^[4-8]。

在益生菌的选择上,乳酸杆菌和芽孢杆菌备受欢迎^[9-10]。芽孢杆菌在一定条件下会形成芽孢,可对抗酸、胆碱和高温等恶劣环境,在动物肠道环境内可以生存并进行繁殖,对肠道菌群起到平衡作用^[11];另外,芽孢杆菌还能利用自身产生的淀粉酶和脂肪酶等去降解动物日粮中复杂的碳水化合物,提高畜禽对饲料的利用率^[12-15]。

但是目前许多关于益生菌的研究仅是从饲喂结果上去反映其益生效果,而针对益生菌益生机制的研究却很少。这主要是由于畜禽消化道环境有海量的微生物菌群定殖,要想系统研究益生菌在复杂的胃肠道内发挥益生功效的机制显得较为困难,但新兴的高通量测序技术的应用为人们研究益生菌在动物肠道内发挥益生机制提供了有利手段^[16-17]。因此,本研究在前期工作的基础上^[15],以基因组学和转录组学技术为手段探讨蛋鸡日粮中添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 对盲肠微生物菌群和回肠粘膜基因表达的影响,从而较为系统地阐明其提高蛋鸡生产性能的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验设计

基于课题组的前期工作^[15],利用高通量测序技术比较分析基础日粮组(C组)和解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 添加组(0.06%, 2.0×10^{10} CFU/g, T组)盲肠微生物菌群和回肠粘膜基因表达的差异,从基因组学和转录组学两个角度揭示益生菌提高蛋鸡生产性能的潜在机制。

1.2 主要试剂和仪器

Omega Stool DNA Isolation Kit, Omega 公司; TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit, Illumina 公司; SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep Kit, Agilent Technologies 公司; Trizol, Invitrogen 公司; Tiangen 凝胶回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。

水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; Illumina HiSeq[™] 4000 平台, Illumina 公司; Agilent 2100 生物分析仪, Agilent Technologies 公司。

1.3 样品采集和处理

从基础日粮组(C组)和解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 添加组(0.06%, 2.0×10^{10} CFU/g, T组)分别随机选取 3 只蛋鸡,颈静脉放血法处死后,收取盲肠内容物和回肠中段。用细绳将盲肠口结扎并

取出,放入无菌的冷冻管中,在无菌条件下收集每个样本的盲肠内容物。快速剪取回肠中段,用 0.9% 灭菌生理盐水冲洗后,无菌条件下用手术刀刀背刮取回肠粘膜,放置冻存管中。收集的样品均置于液氮保存。

1.4 DNA 的提取和 MiSeq 高通量测序分析

采用 Omega Stool DNA Isolation Kit 提取盲肠内容物 DNA,测定纯度合格(OD_{260}/OD_{280} 约为 1.8)后,PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区^[18],产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。16S rRNA V3-V4 高变区使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 进行文库构建,使用 Illumina HiSeq[™] 4000 平台进行高通量测序。利用 Trimmomatic 序列过滤软件去除接头和低质量片段(quality score<20)。97% 的相似性作为操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)的划分标准,使用 RDP 分类软件把 OTU 按照不同层次进行分类,并进行信息注解。最后,进行 α 多样性指数分析。

1.5 总 RNA 提取和转录组学分析

Trizol 法提取总 RNA,并使用 Agilent 2100 生物分析仪对其浓度和完整度进行检测。构建 cDNA 文库的 RNA 完整度数值(RNA integrity number, RIN)的阈值为 7。用 SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep Kit 进行文库构建。随后采用 Illumina HiSeq[™] 4000 平台进行高通量测序,测序模式为双末端 150 bp (PE150)。利用 Trimmomatic (V0.38) 软件对原始数据进行质控及预处理,最终得到高质量的序列信息。

利用 HISAT2 (V2.1.0)软件将上述高质量序列信息对比到物种基因组(*Gallus gallus* 5.0, V91, Ensembl),生成比对信息。然后利用 StringTie (V1.3.5)对转录样本进行拼接,最后应用 Ballgown (V2.14.1)计算基因表达水平,对基础日粮组(C组)和解淀粉芽孢杆菌添加组(T组)的差异基因进行比较分析。差异基因筛选标准为 $P \leq 0.05$ 且差异倍数 ($|\log_2 \text{Fold change}| \geq 1$)。最后对获得的差异基因采用 Top GO (V2.34.0)和 KOBAS (V3.0)进行富集分析。

