

复合噬菌体与枯草芽孢杆菌对肠道产气荚膜梭菌的抑制效果及免疫代谢功能

吴立婷^{1,2}, 黄偲偲^{1,2}, 张辉^{*2}, 余祖功^{*1}, 包红朵², 王永娟³

1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

2 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏 南京 210014

3 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300

吴立婷, 黄偲偲, 张辉, 余祖功, 包红朵, 王永娟. 复合噬菌体与枯草芽孢杆菌对肠道产气荚膜梭菌的抑制效果及免疫代谢功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 985-1001.

WU Liting, HUANG Sisi, ZHANG Hui, YU Zugong, BAO Hongduo, WANG Yongjuan. Compound and *Bacillus subtilis* inhibit intestinal *Clostridium perfringens* and improve immunometabolism of microbiota[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 985-1001.

摘要: 【背景】产气荚膜梭菌感染一直以来困扰着家禽养殖业, 限抗以来感染率呈上升趋势。生物源噬菌体以其独特的抑菌作用、安全无残留等优点, 已成为潜在的减抗关键技术之一。【目的】明确产气荚膜梭菌噬菌体、沙门氏菌噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对蛋鸡养殖的增效作用, 通过对肠道组织结构形态变化、产气荚膜梭菌消减和菌群多样性的分析, 为家禽减抗养殖中细菌性疾病防控提供有效的减抗技术方案。【方法】选取 105 只 260 日龄海兰褐蛋鸡, 随机分为 5 组: A: 产气荚膜梭菌噬菌体 SD72 组; B: 产气荚膜梭菌噬菌体 SD72&枯草芽孢杆菌联用组; C: 沙门氏菌噬菌体 JDF1-6 组; D: SD72/JDF1-6 复合噬菌体&枯草芽孢杆菌联用组; E: 空白对照组。连续饮水饲喂 42 d 后取盲肠内容物测定产气荚膜梭菌数量, 观察肠道组织结构, 通过 16S rRNA 基因扩增子测序分析明确肠道微生物的群落分布、多样性及代谢功能。【结果】与对照组相比, D 组 SD72/JDF1-6 复合噬菌体&枯草芽孢杆菌联用组肠道中产气荚膜梭菌的数量减少 1.48 log₁₀ (CFU/mL), 空肠隐窝深度显著降低($P<0.05$), 绒毛高度/隐窝深度显著增大($P<0.05$)。微生物多样性分析结果显示, 各组盲肠菌群中均以厚壁菌门和变形菌门为主, 在属水平上乳杆菌属(11.26%)相对丰度较高。血清免疫指标及代谢功能分析显示, IgA、IgG 和 IgM 的含量显著提高($P<0.05$), 肠道微生物基因主要富集于 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 的遗传信息处理通路, 其中 D 组在排泄系统和免疫疾病

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFE0101900); 江苏省重点研发计划(BE2022361); 亚夫科技服务项目[KF(23)1216]; 江苏省科技计划专项(BZ2023004)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0101900), the Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2022361), the Yaf Technology Service Project [KF(23)1216], and the Science and Technology Plan Special Project of Jiangsu Province (BZ2023004).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Hui, Huiz@jaas.ac.cn; YU Zugong, yuzugong@njau.edu.cn

Received: 2023-07-27; Accepted: 2023-08-25; Published online: 2023-12-12

代谢相关通路中富集基因相对丰度高于对照组 755.95%。【结论】复合噬菌体和枯草芽孢杆菌联用能够有效改善蛋鸡肠道健康,提高机体免疫水平,促进微生物组免疫疾病代谢相关基因表达,提高肠道菌群代谢功能,为家禽减抗健康养殖中细菌性疾病的防控提供重要的理论依据和生物资源。

关键词: 蛋鸡; 噬菌体; 枯草芽孢杆菌; 产气荚膜梭菌; 肠道菌群

Compound and *Bacillus subtilis* inhibit intestinal *Clostridium perfringens* and improve immunometabolism of microbiota

WU Liting^{1,2}, HUANG Sisi^{1,2}, ZHANG Hui^{*2}, YU Zugong^{*1}, BAO Hongduo²,
WANG Yongjuan³

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology, Institute of Food Safe and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

