



彭旭艺,邢通,李蛟龙,等.慢性热应激对肉鸡盲肠菌群结构和代谢的影响及日粮添加胍基乙酸作用效果研究[J].南京农业大学学报,2024,47(4):731-740.

PENG Xuyi, XING Tong, LI Jiaolong, et al. Effects of chronic heat stress on the cecal microflora structure and metabolism of broiler and effects of dietary supplementation guanidinoacetic acid[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(4): 731-740.

## 慢性热应激对肉鸡盲肠菌群结构和代谢的影响及 日粮添加胍基乙酸作用效果研究

彭旭艺<sup>1</sup>,邢通<sup>1</sup>,李蛟龙<sup>2</sup>,张林<sup>1</sup>,赵良<sup>1</sup>,江芸<sup>3</sup>,高峰<sup>1\*</sup>

(1.南京农业大学动物科技学院,江苏南京210095;2.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京210014;  
3.南京师范大学食品与制药工程学院,江苏南京210023)

**摘要:**[目的]肠道微生物的组成和多样性对宿主的肠道发育和健康有着重要的影响。本试验旨在研究慢性热应激对肉鸡盲肠微生物区系和代谢的影响及日粮添加胍基乙酸(guanidinoacetic acid,GAA)的缓解作用。[方法]选取体重相近的192羽28日龄雄性爱拔益加(AA)肉鸡,随机分成4个处理组:对照组(NC,22℃,自由采食饮水);热应激组(HS,32℃,自由采食饮水);采食配对组(PF,22℃,当天饲料饲喂量同前一天HS组肉鸡的饲料消耗量,自由饮水);热应激+胍基乙酸组(HG,32℃,日粮添加0.6g·kg<sup>-1</sup>GAA,自由采食饮水)。每处理6重复,每重复8只鸡。试验期为14d。[结果]相较于NC组与PF组,热暴露显著降低盲肠拟杆菌门(Bacteroidota)相对丰度,显著提高厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)相对丰度( $P<0.05$ )。LEfSe分析发现,与炎症相关的Oscillospiraceae、Erysipelatoclostridium在HS组显著富集。相较于NC组,热暴露显著提高盲肠中乙酸浓度、显著降低丁酸浓度( $P<0.05$ )。相较于HS组,HG组的Actinobacteria相对丰度显著下降、乙酸浓度显著降低、丁酸浓度显著升高( $P<0.05$ )。与抗炎相关的Geobacillus、Bacillaceae在HG组显著富集。[结论]慢性热应激使肉鸡盲肠微生物菌群结构和短链脂肪酸代谢改变;日粮添加GAA能够减轻慢性热应激对肉鸡盲肠菌群结构和短链脂肪酸代谢的不利影响。

**关键词:**肉鸡;胍基乙酸;慢性热应激;盲肠微生物

中图分类号:S831.5

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0731-10

## Effects of chronic heat stress on the cecal microflora structure and metabolism of broiler and effects of dietary supplementation guanidinoacetic acid

PENG Xuyi<sup>1</sup>, XING Tong<sup>1</sup>, LI Jiaolong<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, ZHAO Liang<sup>1</sup>, JIANG Yun<sup>3</sup>, GAO Feng<sup>1\*</sup>

(1.College of Animal Science and Technology,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;  
2.Institute of Agricultural Products Processing,Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,Nanjing 210014,China;  
3.School of Food Science and Pharmaceutical Engineering,Nanjing Normal University,Nanjing 210023,China)

**Abstract:**[Objectives]The composition and diversity of gut microbiota have important effects on the development and health of the intestine. This study was conducted to evaluate the effects of chronic heat stress on the cecal microflora structure and metabolism of broiler and the alleviative effect of dietary supplementation with guanidinoacetic acid(GAA). [Methods]A total of 192 28-day-old Arbor Acres(AA)broilers were divided into four treatment groups:normal control(NC,ad libitum feeding and water,22℃),heat stress group(HS,ad libitum feeding and water,32℃),pair-fed group(PF,received food equivalent to that consumed by the HS group on the previous day,and ad libitum water,22℃),guanidinoacetic acid group(HG,ad libitum feeding and water,supplementing the basal diet with 0.6g·kg<sup>-1</sup>GAA,32℃). Each treatment consisted of 6 replicates with 8 broilers per cage. The trial lasted for 14 days. [Results]At the phylum level,the relative abundance of Firmicutes and Actinobacteria in the HS group was significantly higher than those in the NC and PF groups,while the relative abundance of Bacteroidota was significantly lower( $P<0.05$ ). LEfSe analysis revealed that Oscillospiraceae and Erysipelatoclostridium,which were associated with inflammation,were enriched in the HS group. Compared with the NC group,thermal exposure significantly increased the concentration of acetic acid and significantly decreased the concentration of butyric acid( $P<0.05$ ). The relative abundance of Actinobacteria decreased,and the concentrations of acetic acid decreased while butyric acid concentrations increased in the HG group compared with HS group( $P<0.05$ ). Geobacillus and Bacillaceae,which were

收稿日期:2023-05-04

基金项目:国家自然科学基金项目(32072780);江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2023]418)

\*通信作者:高峰,教授,博导,研究方向为动物营养生理调控,E-mail:gaofeng0629@njau.edu.cn。

associated with anti-inflammatory effects, were enriched in the HG group. [Conclusions] Chronic heat stress changed cecal microflora structure and short-chain fatty acid metabolism. Dietary supplementation with GAA was effective in alleviating heat stress which induced the caecal structural and short-chain fatty acid metabolic changes.

**Keywords:** broiler; guanidinoacetic acid; chronic heat stress; cecal microflora

肉鸡肠道内存在着数量庞大且种类丰富的微生物群,这些微生物可以与宿主建立一种互惠互利的关系,宿主可以为它们提供能量来源,而它们则发酵底物为宿主提供能量<sup>[1]</sup>。因此,维持健康和稳定的微生物区系对肉鸡的健康生长及肠道发育至关重要<sup>[2]</sup>。高温是影响肉鸡生产和健康的主要环境因素之一<sup>[3]</sup>。研究表明,长期暴露在高温环境下会引起肉鸡慢性热应激而影响肉鸡肠道菌群的结构和微生物代谢物的生成<sup>[4]</sup>。Shi等<sup>[4]</sup>研究发现,热暴露7和14 d后肉鸡盲肠的厚壁菌门、变形菌门的相对丰度增加,而拟杆菌门相对丰度减少并且 $\beta$ 多样性与对照组之间有显著差异。此外,高温环境下肠道内链球菌的大量滋生,导致专性厌氧的脆弱拟杆菌和厌氧梭菌数量及活性下降,造成肠道中短链脂肪酸含量下降<sup>[5]</sup>。

营养调控技术通常被认为是缓解热应激对机体损伤的有效手段。胍基乙酸(guanidinoacetic acid, GAA)是肌酸的前体物质。研究表明,日粮添加GAA能改善能量代谢,提高肉鸡生长性能<sup>[6]</sup>。在日粮中添加GAA可以减少内源性GAA的合成,从而储存更多的精氨酸,节省下来的精氨酸可用于其他功能,如作为一氧化氮和多胺的前体<sup>[7]</sup>。司徒金水等<sup>[8]</sup>研究发现在无动物性蛋白质日粮中添加 $0.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  GAA能有效改善断奶仔猪的肠黏膜屏障功能。李子平等<sup>[9]</sup>发现在循环热应激条件下( $34 \text{ }^\circ\text{C}$ , 8 h),日粮中分别添加 $0.5$ 和 $1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  GAA能显著改善肉鸡肠道形态。但GAA对慢性热应激肉鸡盲肠微生物菌群的影响目前尚少见报道。因此,本研究旨在探讨慢性热应激对肉鸡盲肠微生物的影响以及日粮中添加GAA的缓解作用,以为揭示慢性热应激对肉鸡的影响机制和GAA在缓解肉鸡慢性热应激上应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