1.6 统计学分析

采用 One-way ANOVA (SPSS 22.0)分析数据, 利用 Duncan 多重检验进行差异性分析和样本均数比较, $P<0.05$ 表示差异显著, 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 盲肠菌群多样性

构建的 DNA 文库中, 将相似性为 97%的序列集归为一个 OTU, 结果发现 C 组和 T 组分别包含 2 126 和 2 787 个 OTU, 交集数目为 1 001 个 OTU (图 1)。对盲肠菌群 OTU 进行 α 多样性分析, T 组 Chao1 指数(2 789)和 Shannon 指数(5.35)均高于 C 组 Chao1 指数(2 133)和 Shannon 指数(5.02) (表 1), 说明蛋鸡基础日粮中 BLCC1-0238 益生菌的添加增加了盲肠微生物菌群的多样性。Coverage 指数在 99.93%以上, 说明分析结果能够覆盖样本数据, 能够真实反映盲肠菌群情况。

2.2 盲肠菌群组成

从图 2 可见, T 组中拟杆菌门的相对丰度显著下降, 而厚壁菌门的相对丰度显著增加。另外, T 组中的放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、互氧菌门(*Synergistetes*)和广古菌

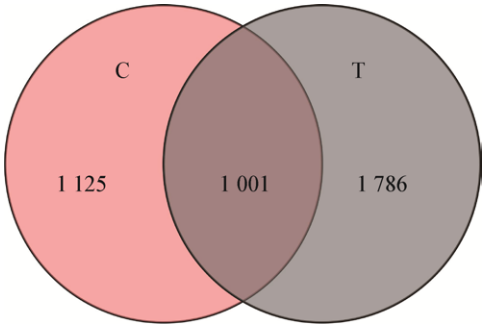


图 1 T 组和 C 组之间的 OTU 数量
Figure 1 Numbers of OTUs between test group and control group

表 1 盲肠菌群 α 多样性指数
Table 1 Alpha diversity indices of cecal microflora in laying hens

项目	C 组	T 组
Item	C group	T group
Reads	161 141	188 318
OTUs	2 126	2 787
Ace	2 187 (2 170–2 211)	2 823 (2 811–2 841)
Chao1	2 133 (2 129–2 141)	2 789 (2 788–2 795)
Shannon	5.02 (5.01–5.03)	5.35 (5.34–5.36)
Simpson	0.016 6 (0.016 4–0.016 7)	0.014 4 (0.014 2–0.014 6)
Coverage (%)	99.93	99.96

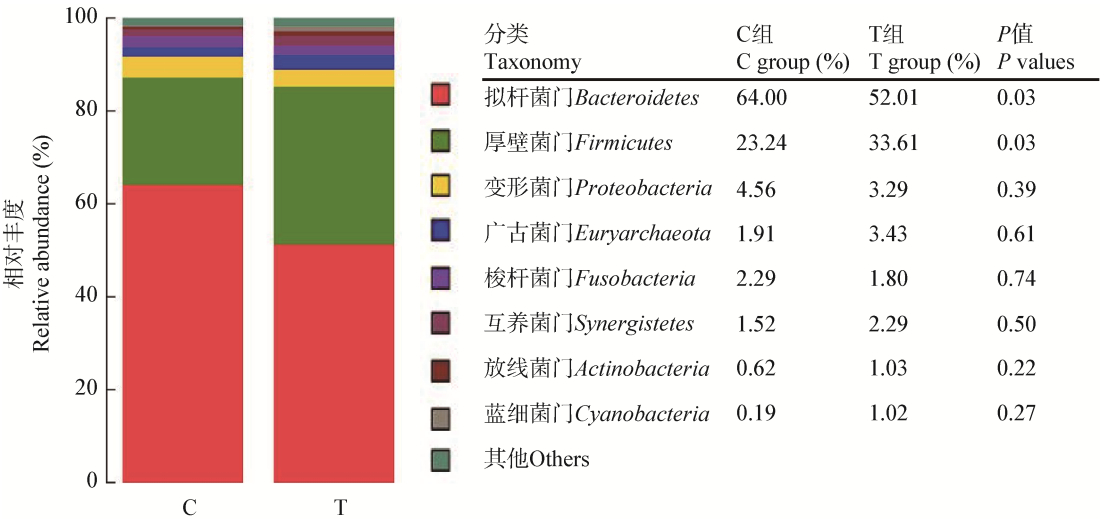


图 2 盲肠菌群在门水平上的组成
Figure 2 Cecal microflora taxonomic composition at phylum level

门(*Euryarchaeota*)的相对丰度得到提高,而梭杆菌门(*Fusobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度降低了。