3 Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Clostridium perfringens* has been a major pathogen affecting the poultry industry, and its infection rate has been on the rise since the use of antibiotics was restricted. Bacteriophages with unique antibacterial effects and safety without residues have become a primary approach to reduce the use of antibiotics. [Objective] To evaluate the synergistic effects of *Clostridium perfringens* phage, *Salmonella* phage, and *Bacillus subtilis* on laying hens by analyzing the histological changes of the intestinal structure, the reduction of *C. perfringens*, and microbial diversity, so as to provide a scheme for the prevention and control of bacterial diseases in poultry with antibiotic reduction. [Methods] A total of 105 260-day-old Hyline Brown hens were selected and randomized into 5 groups of A: *Clostridium perfringens* phage SD72, B: SD72+*Bacillus subtilis*, C: *Salmonella* phage JDF1-6, D: SD72+JDF1-6+*Bacillus subtilis*, and E: blank control. After the hens were treated for 42 days, the cecum contents were collected to determine the number of *C. perfringens*, and the intestinal structure was observed. The 16S rRNA gene amplicon was sequenced to reveal the intestinal microbial community structure, diversity, and metabolism. [Results] Compared with the blank control group, D group showed decreased number of *C. perfringens* (by 1.48 log₁₀ (CFU/mL)), decreased depth of jejunal crypts ($P<0.05$), and increased villus height/crypt depth ($P<0.05$). *Firmicutes* and *Proteobacteria* were dominant in cecum contents of laying hens in all the treatment groups after drinking water, and *Lactobacillus* (11.26%) had higher relative abundance at the genus level. The serum levels of IgA, IgG, and IgM were significantly increased ($P<0.05$), and intestinal microbial genes were mainly enriched in the genetic information processing pathways. The abundance of enriched genes in excretory system and immune disease-related pathways in group D was 755.95% higher than that in the blank control group. [Conclusion] The combination of mixed phages and *B. subtilis* could improve the intestinal health and immunity of laying hens by promoting the expression of microbial genes

related to immune disease and improving the immunometabolism of intestinal flora. The findings provide a theoretical basis and biological resources for the prevention and control of bacterial diseases in poultry with reduced antibiotics.

Keywords: laying hens; phage; *Bacillus subtilis*; *Clostridium perfringens*; intestinal flora

我国是家禽生产和消费大国,规模化养殖发展迅速且已成为农业增效、农民创收的重要渠道。然而,蛋鸡肠道细菌性疾病坏死性肠炎(necrotic enteritis, NE)一直都是困扰规模化养殖的重大难题,给蛋鸡养殖造成巨大经济损失^[1]。产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, Cp)是引起NE的主要病原菌,其中以A型和C型为主要流行优势菌株。Cp普遍存在于粪便、土壤、灰尘及污染的饲料、饮水和垫料中,当环境条件改变,其繁殖速度加快,极易诱发NE^[1-3]。研究显示,95%的鸡肠道均有Cp定殖^[4-5],一旦成为优势菌群感染鸡群,临床主要表现为精神萎靡,采食量下降5%–25%,产蛋率下降5%–15%^[6]且出现不同程度的死亡。作为肠道病原的沙门氏菌(*Salmonella*, Sa),一直被中大型畜禽养殖场作为主要病原菌进行净化,虽然有一定防控效果,但其仍会与Cp混合感染,使NE的防治更加复杂,难度加剧^[7]。在食品安全背景下,中小型养殖场积极采用微生态制剂、中药、植物提取物等防控手段^[7-11]防治NE,但效果仍不理想,部分养殖场治疗用药还存在一定幅度的增长。因此,禽养殖业亟需效果好、副作用低和性价比高的系统减抗方案。

噬菌体与抗生素杀灭细菌的作用机制完全不同,具有高效抑菌、无残留及不易产生耐药性等优点^[12]。噬菌体在动物肠道能够杀灭特定病原菌但不会破坏肠道正常菌群,且能够随病原菌的消除而排出体外。此外,噬菌体还具有生产成本低、无化学污染和开发周期短等优点^[13]。噬菌体不仅可以抑菌还能调节肠道,与益生菌联合应用能够调节蛋鸡肠道菌群的组成,改善

肠道健康。枯草芽孢杆菌早在2016年就被欧盟批准为商品化益生菌产品,用于家禽NE的防治^[14-15]。本研究针对蛋鸡养殖中病原菌感染复杂、Cp防控难等问题,将Cp噬菌体、Sa噬菌体及枯草芽孢杆菌联用,以期对蛋鸡肠道中Cp进行消减,重塑肠道微生物群,增强其免疫疾病代谢功能,提高蛋鸡肠道健康和抗病能力,建立蛋鸡养殖中的提质增效减抗新模式。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

260日龄海兰褐蛋鸡,江苏省农业科学院实验动物伦理委员会批准号为SYXK(苏)2020-0024,购自江苏立华牧业有限公司;Cp噬菌体vB_CpeS_SD72(简称SD72)(宿主菌为标准菌株CMCC 64722,NCBI登录号为MW815121)^[16]、Sa噬菌体JDF1-6(宿主菌为肠炎沙门氏菌S1-6)按国标方法(NY/T 4146—2022)^[17]分离自蛋鸡养殖场粪样并鉴定;两株枯草芽孢杆菌ba-1和ba-2参考GB/T 26428—2010进行分离鉴定^[18],均来源于生产饲料添加剂公司提供的产品中,经公司验证有助于改善鸡肠道健康;Cp参考菌株CMCC 64722购于国家菌种保藏中心,所有试验用分离菌株保存于江苏省食品安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地。

1.1.2 培养基

LB培养基用于细菌培养;胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸(tryptose sulfite cycloserine, TSC)琼脂培养基用于产气荚膜梭菌平板培养^[16];硫乙醇酸盐培养基用于产气荚膜梭菌噬菌体培养^[16]。