胍基乙酸(纯度 $\geq 99\%$ )购自天津天成制药公司;爱拔益加(AA)28日龄雄性肉鸡,购买于江苏宿迁长丰养殖场。

### 1.2 试验设计与饲养管理

将192只28日龄健康状况良好、体重相近的AA公鸡随机分为4组,每组6个重复,每重复8只鸡。对照组(normal control, NC):环境温度 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ,自由采食基础日粮;热应激组(heat stress, HS):环境温度 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,自由采食基础日粮;采食配对组(pair-fed, PF):环境温度 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ,当天饲喂的饲料量同HS组前一天的饲料消耗量。热应激+胍基乙酸组(heat stress+GAA, HG):环境温度 $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,自由采食的基础日粮中添加 $0.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  GAA。各组均自由饮水。日粮组成及营养组成水平见表1。在实验室前期研究中已发现 $32 \text{ }^\circ\text{C}$

表1 基础原料日粮组成及营养组成水平

Table 1 Ingredients and nutrient composition of basal diets (as fed basis)

原料组成 Ingredients composition	水平 Level	营养组成 Nutrient composition	水平 Level
玉米 Corn	59.37	代谢能 Metabolic energy <sup>3</sup>	12.98
豆粕 Soybean meal	31.90	粗蛋白质 Crude protein	19.00
豆油 Soybean oil	5.00	钙 Calcium	0.90
石粉 Limestone	1.23	总磷 Total phosphorus	0.56
磷酸氢钙 $\text{CaHPO}_4$	1.50	非植酸磷 Non-phytate phosphorus	0.35
L-赖氨酸·盐酸盐 L-Lys·HCl	0.11	赖氨酸 Lysine	1.00
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.27	蛋氨酸 Methionine	0.46
食盐 Sodium chloride	0.30	胱氨酸 Cystine	0.80
维生素预混料 Vitamin premix <sup>1</sup>	0.03	苏氨酸 Threonine	0.60
矿物预混料 Mineral premix <sup>2</sup>	0.20	色氨酸 Tryptophan	0.20
70%氯化胆碱 70% Choline chloride	0.09		

注:1) 维生素预混料为每千克日粮提供:维生素A, 12 000 IU; 维生素D, 2 500 IU; 维生素E, 20 IU; 维生素K<sub>3</sub>, 1.3 mg; 维生素B<sub>1</sub>, 2.2 mg; 维生素B<sub>2</sub>, 7.8 mg; 维生素B<sub>3</sub>, 40 mg; 泛酸钙, 16.5 mg; 维生素B<sub>6</sub>, 4 mg; 生物素, 0.04 mg; 叶酸, 1.2 mg; 维生素B<sub>12</sub>, 15  $\mu\text{g}$ 。2) 矿物预混料为每千克日粮提供:铁(硫酸亚铁), 80 mg; 铜(硫酸铜), 8.0 mg; 锰(硫酸锰), 110 mg; 锌(硫酸锌), 65 mg; 碘(碘酸钙), 1.1 mg; 硒(亚硒酸钠), 0.3 mg。3) 代谢能单位为 $\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

Note: 1) Vitamin premix provided per kilogram of diet: vitamin A, 12 000 IU; vitamin D, 2 500 IU; vitamin E, 20 IU; menadione, 1.3 mg; thiamin, 2.2 mg; riboflavin, 7.8 mg; nicotinamide, 40 mg; calcium pantothenate, 16.5 mg; pyridoxine HCl, 4 mg; biotin, 0.04 mg; folic acid, 1.2 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 15  $\mu\text{g}$ 。2) Mineral premix provided per kilogram of diet: iron, 80 mg; copper, 8.0 mg; manganese, 110 mg; zinc 65 mg; iodine, 1.1 mg; selenium, 0.3 mg。3) The unit of metabolic energy is  $\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

暴露 7 d 和 14 d 处理均可建立慢性热应激<sup>[10-11]</sup>。

### 1.3 样品采集

分别在肉鸡 35 日龄和 42 日龄,每重复均选取 2 只最接近该重复平均体重的肉鸡放血屠宰,将盲肠靠近回肠一端结扎,使用灭菌剪将盲肠完整剪下,迅速放入无菌冻存管中,置于-80 °C 保存。

### 1.4 盲肠食糜短链脂肪酸的测定

配制 2 500 g·L<sup>-1</sup>的偏磷酸溶液,再加入 0.646 g 的巴豆酸,定容到 100 mL。取大约 1 g 盲肠食糜于离心管中,加入 5~10 mL 无酶无菌水,混合均匀。取上清液 1 mL 并加入 0.2 mL 偏磷酸巴豆酸混合液,置于-20 °C 冻存过夜,解冻后以 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,使用日本岛津 GC-14B 型气相色谱仪对样品进行分析,每次进样量为 0.4 μL。气相色谱仪参数:色谱柱采用毛细吸管柱,柱温 130 °C,汽化温度 180 °C,采用氢离子火焰检测器,检测温度 180 °C,载气为氮气,压力 60 kPa,氢气压力 50 kPa,氧气压力 50 kPa,灵敏度(档)为 101,衰减 3.0。

### 1.5 盲肠微生物 16S 测序

称取 0.8 g 的盲肠食糜进行液氮研磨,使用 EZNA™ Soil DNA 试剂盒(Omega Bio-Tek,美国)提取盲肠食糜 DNA,具体操作步骤严格按照说明书进行。取适量的样本 DNA 于离心管中,使用无菌水稀释至 1 ng·μL<sup>-1</sup>。以稀释后的基因组 DNA 为模板,使用带有 Barcode 的特异引物、Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(New England Biolabs,美国)及高效高保真酶对 V4 区进行扩增。使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation 试剂盒(Illumina,美国)进行文库构建,并对文库经 Qubit 和 Q-PCR 进行定量检验。合格的文库使用 NovaSeq6000 进行上机测序。根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据,截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH(V1.2.7)对每个样本的 reads 进行拼接,得到的拼接序列为原始 Tags 数据,拼接得到的原始 Tags 需要经过严格的过滤处理得到高质量的 Tags 数据<sup>[12]</sup>。参照 Qiime(V1.9.1)<sup>[13]</sup>的 Tags 质量控制流程处理后的 Tags 再进行去除嵌合体序列的处理<sup>[14]</sup>,得到最终的有效数据。

### 1.6 菌群多样性分析及功能分析

OTU(operational taxonomic unit)分析:利用 Uparse(v7.0.1001)算法对所有样本的有效数据以 97% 的一致性进行 OTU 聚类。根据聚类得到 OTU 结果和研究需求,分析不同样本(组)之间共有和特有的 OTU,当样本(组)数小于 5 时,对所有样本进行均一化处理之后绘制韦恩图(Venn graph)。

α 多样性指数:使用 Qiime(v1.7.0)软件计算 Chao1、Shannon、Simpson 多样性指数。

PCoA(principal co-ordinates analysis)聚类分析:使用 R 软件的 WGCNA、stats 和 ggplot2 软件包进行主坐标分析。