由图 3 可见,拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度最高,其次是理研菌属(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)和考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)。与 C 组相比, T 组的拟杆菌属的相对丰度显著下降,理研菌属(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)等几个菌属的相对丰度也有下降,但差异不显著,这说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的添加在一定程度上抑制了病原微生物的繁殖。而厚壁菌门中的考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、瘤胃球菌科 UCG-014 属(*Ruminococcaceae* UCG-014)、厌氧棍状菌属(*Anaerotruncus*)、瘤胃梭菌属(*Ruminiclostridium* 9)、克里斯滕森氏菌属(*Christensenellaceae_R-7_group*)相对丰度在 T 组内增加,但差异不显著。

由于乳酸杆菌可参与调节微生物之间平衡,提高抗病能力,考拉杆菌属、瘤胃球菌属、厌氧棍状菌属在肠道内均可以产生短链脂肪酸,降低和改善肠道炎症,因此解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的添加可通过提高这些菌群的丰度进而改善肠道微环境。

2.3 回肠粘膜差异表达基因分析

通过对回肠粘膜组织中转录组进行测定,结果见图 4 火山图, C 组和 T 组之间共有 356 个差异表达基因,包括 199 个上调基因和 157 个下调基因。其中共有 18 个与物质消化和吸收相关的差异表达基因(表 2),如编码蔗糖酶-异麦芽糖酶、麦芽糖化酶(α -葡萄糖苷酶)和乳糖酶的基因,醛缩酶、果糖二磷酸盐 B 和葡萄糖-6-磷酸酶催化亚单位的编码基因,苹果酸酶 1 编码基因,以及果糖二磷酸酶 1 和葡萄糖合成酶 2 的编码基因得到上调。这些与淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢相关的基因得到上调,有利于动物机体把淀粉、乳糖和蔗糖等物质转变为便于机体利用的葡萄糖。