1.1.3 主要试剂和仪器

苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE), 北京百奥莱博科技有限公司; 粪便 DNA 提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; ELISA 试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司; *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, 上海赛默飞有限公司; TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit, 因美纳(中国)科学器材有限公司; 引物由南京派森诺基因科技有限公司合成。Microplate reader, 伯腾仪器有限公司; 电子显微镜, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌及噬菌体培养

接种-80 °C冻存的枯草芽孢杆菌 ba-1 及 ba-2 菌液于 LB 液体培养基中, 37 °C静置培养 18 h,再以 1% (体积分数)接种量接种至新鲜 LB 液体培养基中, 37 °C静置培养 18 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤 3 次并重悬至 1.0×10^8 CFU/mL, 4 °C保存备用。

将 Cp 菌株 CMCC 64722 接种于胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸(TSC)琼脂培养基, 40 °C培养 18 h, 再用硫乙醇酸盐液体培养基在 40 °C静置培养 12 h, 使其 OD_{600} 达到 0.6 (约 1.0×10^7 CFU/mL), 将菌液与 vB_CpeS_SD72 噬菌体原液以 1:1 混合, 加适量新鲜硫乙醇酸盐液体培养基, 置于 37 °C

厌氧箱中静置过夜。次日, 取混合培养物, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清用 0.22 μ m 滤头过滤, 获得噬菌体裂解液(约 1.0×10^{10} PFU/mL)。

将鸡肠炎沙门氏菌 S1-6 接种于 LB 肉汤中, 37 °C恒温静置培养 18 h。当 OD_{600} 为 0.6 (约 1.0×10^7 CFU/mL)时吸取 100 μ L 菌液与 JDF1-6 噬菌体原液按照体积比 1:1 混合, 加入适量 LB 液体培养基, 37 °C恒温静置培养 18 h。取噬菌体培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 膜过滤, 获得约 2.0×10^{10} PFU/mL Sa 噬菌体液。

1.2.2 实验动物分组及饲料组成

将 105 只健康且体重和产蛋率相近的 260 日龄海兰褐蛋鸡随机分成 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 7 只, 试验期为 42 d, 试验分组见表 1。

A-D 处理组按照噬菌体或枯草芽孢杆菌与水的体积比为 1:100 添加在 100 mL 容量的饮水器中, 饮用水中噬菌体(SD72, JDF1-6)和枯草芽孢杆菌 ba-1、ba-2 终浓度分别稀释至约 1.0×10^8 PFU/mL 和 1.0×10^8 CFU/mL, 其中联用组将噬菌体及枯草芽孢杆菌混合在饮水中, 2 h 内饮用完毕。

试验基础日粮配制参照《鸡饲养标准》(NY/T 33—2004)^[1]和营养标准配制, 组成及营养水平见表 2, 每日观察试验蛋鸡活动情况及死淘率。

表 1 复合噬菌体与枯草芽孢杆菌饲喂蛋鸡试验分组

Table 1 Test group of compound phage with *Bacillus subtilis* fed layer hens

分组 Group	1-14 d	14-33 d	33-42 d	噬菌体及益生菌的饲喂浓度 Feeding concentrations of phages and probiotics	饲料 Fodder
A	A1	A2	A3	SD72 phage (1.0×10^8 PFU/mL)	饲喂基础
B	B1	B2	B3	SD72 phage (1.0×10^8 PFU/mL) & <i>Bacillus subtilis</i> ba-1, ba-2 (1.0×10^8 CFU/mL)	日粮(粉料)
C	C1	C2	C3	JDF1-6 phage (1.0×10^8 PFU/mL)	Feed basal diet
D	D1	D2	D3	SD72, JDF1-6 phage (1.0×10^8 PFU/mL) & <i>Bacillus subtilis</i> ba-1, ba-2 (1.0×10^8 CFU/mL)	(powder lot)
E	E1	E2	E3	Blank control, feed water	

表 2 基础日粮组成及营养水平

Table 2 Composition and nutrient levels of basal diet

成分 Component	含量 Content (%)
玉米 Corn	62.70
豆粕 Soybean meal	20.00
麸皮 Bran	4.00
食盐 Salt	0.30
石粉 Limestone	8.00
磷酸氢钙 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00
预混料 Premix	3.00
植物油 Vegetable oil	1.00
代谢能 Metabolic energy (MJ/kg)	11.66
粗蛋白质 Crude protein	17.21
钙 Calcium	3.95
有效磷 Available phosphorus	0.41
蛋氨酸 Methionine	0.37
蛋氨酸+胱氨酸 Methionine+Cystine	0.65
赖氨酸 Lysine	0.95