LEfSe 分析:为确定组间存在的差异特征,对特定组间科、属模块的差异丰度采用 Wilcoxon 秩和检验。

功能注释分析:提取 KEGG 数据库原核生物全基因组 16S rRNA 基因序列,利用 BLASTn 算法将其比对到 SILVA SSU Ref NR 数据库(BLAST bitscore>1 500)建立相关矩阵,将通过 UProC 和 PAUDA 两种方法注释的 KEGG 数据库原核生物全基因组功能信息对应到 SILVA 数据库中。

### 1.7 数据统计与分析

采用 SPSS 25.0 统计软件对 NC、HS 和 PF 组数据进行单因素方差分析和 Tukey 多重比较。HS 和 HG 组间进行独立样本 *t* 检验。结果均以平均值±标准误表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 慢性热应激对肉鸡盲肠菌群结构的影响及日粮添加胍基乙酸作用效果

**2.1.1 基于 OTU 的肉鸡盲肠菌群 Venn 图分析** 由图 1-A 可知,热暴露 7 d 后,NC、HS、PF、HG 4 组特有的 OTU 数分别为 2 866、2 774、2 939、2 686。其中 HS 组独有 OTU 为 653 个,NC 组独有 OTU 为 456 个,PF 组独有 OTU 为 461 个,HG 组独有 OTU 有 1 115 个。

由图 1-B 可知,热暴露 14 d 后,NC、HS、PF、HG 4 组特有的 OTU 数分别为 2 149、2 370、2 031、2 362。其中 HS 组独有 OTU 为 246 个,NC 组独有 OTU 为 225 个,PF 组独有 OTU 为 168 个,HG 组独有 OTU 有 251 个。

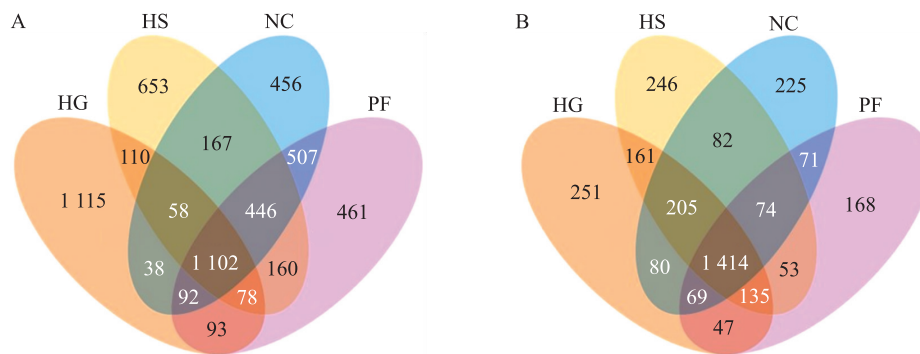


图1 热暴露7 d(A)和热暴露14 d(B)后不同处理肉鸡盲肠微生物的OTU数

Fig. 1 Number of OTU of caecal microbial with different treatments after thermal exposure 7 d(A) and 14 d(B)

韦恩图中每个圈代表一个(组)样本,圈和圈重叠部分的数字代表样本(组)之间共有的OTU数,没有重叠部分的数字代表样本(组)的特定OTU数。NC:对照组,22 °C,自由采食基础饲料;HS:热应激组,32 °C,自由采食基础饲料;PF:采食配对组,22 °C,当天饲喂的饲料量同HS组前一天的饲料消耗量;HG:热应激+胍基乙酸组,32 °C,自由采食基础日粮添加0.6 g·kg<sup>-1</sup>胍基乙酸的日粮。下同。

Each circle in the Venn diagram represents a sample (group). The number of overlapping parts of circles represents the number of OTU shared between samples (groups), and the numbers without overlapping parts represent the number of unique OTU of samples (groups). NC: Normal control group, 22 °C, ad libitum feed basal diet; HS: Heat stress group, 32 °C, libitum feed basal diet; PF: Pair-fed group, 22 °C, received food equivalent to that consumed by the HS group on the previous day; HG: Guanidinoacetic acid group, 32 °C, ad libitum feed basal diet with 0.6 g·kg<sup>-1</sup> guanidinoacetic acid. The same below.

**2.1.2 慢性热应激对肉鸡盲肠菌群 $\alpha$ 多样性的影响及日粮添加胍基乙酸作用效果** 由表2可知,热暴露7和14 d后,各组之间表征群落多样性及物种分布均匀度的Shannon指数、表征群落内物种分布多样性和均匀度的Simpson指数、估计群落样品中包含物种总数的Chao1指数均无显著差异。在热暴露7 d后,相较于NC和PF组,HS组肉鸡Simpson指数有上升的趋势( $P=0.077$ )。在热暴露14 d后,相较于NC和PF组,HS组肉鸡Simpson指数有下降的趋势( $P=0.053$ )。

表2 不同处理肉鸡盲肠菌群的 $\alpha$ 多样性

Table 2 Alpha diversity of caecal microbial with different treatments

指数 Index	分组 Groups				P值 P-value	
	NC	HS	PF	HG	$P_{ANOVA}$	$P_{HS-HG}$
热暴露7 d Thermal exposure for 7 d						
Shannon index	6.29±0.18	6.78±0.18	6.19±0.39	6.45±1.09	0.285	0.518
Simpson index	0.927±0.012	0.960±0.005	0.941±0.009	0.955±0.035	0.077	0.796
Chao1 index	1 509.37±202.91	1 515.44±174.57	1 483.33±146.40	1 186.94±122.31	0.991	0.154
热暴露14 d Thermal exposure for 14 d						
Shannon index	7.11±0.31	6.98±0.19	7.29±0.11	7.07±0.19	0.607	0.737
Simpson index	0.978±0.004	0.968±0.005	0.981±0.001	0.971±0.005	0.053	0.586
Chao1 index	1 238.80±155.17	1 323.73±184.10	1 297.62±135.10	1 331.75±165.57	0.929	0.975

注: $P_{ANOVA}$ :NC、HS和PF组之间的单因素方差分析和Tukey多重比较; $P_{HS-HG}$ :HS和HG组间的独立样本t检验。

Note: $P_{ANOVA}$ : One-way ANOVA and Tukey multiple comparisons between NC, HS and PF groups;  $P_{HS-HG}$ : Sample t test between HS and HG groups.

**2.1.3 肉鸡盲肠菌群PCoA聚类分析** 图2 PCoA聚类分析结果显示,热暴露7 d后,NC组与PF组重叠区域较大,HS组与NC组、HG组之间均无重叠区域,说明PF组与NC组之间肠道菌群组成相似性大于HS组。热暴露14 d后,NC组、HS组、PF组之间无重叠区域,HS组与HG组之间高度重叠,说明日粮中添加GAA对慢性热应激肉鸡肠道菌群组成无显著影响,HS组与HG组肠道菌群组成相似性较高。

**2.1.4 慢性热应激对肉鸡盲肠菌群丰度(门水平)的影响及日粮添加胍基乙酸作用效果** 如图3-A所示,盲肠微生物菌群门水平上,各试验组的优势菌门均为拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)。如图3-B所示,热暴露7 d后,相较于NC和PF组,HS组拟杆菌门的相对丰度显著降低( $P<0.05$ ),厚壁菌门、放线菌门的相对丰度显著升高( $P<0.05$ )。与HS组相比,HG组放线菌门的相对丰度显著升高( $P<0.05$ );热暴露14 d后,相较于NC组与PF组,HS组拟杆菌门(Bacteroidota)的相对丰度显著降低( $P<0.05$ ),厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度显著升高( $P<0.05$ )。HG组与HS组之间各菌门相对丰度无显著差异。