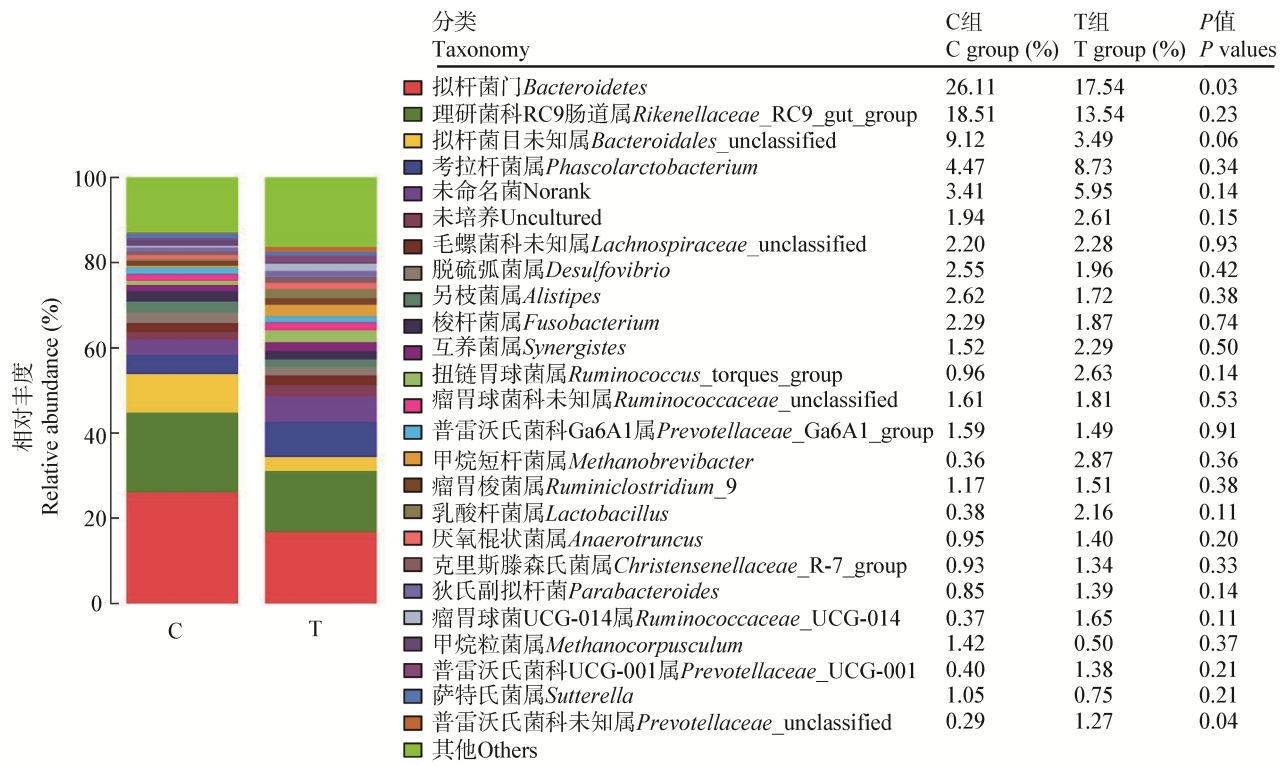


图 3 盲肠菌群在属水平上的组成
Figure 3 Cecal microflora taxonomic composition at genus level

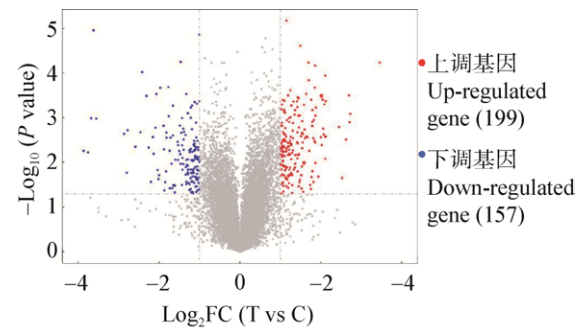


图 4 回肠粘膜差异表达基因
Figure 4 Differentially expressed genes in the ileum mucosa

2.4 GO 聚类分析

GO 分析评估了两组之间差异表达基因的功能富集(图 5), 主要分布于三大类功能: 生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)。涉及到细胞粘附、解剖结构形态发生、系统发育、肌肉系统过程、细胞对内源性刺激反应、肠道吸收、脂类消化、细胞对生长因子刺激反应的负调节、细胞表面、刷状缘、肌动蛋白丝束和含硫化合物结合等 12 个亚类功能。GO 分析结果中, 与脂

表 2 回肠粘膜中与消化吸收相关的差异表达基因
Table 2 Differentially expressed genes of digest and absorption in the ileum mucosa

基因 ID	基因符号	编码蛋白	差异倍数	P 值
Gene ID	Gene symbol	Encoded protein	Log ₂ FC	P value
ENSGALG00000015544	ALDOB	醛缩酶, 果糖二磷酸 B	2.111	1.15E-04
		Aldolase, fructose-bisphosphate B		
ENSGALG00000009511	SI	蔗糖酶-异麦芽糖	0.741	1.27E-03
		Sucrase-isomaltase		
ENSGALG00000014995	PGM5	葡萄糖磷酸变位酶 5	-0.658	1.94E-03
		Phosphoglucomutase 5		
ENSGALG00000030034	G6PC	葡萄糖 6 磷酸酶亚基	0.977	2.39E-03
		Glucose-6-phosphatase catalytic subunit		
ENSGALG00000013265	GYS2	糖原合成酶 2	0.607	3.07E-03
		Glycogen synthase 2		
ENSGALG00000004222	HK1	己糖激酶 1	-0.906	3.83E-03
		Hexokinase 1		
ENSGALG00000031341	MGAM	麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶(α-葡萄糖苷酶)	0.696	3.95E-03
		Maltase-glucoamylase (α-glucosidase)		
ENSGALG00000012260	LCT	乳糖酶	0.666	1.25E-02
		Lactase		
ENSGALG00000009306	SLC2A2	可溶载体家族 2 成员 2	1.136	1.29E-02
		Solute carrier family 2 member 2		
ENSGALG00000005043	ACACB	乙酰辅酶 A 羧化酶 β	-0.776	2.70E-02
		Acetyl-CoA carboxylase beta		
ENSGALG00000015849	ME1	苹果酸酶 1	0.588	3.66E-02
		Malic enzyme 1		
ENSGALG00000012613	FBP1	1,6 二磷酸果糖 1	1.569	4.51E-02
		Fructose 1,6-bisphosphatase 1		
ENSGALG00000032679	GCSH	甘氨酸裂解系统蛋白 H	0.668	3.10E-03
		Glycine cleavage system protein H		
ENSGALG00000008317	SDSL	丝氨酸脱水酶样	0.666	3.87E-03
		Serine dehydratase like		
ENSGALG00000023436	HDC	组氨酸脱羧酶	-1.122	3.90E-03
		Histidine decarboxylase		
ENSGALG00000015053	GLDC	甘氨酸脱氢酶	1.081	1.24E-02
		Glycine dehydrogenase		
ENSGALG00000030187	CAT	过氧化氢酶	0.650	3.44E-02
		Catalase		
ENSGALG00000025844	AMT	氨基甲基转移酶	0.708	3.58E-02
		Aminomethyltransferase		