预混料可为每千克全价日粮提供: 维生素 A 9 000 IU, 维生素 D3 1 600 IU, 维生素 E 5.00 IU, 维生素 K 0.50 mg, 维生素 B1 0.60 mg, 维生素 B2 3.50 mg, 泛酸 3.20 mg, 烟酸 20 mg, 维生素 B6 3.00 mg, 生物素 0.10 mg, 叶酸 0.25 mg, 维生素 B12 4 μg , 锌 70.00 mg, 铁 65.00 mg, 铜 7.00 mg, 锰 60.00 mg, 碘 0.65 mg, 硒 0.35 mg; 除粗蛋白质外, 其他营养成分为计算值

Premixes supply the following components, per kilogram of diet: Vitamin A 9 000 IU, vitamin D3 1 600 IU, vitamin E 5.00 IU, vitamin K 0.50 mg, vitamin B1 0.60 mg, vitamin B2 3.50 mg, pantothenic acid 3.20 mg, nicotinamide 20 mg, vitamin B6 3.00 mg, biotin 0.10 mg, folic acid 0.25 mg, vitamin B12 4 μg , zinc 70.00 mg, iron 65.00 mg, copper 7.00 mg, manganese 60.00 mg, iodine 0.65 mg, and selenium 0.35 mg; Except crude protein, other nutrients are calculated values.

1.3 样品采集和指标测定

1.3.1 肠道 Cp 的载量测定

分别于饮水饲喂后第 14、33 和 42 天, 屠宰蛋鸡并取盲肠内容物(约 0.5 g)于 10 mL 灭菌离心管中, 加入无菌生理盐水, 进行 10^{-1} – 10^{-3} 倍比稀释, 每个稀释度 3 个重复, 倾注到 TSC 平板上, 40 °C 厌氧培养 18 h 后进行 Cp 计数。细菌

数量以每毫升肠道内容物所含细菌总数的对数值 \log_{10} (CFU/mL) 表示。

1.3.2 肠道结构形态测定

饮水饲喂第 42 天后每组每个重复随机选取 5 只, 屠宰后快速取出十二指肠、空肠、回肠相同部位约 5 cm 肠段, 用灭菌的生理盐水冲洗后置于 10% 福尔马林溶液中固定, 4 °C 避光保存。经过组织脱水、透明和浸蜡包埋, 切片后制作石蜡切片并通过苏木素-伊红(HE)染色, 树胶封片, 用于小肠形态组织的观察。采用电子显微镜 100 \times 观察, 利用显微微尺测量绒毛长度(V)、隐窝深度(C)并计算 V/C 比值。

1.3.3 肠道菌群多样性分析

用磁珠法土壤&粪便基因组 DNA 抽取试剂盒提取盲肠内容物(每组随机选取 3 个样品) DNA 作为 PCR 模板, 采用 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区特异性上、下游引物 341F (5'-CCTACGGG NGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGG TATCTAATCC-3')^[19], 以及 *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增^[19], 严格控制扩增循环数, 保证同一批样本的扩增条件一致, 设置阴性对照。根据 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 的荧光定量检测实验结果, 通过 Microplate reader 对扩增回收产物进行荧光定量, 利用 Illumina MiSeq 平台进行双端高通量测序。

1.3.4 免疫指标测定

在试验第 42 天采集蛋鸡静脉血, 对照组及试验组每组每个重复随机选取 5 只, 翅下静脉采血 2 mL/只, 静置分层, 待血清析出后吸取上层血清于离心管中, 4 000 r/min 离心 8 min, 将上清液分装在离心管中, -20 °C 保存。采用上海酶联生物科技有限公司生产的 ELISA 试剂盒测定血清中 IgA、IgG 和 IgM 等指标。

1.3.5 生物学信息分析及数据处理

采用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库。按照 Vsearch 软件的分析流

程进行序列拼接和质控。根据测序公司进行标准化处理的样本 OTU 及物种注释信息, 利用 QIIME v1.9.1 平台、Ramer-Douglas-Peucker (RDP) 贝叶斯算法, 以 97% 的相似性划分 OTU 序列, 与 Greengene 数据库 v13.8 中序列比对以获得每个 OTU 所对应的物种分类信息, 如界、门、纲、目、科、属和种。通过 QIIME2 2019.4 软件计算各样本在不同测序深度时的微生物 α 和 β 多样性指数, 包括 Shannon 指数、物种累计曲线。基于 Bray-Curtis 距离算法, 用主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)比较两处理间群落组成的相似性。利用预测样本功能丰度的 PICRUST2 软件分析 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)数据库。

1.3.6 统计与分析

采用软件 GraphPad Prism 9.0.0 进行分析并作图, 肠道切片数据采用软件 SPSS 22.0 进行单因素方差分析, 结果以“平均值 \pm 标准差”表示, 差异显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 复合噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对蛋鸡肠道 Cp、Sa 载菌量的影响