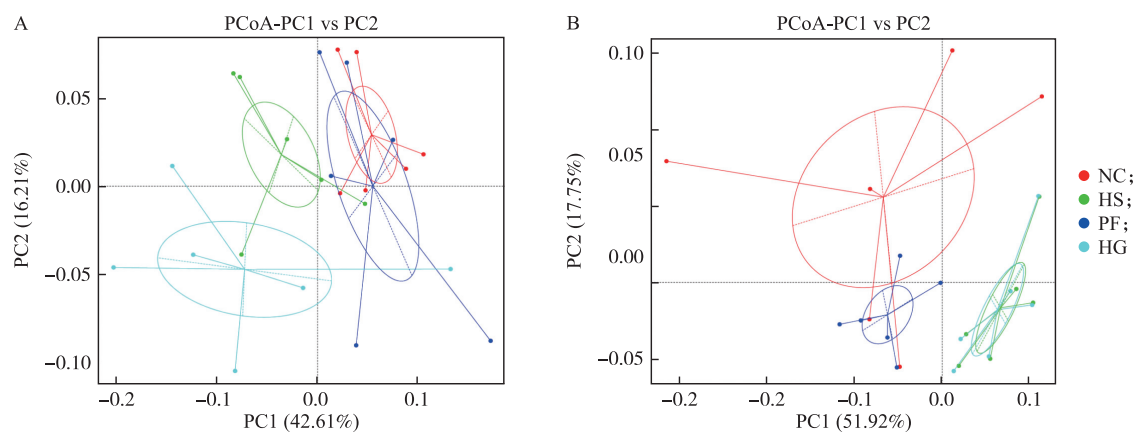


图 2 热暴露 7 d(A)和热暴露 14 d(B)后不同处理盲肠微生物菌群的 PCoA 聚类  
**Fig. 2 PCoA of caecal microbial of broilers with different treatments after thermal exposure 7 d(A)and 14 d(B)**

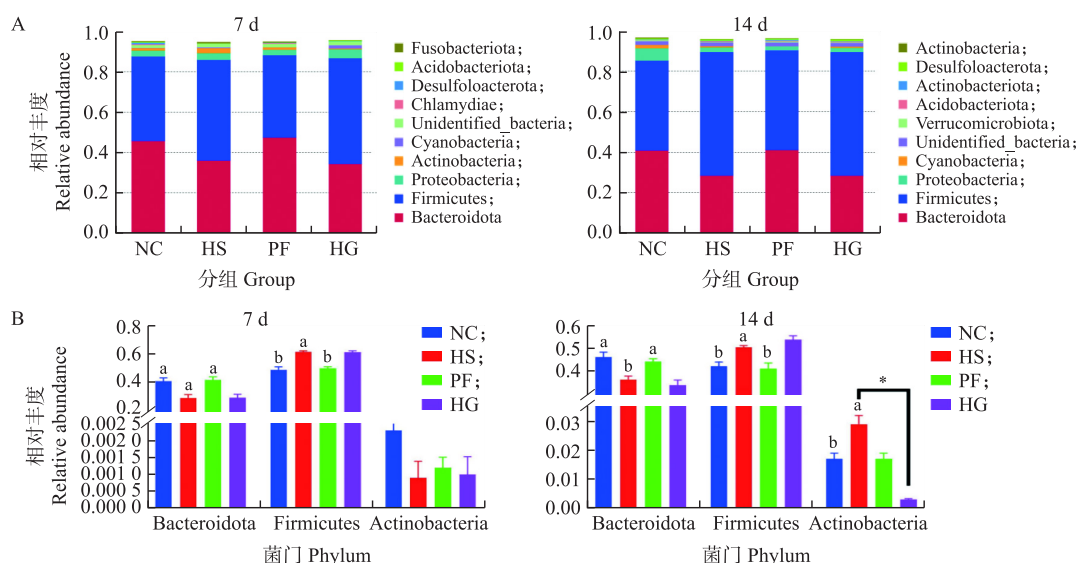


图 3 热暴露 7 d 和热暴露 14 d 后不同处理在门水平上的盲肠微生物菌群组成 (A) 和优势菌群丰度 (B)  
**Fig. 3 Caecal bacteria composition(A)and abundance of predominant bacteria(B)of broilers at the phylum level with different treatments after thermal exposure 7 d and 14 d**

不同小写字母表示 NC、HS 和 PF 组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。\*  $P_{HS-HG} < 0.05$ 。下同。

Different lowercase letters indiate significant difference among the NC, HS and PF groups ( $P < 0.05$ ). \*  $P_{HS-HG} < 0.05$ . The same below.

**2.1.5 肉鸡盲肠菌群 LEfSe 分析** LEfSe 分析结果显示:热暴露 7 d 后 NC、HS、PF 组鉴定出 4 个特征菌科和 4 个特征菌属,其中 2 个菌科 (Micavibrionaceae、Oscillospiraceae)、4 个菌属 (*Luteolibacter*、*Owenweeksia*、*Peredibacter*、*Anaerofilum*) 在 HS 组中相对丰度较高 ( $LDA > 3, P < 0.05$ ; 图 4-A)。进化分支图显示 NC 组 Butyricicoccaceae, HS 组 Micavibrionaceae、Oscillospiraceae, PF 组 NS9\_marine\_group 为差异显著的物种 (图 4-B)。分析比较 HG 组与 HS 组发现 6 个特征菌科和 7 个特征菌属,其中 2 个菌科 (Muribaculaceae、Bacillaceae)、3 个菌属 (*Pseudoxanthomonas*、*Geobacillus*、*Tepidimonas*) 在 HG 组中相对丰度较高 ( $LDA > 3, P < 0.05$ ; 图 4-C)。进化分支图显示 HS 组 Brevibacteriaceae、Peptostreptococcaceae、Fusobacteriaceae、Oscillospiraceae, HG 组 Muribaculaceae、Bacillaceae 为差异显著的物种 (图 4-D)。

LEfSe 分析结果显示:热暴露 14 d 后 NC、HS、PF 组 ( $LDA > 3, P < 0.05$ ; 图 5-A) 鉴定出 9 个特征菌科、18 个特征菌属,其中 2 个菌科 (Lactobacillaceae、Christensenellaceae)、9 个菌属 (*Ligilactobacillus*、*UCG\_008*、*Erysipelatoclostridium*、*Christensenellaceae\_R\_7\_group*、*Frisingicoccus*、*Sellimonas*、*Anaerostipes*、*Negativibacillus*、*DTU089*) 在 HS 组中相对丰度较高。进化分支图显示 NC 组 Bacteroidaceae、Carnobacteriaceae、Sporomusaceae、Sutterellaceae、Akkermansiaceae, HS 组 Lactobacillaceae、Christensenellaceae, PF 组 Marinifilaceae、Muribaculaceae 为差异显著的物种 (图 5-B)。比较 HG 组与 HS 组,发现仅有 1 个特征菌属

(*UCG\_008*) 在 HG 组中相对丰度较高 ( $LDA > 3, P < 0.05$ ; 图 5-C)。进化分支图未显示差异显著的物种 (图 5-D)。