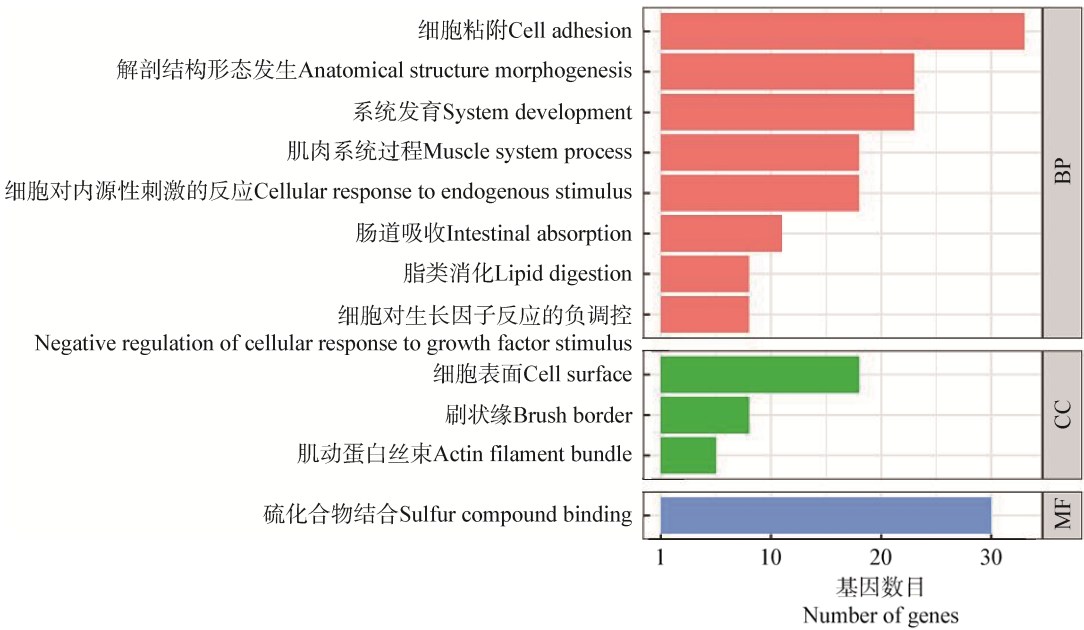


图 5 回肠粘膜差异表达基因功能聚类 GO 分析
Figure 5 GO analysis of differentially expressed genes in the ileum mucosa

肪代谢和肠道吸收相关的基因得到显著的功能富集，说明添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 会促进动物机体对营养物质的吸收和利用。

2.5 KEGG 通路分析

由图 6 可见，主要有 12 个生物学代谢过程得到富集，包括：半乳糖代谢；视黄醇代谢；亚油酸代谢；甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢；淀粉和蔗糖代谢；血管平滑肌收缩；细胞色素 P450-药物代谢；过氧化物酶体合成；细胞色素 P450-外源生物代谢；戊糖和葡萄糖醛酸转换；初级胆汁酸生物合成；过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路

代谢；血管平滑肌收缩；细胞色素 P450-药物代谢；过氧化物酶体合成；细胞色素 P450-外源生物代谢；戊糖和葡萄糖醛酸转换；初级胆汁酸生物合成；过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路。该结果说明蛋鸡日粮中添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0473，会调控肠道粘膜中碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂类消化和肠道吸收等生物学过程的相关信号通路。