将 14 d (A1、B1、C1 和 D1)、33 d (A2、B2、C2 和 D2) 和 42 d (A3、B3、C3 和 D3) (表 1) 的蛋鸡盲肠内容物进行 Cp 菌落计数, 如图 1 所示, 14、33 和 42 d 的 A、B、C 和 D 处理组中 Cp 菌落数均低于对照组, 其中 A、B 和 D 组差异显著 ($P < 0.05$), 分别降低 1.15、1.31 和 1.48 \log_{10} (CFU/mL)。与对照组及 A、B 和 C 组相比较, 处理组 D (SD72、JDF1-6 噬菌体 & 枯草芽孢杆菌) 的肠道 Cp 载量最低 (图 1)。饮用 14 d 时, A、B 和 D 处理组的 Cp 菌落数已降至 4.84、4.90 和 4.42 \log_{10} (CFU/mL), 33 d 时降低至 4.82、4.50 和 4.37 \log_{10} (CFU/mL), 42 d 时减少

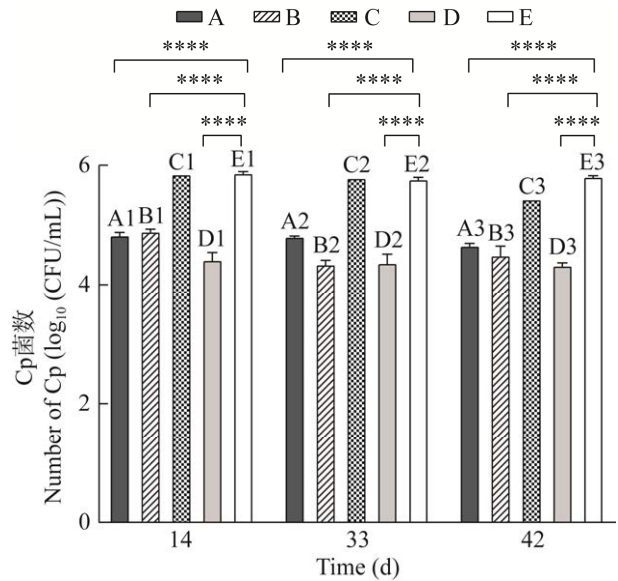


图 1 海兰褐蛋鸡不同组及时间段盲肠 Cp 载量的测定 A: SD72 噬菌体 (1.0×10^8 PFU/mL). B: SD72 噬菌体 (1.0×10^8 PFU/mL) & 枯草芽孢杆菌 (1.0×10^8 CFU/mL) 联用. C: JDF1-6 噬菌体 (1.0×10^8 PFU/mL). D: SD72/JDF1-6 噬菌体 (1.0×10^8 PFU/mL) & 枯草芽孢杆菌 (1.0×10^8 CFU/mL). E: 空白对照组. 下同

Figure 1 Determination of Cp load in caecum of Hyline Brown hens in different groups and time periods. A: SD72 phage (1.0×10^8 PFU/mL). B: SD72 phage (1.0×10^8 PFU/mL) & *Bacillus subtilis* (1.0×10^8 CFU/mL). C: JDF1-6 phage (1.0×10^8 PFU/mL). D: SD72/JDF1-6 phage (1.0×10^8 PFU/mL) & *Bacillus subtilis* (1.0×10^8 CFU/mL). E: Control group. ****: $P < 0.0001$. The same below.

至 4.66、4.35 和 4.33 \log_{10} (CFU/mL)。由此可见, 42 d 时的 A、B 和 D 减菌效果最佳且伴随饲喂时间呈现下降趋势, 表明单独使用 Cp 噬菌体或联合应用都能够持续抑菌。由图 1 可知, 与对照组 E 相比, 各组减菌效果依次为 D>B>A>C, 表明枯草芽孢杆菌及 Cp 噬菌体联合应用抑制 Cp 效果最佳。由图 2 可知, 与对照组相比, 14、33 和 42 d 各处理组 Sa 载菌量均有降低且减菌数呈现 D>C>B>A 趋势。饮用 42 d

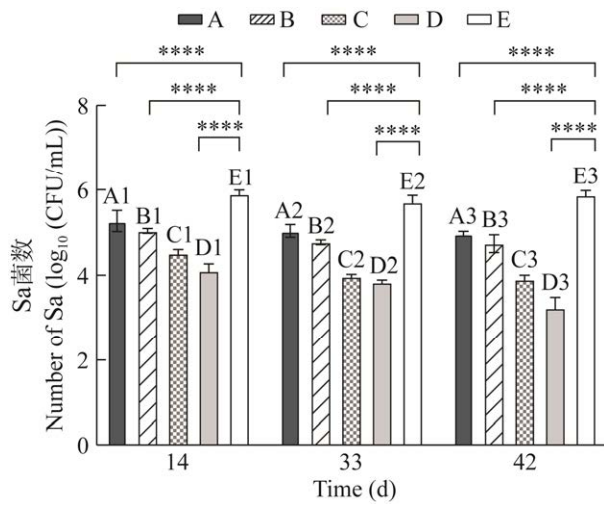


图2 海兰褐蛋鸡不同组及时间段盲肠 Sa 载量的测定

Figure 2 Determination of Sa load in caecum of Hyline Brown hens in different groups and time periods.