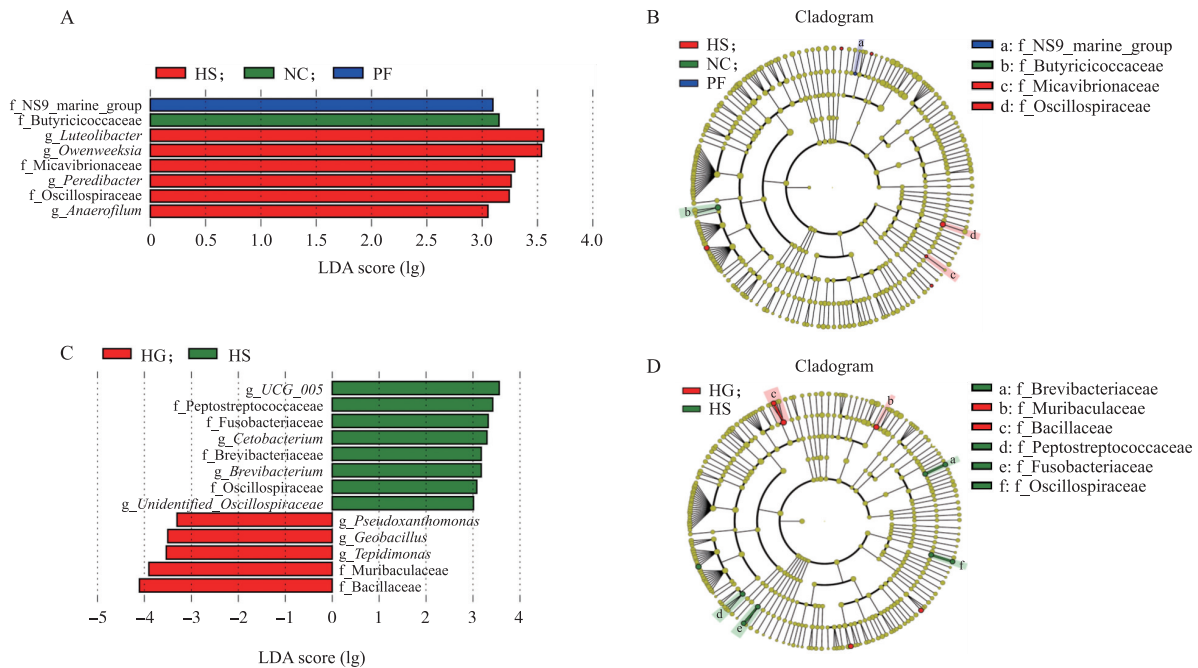


图 4 热暴露 7 d 盲肠微生物菌群在科和属水平上的 LEfSe 分析 (A、C) 和菌群的进化分支图 (B、D)

Fig. 4 LEfSe analysis of caecal microflora (A, C) and branch diagram of microbial community evolution (B, D) at the family and genus levels after 7 d of thermal exposure

红条表示类群富集于 HS 组、绿条表示类群富集于 NC 组、蓝条表示类群富集于 PF 组 (图 B); 红色表示类群富集于 HG 组, 绿条表示类群富集于 HS 组 (图 D)。下同。

Red bars indicate taxa were enrichment in HS group, green bars indicate taxa were enrichment in NC group, blue bars indicate taxa were enrichment in PF group (B). Red bars indicate taxa were enrichment in NG group, green bars indicate taxa were enrichment in NS group. The same below.

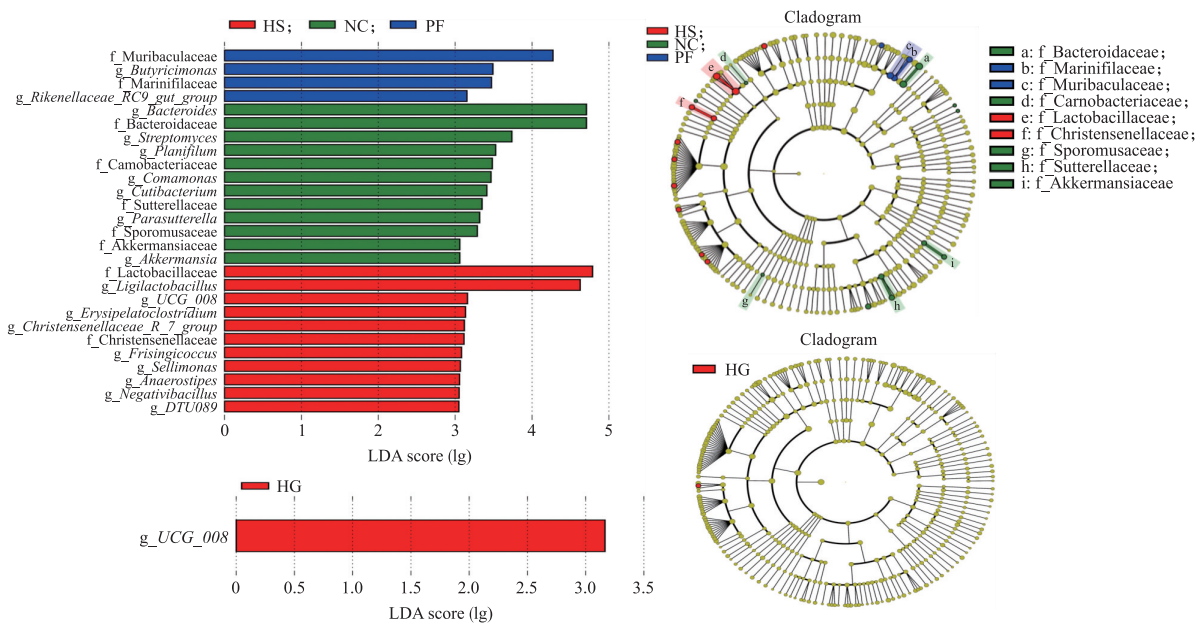


图 5 热暴露 14 d 盲肠微生物菌群在科和属水平上的 LEfSe 分析 (A、C) 和菌群的进化分支图 (B、D)

Fig. 5 LEfSe analysis of caecal microflora (A, C) and branch diagram of microbial community evolution (B, D) at the family and genus levels after 14 d of thermal exposure

## 2.2 慢性热应激对肉鸡盲肠菌群代谢的影响及日粮添加胍基乙酸作用效果

### 2.2.1 肉鸡盲肠菌群功能注释分析 由图 6 可知, 热暴露 7 d 后, NC 组、PF 组功能主要富集了外来体

(exosome)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism)、伴侣和折叠催化剂(chaperones and folding catalysts)、肽酶(peptidases)等;HS组主要功能富集了核糖体(ribosome)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、染色体和相关蛋白质(chromosome and associated proteins)、DNA复制蛋白质(DNA replication proteins)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)、线粒体生物发生(mitochondrial biogenesis)、氨酰 tRNA 生物合成(aminoacyl tRNA biosynthesis)、肽聚糖生物合成和降解蛋白(peptidoglycan biosynthesis and degradation proteins);HG组功能主要富集了二元系统(two component system)、ABC转运蛋白(ABC transporters)、细菌运动蛋白(bacterial motility proteins)、转运蛋白(transporters)。

热暴露 14 d 后,NC组主要功能富集了伴侣和折叠催化剂(chaperones and folding catalysts)、肽酶(peptidases)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、原核生物的碳固定途径(carbon fixation pathways in prokaryotes)等;PF组主要功能富集了淀粉与蔗糖的代谢(starch and sucrose metabolism)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、染色体和相关蛋白质(chromosome and associated proteins)、线粒体生物发生(mitochondrial biogenesis)、核糖体(ribosome)、氨酰 tRNA 生物合成(aminoacyl tRNA biosynthesis)、错配修复(mismatch repair)、嘌呤代谢(purine metabolism)、伴侣和折叠催化剂(chaperones and folding catalysts)、肽酶(peptidases)等;HS组主要功能富集了群体感应(quorum sensing)、转运蛋白(transporters)、二元组分系统(two component system)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)等;HG组注释功能主要富集了分泌系统(secretion system)、ABC转运蛋白(ABC transporters)、细菌运动蛋白(bacterial motility proteins)、丁酸酯代谢(butanoate metabolism)。