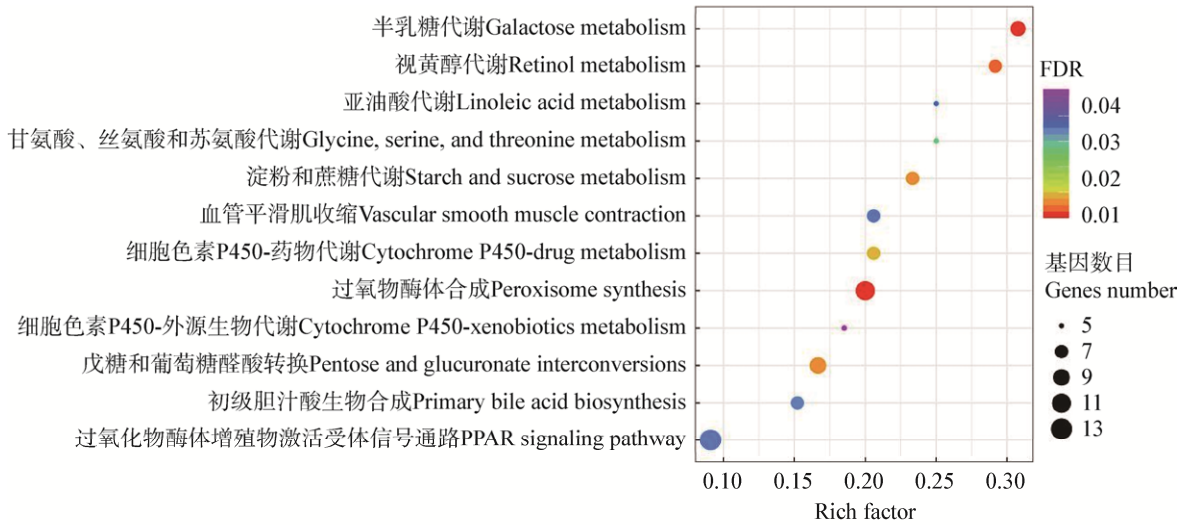


图 6 回肠粘膜差异表达基因 KEGG 通路分析
Figure 6 Enriched KEGG pathways based on differentially expressed genes in the ileum mucosa

3 讨论与结论

肠道微生物多样性对于蛋鸡适应环境和稳定生产性能至关重要^[19-20]。本研究采用基因组学方法分析,发现在 T 组中微生物菌群多样性指数显著增加,有研究^[21-22]表明这会提高蛋鸡的抗病能力和生产性能。同时,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 显著增加了厚壁菌门的相对丰度,而降低了拟杆菌门的相对丰度,有研究^[23-24]表示肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门比例升高可能会提高肠道对营养吸收和能量转化能力。陈阳等研究表明梭杆菌门中一些菌属与机体胆固醇和总胆固醇的含量存在正相关,变形菌门包括很多条件性致病菌,如沙门氏菌、大肠杆菌等^[25]。在本研究中,梭杆菌门和变形菌门的相对丰度与 C 组相比出现不同程度的降低,说明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的添加在一定程度上抑制了病原微生物的繁殖。

本研究 T 组中厚壁菌门中某些菌属相对丰度发生了改变,主要包括乳酸杆菌属、考拉杆菌属、瘤胃球菌属、厌氧棍状菌属和克里斯滕森氏菌。Biagi 等指出乳酸杆菌属是动物肠道微环境中重要的益生菌之一,可参与调节微生物之间平衡,提高机体免疫力与抗病能力^[26]; Zhang 等发现考拉杆菌属、瘤胃球菌属、厌氧棍状菌属在肠道内均可以产生短链脂肪酸,降低和改善肠道炎症^[27]; Sheng 等指出反刍过程中瘤胃梭菌属的某些菌可提高饲料中纤维素和木质素的分解率^[28]; Goodrich 等认为提高肠道内克里斯滕森氏菌的丰度对机体健康有益^[29];上述菌属在本研究的 T 组中丰度增加,表明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的添加可使蛋鸡肠道内有益菌增加,改善肠道微环境。另外,脱硫弧菌属与肠炎、肠癌以及某些代谢疾病发生有关^[29],在本研究的 T 组中其相对丰度的下降说明了解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 具有抑制有害菌繁殖的重要作用。

转录组学分析发现,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 上调了与淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢信号通路相关的基因表达,Goodrich 等^[29]表示这