时沙门氏菌减少至 4.66、4.35、4.18 和 3.98 log₁₀(CFU/mL), 说明添加产气荚膜梭菌噬菌体不仅能够减少蛋鸡肠道内 Cp 还能够有效

降低 Sa 的载菌量。

2.2 复合噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对蛋鸡肠道形态结构的影响

由表 3 可知, 相较于空白对照 E 组, A、B、C 和 D 组十二指肠、空肠和回肠绒毛高度大部分显著性升高 ($P<0.05$), 隐窝深度显著降低 ($P<0.05$), 绒毛高度/隐窝深度显著增大 ($P<0.05$), 其中 D 处理组十二指肠和回肠的绒毛高度分别升高 12% 和 12.35%, 十二指肠和空肠的隐窝深度分别降低 12.69% 和 6.63%, 十二指肠、空肠和回肠的绒毛高度/隐窝深度提高 24.72%、24.17% 和 34.44%, 表明 Cp 噬菌体饮水饲喂能够降低隐窝深度, 提高绒毛比。连续饮用 42 d, 十二指肠和回肠的绒毛高度/隐窝深度 (V/C) 分析表明, 复合噬菌体 & 枯草芽孢杆菌联用组与其他组别相比较, 肠道绒毛完整度最高, 结构清晰, 方向一致, 排列整齐, 长短均一, 无倒毛现象, 即 D 组肠道形态最佳, 肠道最健康 (图 3)。

表 3 复合噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对海兰褐蛋鸡鸡肠道形态结构的影响

Table 3 Effect of compound phage and *Bacillus subtilis* on the intestinal morphology and structure of Hyline Brown hens

组织	项目	A	B	C	D	E
Tissue	Item					
十二指肠 Duodenum	绒毛高度 Villus height (V)	1 333.33±341.52ab	1 380.00±111.36ab	1 373.33±66.58ab	1 456.67±92.92a	1 300.00±121.24b
	隐窝深度 Crypt depth (C)	224.33±31.39a	213.00±56.11a	203.33±70.95ab	197.33±60.39b	226.00±57.16a
	V/C	7.07±0.51ab	7.88±1.32a	6.56±0.47b	7.92±0.49a	6.35±0.63b
	空肠 Jejunum	绒毛高度 Villus height (V)	1 390.00±122.88a	1 306.67±165.03b	1 346.67±68.07b	1 400.00±150.21a
空肠 Jejunum	隐窝深度 Crypt depth (C)	140.67±10.21a	138.67±10.65ab	137.67±16.73ab	131.67±10.97b	141.00±3.61a
	V/C	6.84±1.75b	7.95±2.32a	7.20±1.86ab	7.81±1.43a	6.29±1.99c
	回肠 Ileum	绒毛高度 Villus height (V)	1 036.33±47.65c	937.33±48.60c	1 216.67±77.67b	1 355.67±84.33a
回肠 Ileum	隐窝深度 Crypt depth (C)	125.33±19.92a	129.67±10.27a	132.67±29.74a	105.33±11.09b	108.67±13.58b
	V/C	6.30±0.43b	7.56±0.94a	6.28±0.27b	8.12±1.53a	6.04±0.73b