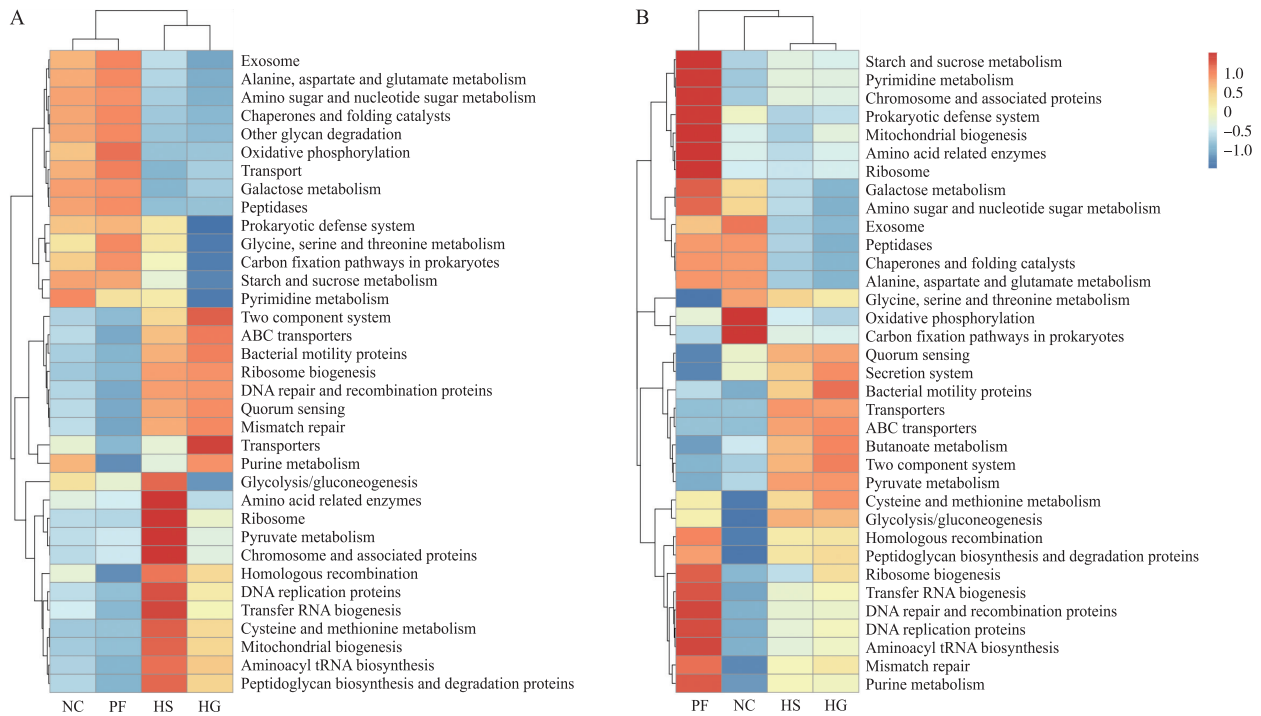


图 6 热暴露 7 d (A)、热暴露 14 d (B) 后不同处理的盲肠微生物菌群生物功能注释相对丰度

Fig. 6 The relative abundance of caecal microbial function annotation of broilers with different treatments after thermal exposure 7 d (A) and 14 d (B)

**2.2.2 慢性热应激对肉鸡盲肠食糜短链脂肪酸含量的影响及日粮添加胍基乙酸作用效果** 由图 7 可知:热暴露 7 d 后,相较于 NC 组和 PF 组,HS 组乙酸、丙酸含量显著升高( $P < 0.05$ );与 NC 组相比,HS 组丁酸含量显著降低( $P < 0.05$ ),而与 PF 组相比 HS 组丁酸含量又显著升高( $P < 0.05$ )。与 NC 组相比,PF 组丙酸、丁酸含量显著降低( $P < 0.05$ ),而乙酸含量无显著差异。相较于 HS 组,HG 组的丙酸含量显著降低( $P < 0.05$ )。热暴露 14 d 后,与 NC 组相比,HS 组乙酸含量显著升高,丙酸、丁酸含量显著降低( $P < 0.05$ )。相较于 PF 组,HS 组乙酸、丙酸、丁酸含量均显著升高( $P < 0.05$ )。与 NC 组相比,PF 组乙酸、丙酸、丁酸含量均显著降低( $P < 0.05$ )。相较于 HS 组,HG 组乙酸含量显著降低,丙酸、丁酸含量显著升高( $P < 0.05$ )。

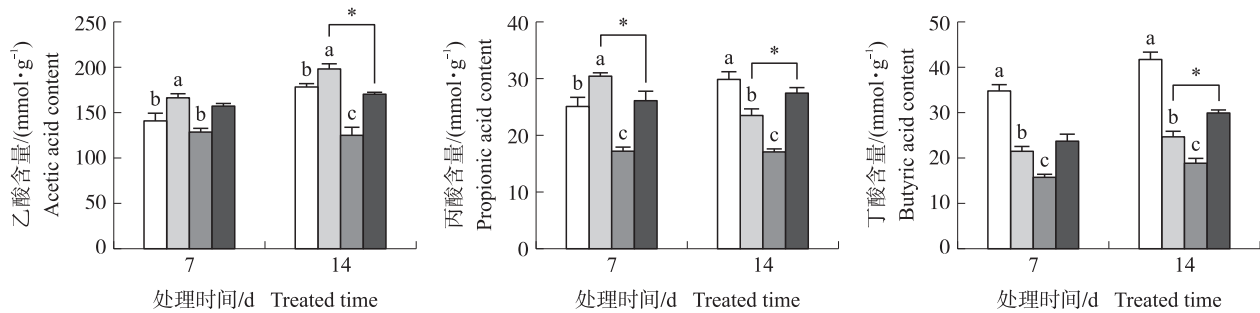


图7 不同热暴露处理的盲肠食糜乙酸、丙酸、丁酸含量

Fig. 7 The concentrations of acetic acid, propionic acid and butyric acid in cecum of broilers with thermal treatments