些信号通路有利于动物机体把淀粉、乳糖和蔗糖等物质转变为便于机体利用的葡萄糖。通过分析碳水化合物代谢相关的差异表达基因,发现存在于肠上皮细胞的刷状边缘膜中的蔗糖酶-异麦芽糖酶、麦芽糖化酶的编码基因表达显著上调, Khan 等^[30]研究表明这些功能基因的上调有助于机体对营养物质的吸收。乳糖酶的基因表达也呈现显著上调,乳糖酶亚基是唯一已知的能够将乳糖降解为葡萄糖和半乳糖的 β -半乳糖苷酶, Khan 等^[30]通过转录组分析发现这些酶的上调表达会增加机体对碳水化合物的消化吸收能力,从而降低料蛋比。另外,醛缩酶果糖二磷酸盐 B 和葡萄糖-6-磷酸酶催化亚单位编码基因也在 T 组中得到显著上调,前者是糖酵解过程的关键酶,后者是糖异生过程的关键酶,而且还具有细胞和生长因子的活性,研究^[15]证实这两个酶的表达上调会为处于产蛋期的蛋鸡提供更多的能量。与三羧酸循环密切相关的乙酰辅酶 A 羧化酶 β 是脂肪酸代谢过程中的关键酶,其编码基因表达下调会减少脂肪酸的合成;与糖原分解与合成密切相关的己糖激酶 1 编码基因的下调会减弱糖原的分解,而果糖二磷酸酶 1 和葡萄糖合成酶 2 的上调会增强糖原的合成;这些基因表达的改变说明,解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 的添加为保证蛋鸡的持续产蛋提供了能量基础。在本研究中,与葡萄糖吸收利用相关的溶质载体家族 2 成员 2 的表达基因在益生菌添加组也出现了显著上调,研究^[15,17,31]表明该基因的上调会促进蛋鸡对葡萄糖的吸收利用。

KEGG 分析结果显示,不仅甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路被显著富集,而且参与该通路的甘氨酸裂解系统蛋白 H、甘氨酸脱氢酶、丝氨酸脱水酶样和氨基甲基转移酶的编码基因也表现为显著上调,这表明解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 会促进甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢为机体提供更多的中间代谢产物。另外,编码过氧化氢酶的基因显著上调,有研究^[32-33]表明过氧化氢酶增加会提高机体的抗氧化能力;组氨酸脱羧酶的编码基因却表现为显

著下调, 研究^[34]表明该酶在机体内的含量降低会减少组胺的生成, 从而减少机体发生过敏性炎症。GO分析的结果表明, 与脂肪代谢和肠道吸收相关的基因也得到了显著的功能富集, 这说明添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 会促进动物机体对营养物质的吸收和利用。

综上所述, 本研究从基因组学和转录组学两个角度分析表明, 日粮中添加解淀粉芽孢杆菌 BLCC1-0238 可以增加盲肠微生物菌群多样性, 调控肠道粘膜中碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂类消化和肠道吸收等生物学过程相关基因的表达, 增强肠道物质代谢与营养吸收能力, 从而提高蛋鸡生产性能和蛋品质。然而, 下一步研究中还应该进一步探讨微生物功能基因的丰度及其表达量的组学变化, 这样会更加深入地揭示益生菌的作用机理。