同行数据不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$). 下同

Values with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

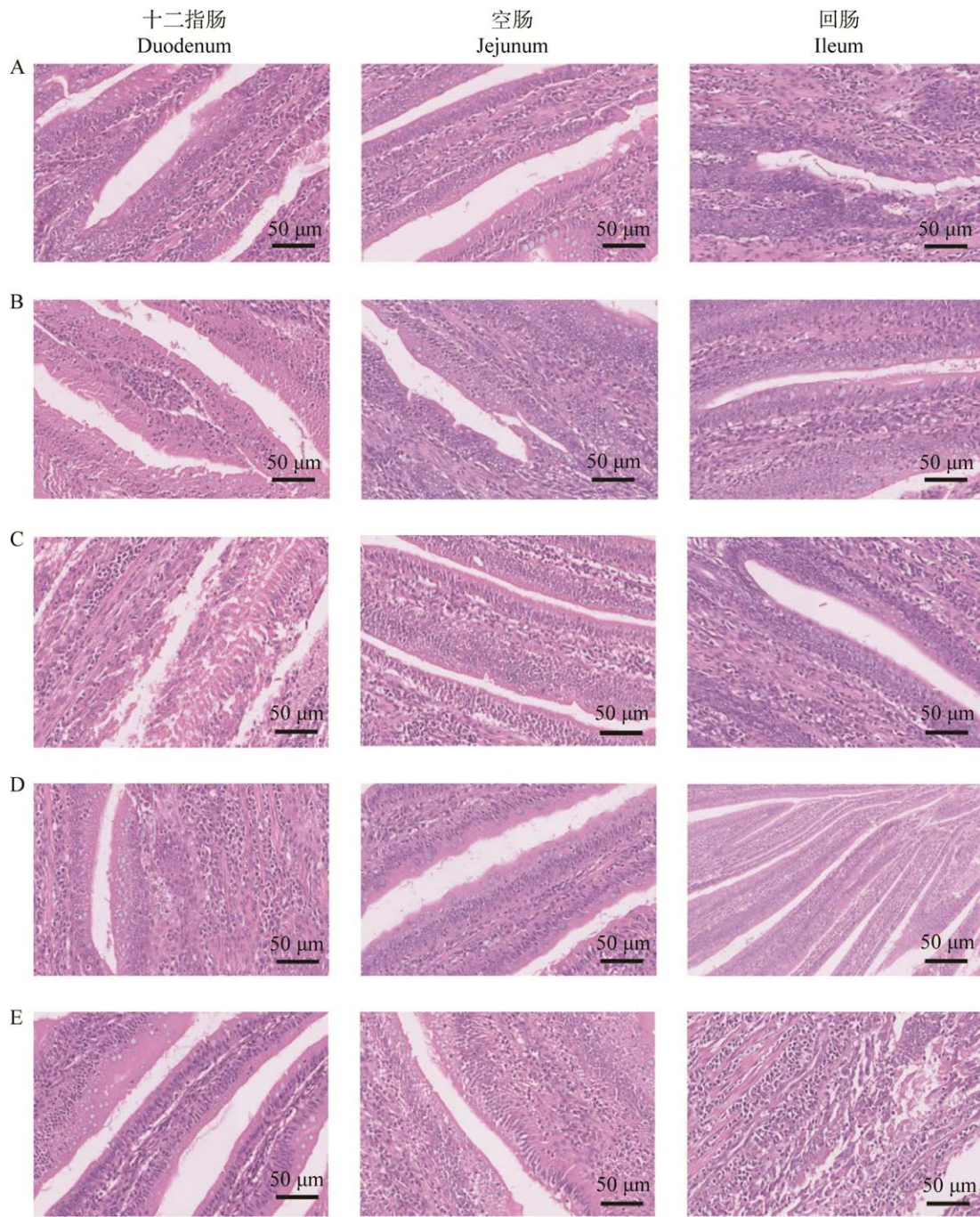


图3 海兰褐蛋鸡十二指肠、空肠和回肠组织形态变化(100×) A: SD72 噬菌体(1.0×10^8 PFU/mL). B: SD72 噬菌体(1.0×10^8 PFU/mL) & 枯草芽孢杆菌(1.0×10^8 CFU/mL)联用. C: JDF1-6 噬菌体(1.0×10^8 PFU/mL). D: SD72/JDF1-6 噬菌体(1.0×10^8 PFU/mL) & 枯草芽孢杆菌(1.0×10^8 CFU/mL). E: 空白对照组

Figure 3 Morphological changes of duodenum, jejunum, and ileum in Hyline Brown hens (100×). A: SD72 phage (1.0×10^8 PFU/mL). B: SD72 phage (1.0×10^8 PFU/mL) & *Bacillus subtilis* (1.0×10^8 CFU/mL). C: JDF1-6 phage (1.0×10^8 PFU/mL). D: SD72/JDF1-6 phage (1.0×10^8 PFU/mL) & *Bacillus subtilis* (1.0×10^8 CFU/mL). E: Control group.

2.3 复合噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对蛋鸡血清免疫指标的影响

由表 4 可知, 与对照组(E)相比, 复合噬菌体&枯草芽孢杆菌联用组(D)、产气荚膜梭菌噬菌体&枯草芽孢杆菌联用组(B)及产气荚膜梭菌噬菌体组(A)能够依次显著提高 42 d 海兰褐蛋鸡血清中 IgA 含量($P<0.05$), 而 JDF1-6 沙门噬菌体组(C)无显著效果; IgM 免疫指标显示 $A<C<B<D$, D 组 IgM 水平提高极显著($P<0.01$); IgG 测试水平较高, D 组效果显著($P<0.05$)。可以判断复合噬菌体添加用于提升海兰褐蛋鸡血液免疫效果有一定效果。

2.4 复合噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对蛋鸡肠道菌群多样性分析

根据图 4 物种累积曲线分析 α 指数, 显示随着序列数的增加, 物种累计曲线趋于平缓, 表明测序数据量满足分析需要, 可保证数据分析的可靠性; Shannon 指数(图 5)显示, 14 d A1、D1 组和 33 d A2、D2 组物种多样性低于 42 d 组 A3-E3, 各组之间在物种多样性差异显著($P<0.05$), A3、D3 组在 42 d 的菌群相对丰度最高, 而对照组 E (14-42 d)菌群多样性丰度较低。

分析 β 多样性, 根据主坐标(principal co-ordinates analysis, PCoA)分析肠道菌群的组成及变化, 基

表 4 复合噬菌体及枯草芽孢杆菌联用对蛋鸡血清免疫指标的影响

Table 4 Effect of compound phage and *Bacillus subtilis* on serum immune indexes of laying hens