### 3 讨论

肉鸡盲肠微生物组成是一个复杂且庞大的生态系统,当微生物的组成及比例保持稳定时,它们会给宿主带来正面作用,如促进消化吸收、免疫发育等<sup>[15]</sup>。然而当热应激发生时,会诱导肠道微生物的紊乱。研究表明,热应激肉鸡小肠对营养物质消化吸收能力减弱,导致营养物质无法被完全消化吸收<sup>[16]</sup>,过剩的营养物质进入盲肠,被盲肠中的病原体代谢利用进而导致肠道内菌群动态平衡被打破<sup>[17]</sup>,肠道功能发生进一步紊乱。此外,研究发现热应激会提高部分有害菌的丰度,导致脂多糖等内毒素大量进入血液,引发全身炎症,并增加机体对病原体的易感性,最终会导致肉鸡的死亡<sup>[18]</sup>。本试验发现热暴露7 d后,HS组肉鸡的OTU比NC组OTU少92个,这与先前试验<sup>[19]</sup>所发现热应激会降低肠道微生物菌群丰度结果一致。HG组的OTU个数显著高于HS组,同时 *Geobacillus*、*Bacillaceae* 等有益菌在HG组相对丰度也较高。而热暴露7与14 d后,NC组与HS组之间PCoA聚类基本无交叉说明高温环境与常温环境间物种相似性小。但热暴露7 d后,PF组与NC组之间PCoA聚类交叉面积大于HS组与NC组,说明采食量的减少并不会显著改变其与常温组之间的物种相似性。HG组与NC组之间PCoA聚类也基本无交叉说明日粮中添加GAA并不会改变高温环境与常温环境中微生物相似性。而热暴露7 d后HG组与HS组之间PCoA聚类也基本无交叉,可能是因为日粮中添加了GAA导致肉鸡盲肠中部分有益微生物的相对丰度发生了改变。为了将PCoA聚类结果进行量化,本研究在门水平的菌群进行了统计学差异分析,发现热应激导致厚壁菌门相对丰度显著升高,拟杆菌门相对丰度显著降低。郝贺等<sup>[20]</sup>和朱海波<sup>[21]</sup>也在热应激肉鸡中观察到相似的结果。而拟杆菌门与厚壁菌门的相对丰度在NC组与PF组之间并无显著差异。以上结果说明,热应激会导致盲肠优势菌门的组成比例改变,而热应激诱导的采食量下降并不会改变这个比例。

为了进一步理解优势菌比例改变对肠道健康的影响,我们对盲肠内容物在科水平和属水平上进行了LEfSe分析。热暴露7 d后,相较于HS组、PF组,有益菌 *Butyricicoccaceae* 在NC组中相对丰度较高,与炎症相关的 *Oscillospiraceae*<sup>[22]</sup> 在HS组中相对丰度较高。而在HS组与HG组比较中,与各种耐热酶产生相关的 *Geobacillus*<sup>[23]</sup>、与抗炎相关的 *Bacillaceae*<sup>[24]</sup> 在HG组中相对丰度较高。随着热暴露时间的增加,与免疫应答相关的 *Erysipelatoclostridium*<sup>[25]</sup>、与宿主体重负相关的 *Christensenellaceae\_R-7\_group*<sup>[26]</sup> 在HS组中相对丰度较高,而 *Akkermansia*、*Parasutterella* 等有益菌在NC组中相对丰度较高,与SCFA产生相关的 *Butyricimonas* 在PF组中相对丰度较高。LEfSe分析发现在科和属水平上NC组、HS组、PF组之间丰度较高的菌科、菌属组成差异较大,并且与炎症、免疫应答相关的微生物均在HS组中相对丰度较高。此外,本研究还发现伴侣和折叠催化剂(chaperones and folding catalysts)功能和肽酶(peptidases)功能与NC组、PF组正相关而与HS组和HG组负相关,有研究表明伴侣和折叠催化剂功能与内稳态的调节有关<sup>[27]</sup>,肽酶有助于肠道营养物质的消化吸收。HG组与HS组相比,ABC transporters功能富集更显著,已有研究表明,ABC transporters起着跨细胞屏障的作用,能将代谢的化合物转运回肠腔,在保护机体免受日粮中有毒有害物质损害方面发挥着重要的作用<sup>[28]</sup>。

肠道菌群可以发酵膳食纤维中不可消化的碳水化合物,如抗性淀粉和可溶性低聚糖,产生有机酸、气体以及大量短链脂肪酸<sup>[29]</sup>。产生的短链脂肪酸是肠上皮细胞重要的能源物质,有助于宿主获取营养,也可以增强黏膜屏障功能,增强机体的免疫力<sup>[30]</sup>。前人研究发现,肠道中的乙酸、丙酸通过血液循环可以被运输至肝脏,参与机体的能量代谢。此外,肠道中的丁酸不仅是肠上皮细胞的主要能量来源,它还可以作

为组蛋白去乙酰化酶抑制剂,从而诱导黏膜 Treg 细胞的分化,产生白介素 10 以抑制肠道炎症的发生<sup>[31-33]</sup>,说明丁酸也有调节肠道炎症的作用。但在某些特定的情况下短链脂肪酸产量过高也会给机体带来不利影响,如能量调节失衡<sup>[34]</sup>和疾病的发生,一项在人类上的研究发现丙酸水平的升高和 II 型糖尿病发生风险增加显著相关<sup>[35]</sup>。目前,大部分研究都报道热应激会降低家禽食糜中短链脂肪酸的浓度<sup>[36-37]</sup>,但是也有少部分报道与这一结论相反,即热应激可能会增加家禽食糜中短链脂肪酸的浓度<sup>[38]</sup>。而本试验发现,相较于 NC 组和 PF 组,HS 组丁酸浓度显著下降,日粮中添加 GAA 则能显著提高盲肠食糜的丁酸浓度,表明在热应激肉鸡日粮中添加 GAA 能通过改变盲肠微生物相对丰度增强肠抗炎功能。

综上所述,慢性热应激可显著改变肉鸡盲肠微生物结构和代谢水平,造成肠道炎症相关微生物丰度升高,乙酸代谢增强,丁酸代谢、肽酶功能、伴侣和折叠催化剂功能减弱。日粮添加 GAA 可促进丁酸生成,减少乙酸生成,并提高与肠道抗炎功能相关微生物的相对丰度,可缓解慢性热应激引发的盲肠微生物结构和代谢紊乱。

#### 参考文献 References:

- [1] Comstock L E. Importance of glycans to the host-Bacteroides mutualism in the mammalian intestine[J]. *Cell Host & Microbe*,2009,5(6):522-526.
- [2] 何晓芳,张林,李蛟龙,等. 饲料中添加牛磺酸对慢性热应激肉鸡血清内分泌激素水平、下丘脑形态及食欲相关基因表达的影响[J]. *畜牧与兽医*,2022,449(12):24-30.  
He X F,Zhang L,Li J L, et al. Effects of dietary taurine supplementation on the serum endocrine hormone level, hypothalamus morphology, appetite-related genes expression in broilers under chronic heat stress[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*,2022,449(12):24-30 (in Chinese with English abstract).
- [3] Wang Z X, Shao D, Wu S, et al. Heat stress-induced intestinal barrier damage and dimethylglycine alleviates via improving the metabolism function of microbiota gut brain axis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,2022,244:114053.
- [4] Shi D Y, Bai L, Qu Q, et al. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers[J]. *Poultry Science*,2019,98(6):2405-2413.
- [5] Zhao S G, Min L, Zheng N, et al. Effect of heat stress on bacterial composition and metabolism in the rumen of lactating dairy cows[J]. *Animals*,2019,9(11):925.
- [6] Khajali F, Lemme A, Rademacher-Heilshorn M. Guanidinoacetic acid as a feed supplement for poultry[J]. *World's Poultry Science Journal*,2020,76(2):270-291.
- [7] DeGroot A A, Braun U, Dilger R N. Efficacy of guanidinoacetic acid on growth and muscle energy metabolism in broiler chicks receiving arginine-deficient diets[J]. *Poultry Science*,2018,97(3):890-900.
- [8] 司徒金水,王杰,高萍,等. 无动物性蛋白质饲料添加胍基乙酸对断奶仔猪生长性能和肠道屏障的影响[J]. *动物营养学报*,2020,32(6):2601-2610.  
Situ J S, Wang J, Gao P, et al. Effects of guanidinoacetic acid supplementation in no animal protein diet on growth performance and intestinal barrier of weaned piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*,2020,32(6):2601-2610(in Chinese with English abstract).
- [9] 李子平,田树飞,牛建东. 不同蛋白质水平日粮添加胍基乙酸对热应激肉鸡生长性能、应激指标及肠道形态的影响[J]. *中国饲料*,2020(4):59-63.  
Li Z P, Tian S F, Niu J D. Effects of additional of guanidylacetic acid in different protein levels diets on growth performance, stress index and intestinal morphology of broilers exposed to heat stress[J]. *China Feed*,2020(4):59-63(in Chinese with English abstract).
- [10] He X F, Lu Z, Ma B B, et al. Effects of chronic heat exposure on growth performance, intestinal epithelial histology, appetite-related hormones and genes expression in broilers[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,2018,98(12):4471-4478.
- [11] Peng X Y, Xing T, Li J L, et al. Guanidinoacetic acid supplementation improves intestinal morphology, mucosal barrier function of broilers subjected to chronic heat stress[J]. *Journal of Animal Science*,2023,101:skac355.
- [12] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*,2013,10:57-59.
- [13] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*,2010,7:335-336.
- [14] Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*,2016,4:e2584.
- [15] 周雪雁,李琼毅,丁功涛,等. 鸡肠道微生物菌群的建立发育、分布和生理学意义[J]. *微生物学报*,2020,60(4):641-652.  
Zhou X Y, Li Q Y, Ding G T, et al. Establishment, distribution and physiological significance of the intestinal microbiota in chicken[J]. *Acta Microbiologica Sinica*,2020,60(4):641-652(in Chinese with English abstract).
- [16] Morales A, Gómez T, Villalobos Y D, et al. Dietary protein-bound or free amino acids differently affect intestinal morphology, gene expression of amino acid transporters, and serum amino acids of pigs exposed to heat stress[J]. *Journal of Animal Science*,2020,98(3):skaa056.
- [17] Yu D F, Zhu W Y, Hang S Q. Effects of low-protein diet on the intestinal morphology, digestive enzyme activity, blood urea nitrogen, and gut