REFERENCES

- [1] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(9): 3435-3440
- [2] Chi XH, Feng YJ, Zheng BW. Transmission and genetic mechanism of drug-resistant bacteria in multi-sectors[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 311-318 (in Chinese)
迟小惠, 冯友军, 郑培文. 耐药菌在人-动物-环境中的传播和遗传机制[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 311-318
- [3] Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds[J]. Poultry Science, 2007, 86(11): 2466-2471
- [4] Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses[J]. Clinical Infectious Diseases, 2008, 46(S2): S58-S61
- [5] Zhang ZF, Kim IH. Effects of probiotic supplementation in different energy and nutrient density diets on performance, egg quality, excreta microflora, excreta noxious gas emission, and serum cholesterol concentrations in laying hens[J]. Journal of Animal Science, 2013, 91(10): 4781-4787
- [6] Bubnov RV, Babenko LP, Lazarenko LM, et al. Specific properties of probiotic strains: relevance and benefits for the host[J]. EPMA Journal, 2018, 9(2): 205-223
- [7] Adhikari P, Lee CH, Cosby DE, et al. Effect of probiotics on fecal excretion, colonization in internal organs and immune gene expression in the ileum of laying hens challenged with *Salmonella enteritidis*[J]. Poultry Science, 2019, 98(3): 1235-1242
- [8] Du R, Wang BH, Luo YL, et al. Advance in studying the effect of probiotics on gastrointestinal tract microorganism to improve meat quality[J]. Microbiology China, 2019, 46(9): 2378-2385 (in Chinese)
杜瑞, 王柏辉, 罗玉龙, 等. 益生菌调控胃肠道菌群改善肉品质的研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(9): 2378-2385
- [9] Markowiak P, Ślizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health[J]. Nutrients, 2017, 9(9): 1021
- [10] Johnson-Henry KC, Abrahamsson TR, Wu RY, et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics for the prevention of necrotizing enterocolitis[J]. Advances in Nutrition, 2016, 7(5): 928-937
- [11] Chaiyawan N, Taveeteptaikul P, Wannissorn B, et al. Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler[J]. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 2010, 40(2): 207-214
- [12] Shivaramaiah S, Pumford NR, Morgan MJ, et al. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry[J]. Poultry Science, 2011, 90(7): 1574-1580
- [13] Ahmed ST, Islam M, Mun HS, et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2014, 93(8): 1963-1971
- [14] Lei XJ, Ru YJ, Zhang HF. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbials and antibiotic on performance, nutrient digestibility, cecal microflora, and intestinal morphology in broiler chickens[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2014, 23(3): 486-493
- [15] Zhou YF, Li S, Pang QH, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* BLCC1-0238 can effectively improve laying performance and egg quality via enhancing immunity and regulating reproductive hormones of laying hens[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(1): 246-252
- [16] Liu YH, Jia YX, Liu C, et al. RNA-seq transcriptome analysis of breast muscle in Pekin ducks supplemented with the dietary probiotic *Clostridium butyricum*[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 844
- [17] Cheng Y. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* TL on the gene expression of the broiler's ileum[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018
程杨. 解淀粉芽孢杆菌 TL 对肉鸡回肠组织基因表达的影响[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2018
- [18] Guo JR, Dong XF, Liu S, et al. High-throughput sequencing reveals the effect of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 on the cecal microbiota and gene expression in ileum mucosa of laying hens[J]. Poultry Science, 2018, 97(7): 2543-2556
- [19] Abdelqader A, Al-Fataftah AR, Daş G. Effects of dietary

- Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance, eggshell quality, intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 179(1/4): 103-111
- [20] Mountzouris KC, Tsitrsikos P, Palamidi I, et al. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition[J]. *Poultry Science*, 2010, 89(1): 58-67
- [21] Zhang YW, Ma WF, Zhang ZD, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* on egg production, egg quality and caecal microbiota of hens during the late laying period[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2019, 73(3): 208-221
- [22] Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2010, 26(6): 564-571
- [23] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15718-15723
- [24] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023
- [25] Chen Y, Lu J, Zhu SM, et al. Effect of Gegen Qinlian Decoction and it's different compatibility groups on gut microbiota in rats with acute enteritis based on high-throughput sequencing[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(6): 1406-1417 (in Chinese)
- 陈阳, 陆杰, 朱思敏, 等. 基于高通量测序技术研究葛根芩连汤及其配伍对急性肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(6): 1406-1417
- [26] Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al. Gut microbiota and extreme longevity[J]. *Current Biology*, 2016, 26(11): 1480-1485
- [27] Zhang Y, Ma C, Zhao J, et al. *Lactobacillus casei* Zhang and vitamin K₂ prevent intestinal tumorigenesis in mice via adiponectin-elevated different signaling pathways[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24719-24727
- [28] Sheng T, Zhao L, Gao LF, et al. Lignocellulosic saccharification by a newly isolated bacterium, *Ruminiclostridium thermocellum* M3 and cellular cellulase activities for high ratio of glucose to cellobiose[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 172
- [29] Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 789-799
- [30] Khan S, Wu SB, Roberts J. RNA-sequencing analysis of shell gland shows differences in gene expression profile at two time-points of eggshell formation in laying chickens[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 89
- [31] Li H, Gu Z, Yang L, et al. Transcriptome profile analysis reveals an estrogen induced lncRNA associated with lipid metabolism and carcass traits in chickens (*Gallus Gallus*)[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 50(5): 1638-1658
- [32] Lobo V, Patil A, Phatak A, et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health[J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2010, 4(8): 118-126
- [33] Xie T, Bai SP, Zhang KY, et al. Effects of *Lonicera confusa* and Astragali Radix extracts supplementation on egg production performance, egg quality, sensory evaluation, and antioxidative parameters of laying hens during the late laying period[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(10): 4838-4847
- [34] Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(S1): 4592-4598