- microbiota and metabolites in weaned pigs[J]. Archives of Animal Nutrition,2019,73(4):287-305.
- [18] Brisbin J T,Gong J,Sharif S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken[J]. Animal Health Research Reviews,2008,9(1):101-110.
- [19] 李永洙,陈常秀,金泽林,等. 热应激环境下育成鸡肠道菌群多样性及黏膜结构的相关性分析[J]. 中国农业大学学报,2016,21(1):71-80. Li Y Z,Chen C X,Jin Z L, et al. Correlation analysis on adult chicken intestinal flora diversity and mucosal structure under heat stress environment[J]. Journal of China Agricultural University,2016,21(1):71-80(in Chinese with English abstract).
- [20] 郝贺,钟翠红,李欣泽,等. 发酵中药对热应激肉鸡肠道菌群结构的影响[J]. 河南农业科学,2021,50(9):135-142. Hao H,Zhong C H,Li X Z, et al. Effect of fermented traditional Chinese medicine on intestinal flora structure of broilers under heat stress[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2021,50(9):135-142(in Chinese with English abstract).
- [21] 朱海波. 慢性热应激对肉鸡肠道黏膜屏障功能的影响[D]. 邯郸:河北工程大学,2020. Zhu H B. Effects of chronic heat stress on intestinal mucosal barrier function in broilers[D]. Handan;Hebei University of Engineering,2020(in Chinese with English abstract).
- [22] Wang Y P,Jin T H,Zhang N B, et al. Effect of stocking density and age on physiological performance and dynamic gut bacterial and fungal communities in Langya hens[J]. Microbial Cell Factories,2021,20(1):218.
- [23] Shih T W,Pan T M. Stress responses of thermophilic *Geobacillus* sp. NTU 03 caused by heat and heat-induced stress[J]. Microbiological Research,2011,166(5):346-359.
- [24] 姜军坡,杜国霞,杜洁,等. 芽孢杆菌科来源脂肽的生物合成调控及其在动物生产中的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2022(11):26-31. Jiang J P,Du G X,Du J, et al. Biosynthesis regulation of Bacillaceae-derived lipopeptides and its application in animal production[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine,2022(11):26-31(in Chinese with English abstract).
- [25] Han G,Luong H,Vaishnava S. Low abundance members of the gut microbiome exhibit high immunogenicity[J]. Gut Microbes,2022,14(1):2104086.
- [26] Waters J L,Ley R E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread,heritable,and associated with health[J]. BMC Biology,2019,17(1):83.
- [27] Walker A,Schmitt-Kopplin P. The role of fecal sulfur metabolome in inflammatory bowel diseases[J]. International Journal of Medical Microbiology,2021,311(5):151513.
- [28] Domínguez C J,Tocchetti G N,Rigalli J P, et al. Acute regulation of apical ABC transporters in the gut. Potential influence on drug bioavailability[J]. Pharmacological Research,2021,163:105251.
- [29] Topping D L,Clifton P M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides[J]. Physiological Reviews,2001,81(3):1031-1064.
- [30] 王春敏,韩桂华,马淑霞. 短链脂肪酸对肠黏膜屏障的影响[J]. 中国微生态学杂志,2022,34(12):1471-1475. Wang C M,Han G H, Ma S X. Effects of short-chain fatty acids on intestinal mucosal barrier[J]. Chinese Journal of Microecology,2022,34(12):1471-1475(in Chinese with English abstract).
- [31] 张红娜,张钰婧,刘敬博. 基于肠道菌群/TLR4/NF- $\kappa$ B 路径探讨草甘膦导致肉鸡肠道炎症机制[J]. 东北农业大学学报,2023,54(8):46-54. Zhang H N,Zhang Y J,Liu J B. Disentangling mechanisms for glyphosate-induced intestinal inflammation in broilers via intestinal microbiota/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2023,54(8):46-54(in Chinese with English abstract).
- [32] Liu P Y,Wang Y B,Yang G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis[J]. Pharmacological Research,2021,165:105420.
- [33] Furusawa Y,Obata Y,Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. Nature,2013,504:446-450.
- [34] Serino M. SCFAs:the thin microbial metabolic line between good and bad[J]. Nature Reviews Endocrinology,2019,15:318-319.
- [35] Sanna S,van Zuydam N R,Mahajan A, et al. Causal relationships among the gut microbiome,short-chain fatty acids and metabolic diseases[J]. Nature Genetics,2019,51:600-605.
- [36] Park S O,Hwang B J,Ryu C M, et al. Effects of extreme heat stress and continuous lighting on growth performance and blood lipid in broiler chickens[J]. Journal of the Korean Oil Chemists Society,2013,30(1):78-87.
- [37] 王振鑫,邵丹,宋志刚,等. 热应激对家禽肠道微生物组成与功能的影响及其营养调控研究进展[J]. 中国家禽,2020,42(11):91-99. Wang Z X,Shao D,Song Z G, et al. Research progress on effects of heat stress on composition and function of poultry intestinal microbes and nutritional regulation[J]. China Poultry,2020,42(11):91-99(in Chinese with English abstract).
- [38] 王淑媛,卫佳丽,宋慧. 金针菇菌脚对热应激蛋鸡生长性能、HSP70 mRNA 表达和短链脂肪酸含量的影响[J]. 中国家禽,2018,40(9):24-29. Wang S Y,Wei J L,Song H. Effect of Flammulina velutipes stem base on growth performance,HSP70 mRNA expression and short chain fatty acid content in laying hens under heat stress[J]. China Poultry,2018,40(9):24-29(in Chinese with English abstract).