Index	IgA	IgM	IgG
A	1.86±0.06a	7.12±0.14b	1.20±0.02b
B	1.87±0.06a	7.38±0.03a	1.11±0.04b
C	1.28±0.06b	7.23±0.06b	1.26±0.15b
D	1.99±0.08a	8.42±0.13a	1.28±0.03a
E	1.28±0.07b	6.85±0.14b	1.13±0.03b

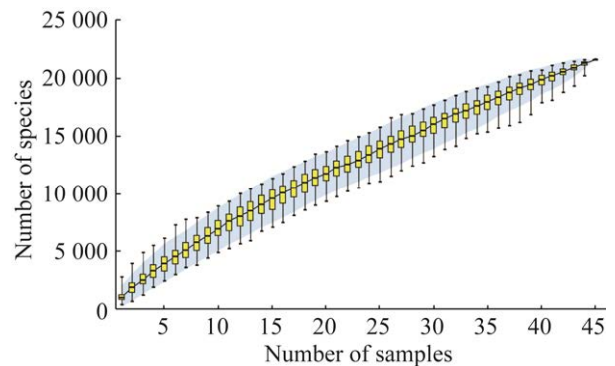


图 4 肠道微生物菌种累积曲线图

Figure 4 Cumulative graph of intestinal microorganisms.

于 Bray-Curtis 算法, 图 6 和图 7 中每个图形代表一个样品, 颜色相同的图形属于同一组, 图形之间距离越近, 表明两个样品微生物群落差异越小。如图 6 和图 7 所示, 14 d A1-E1 组、33 d A2-E2 组与 42 d A3-E3 组在主坐标分析

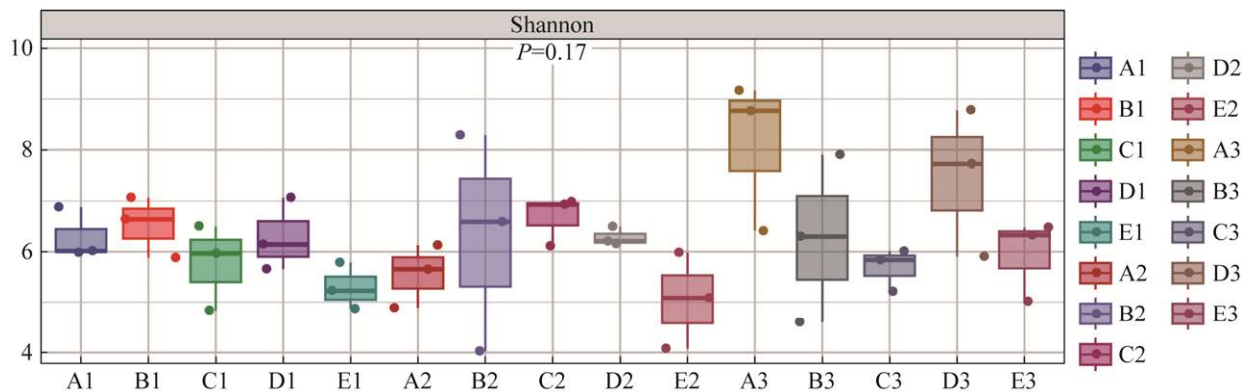


图 5 肠道微生物 Shannon 指数箱线图

Figure 5 Box diagram of Shannon index of intestinal microorganisms.

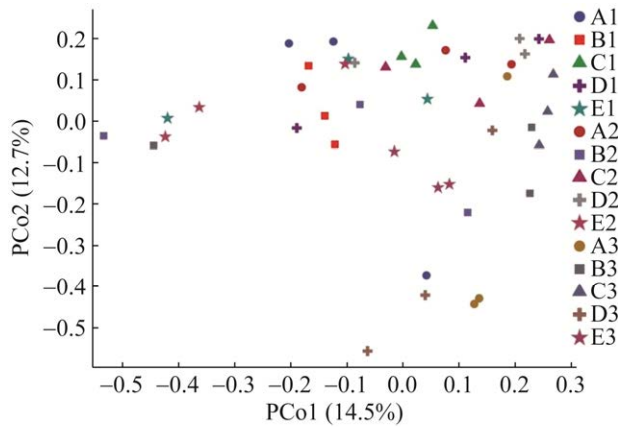


图 6 肠道微生物 Bray-Curtis PCoA 图
Figure 6 Bray-Curtis PCoA figure of intestinal microorganisms.

(PCoA)图中距离较远;表明随着时间的变化,样品之间的距离逐渐分开,蛋鸡盲肠肠道菌群组成产生了改变,具有一定差异性;但在一定的程度上不同样品之间又存在着聚集,表明菌群多样性始终有着一定的相似性。

分析门水平上的物种丰度,选取门水平上丰度最高的 10 个物种分类,如图 8 所示,蛋鸡盲肠内容物菌群中优势菌群为厚壁菌门(*Firmicutes*, 55.24%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 32.94%)、拟杆菌门(*Bacteroidota*, 8.95%)和梭杆菌门(*Fusobacteria*, 1.31%),其中厚壁菌门占绝对优势。螺旋体门(*Spirochaetes*)和 WPS-2 门

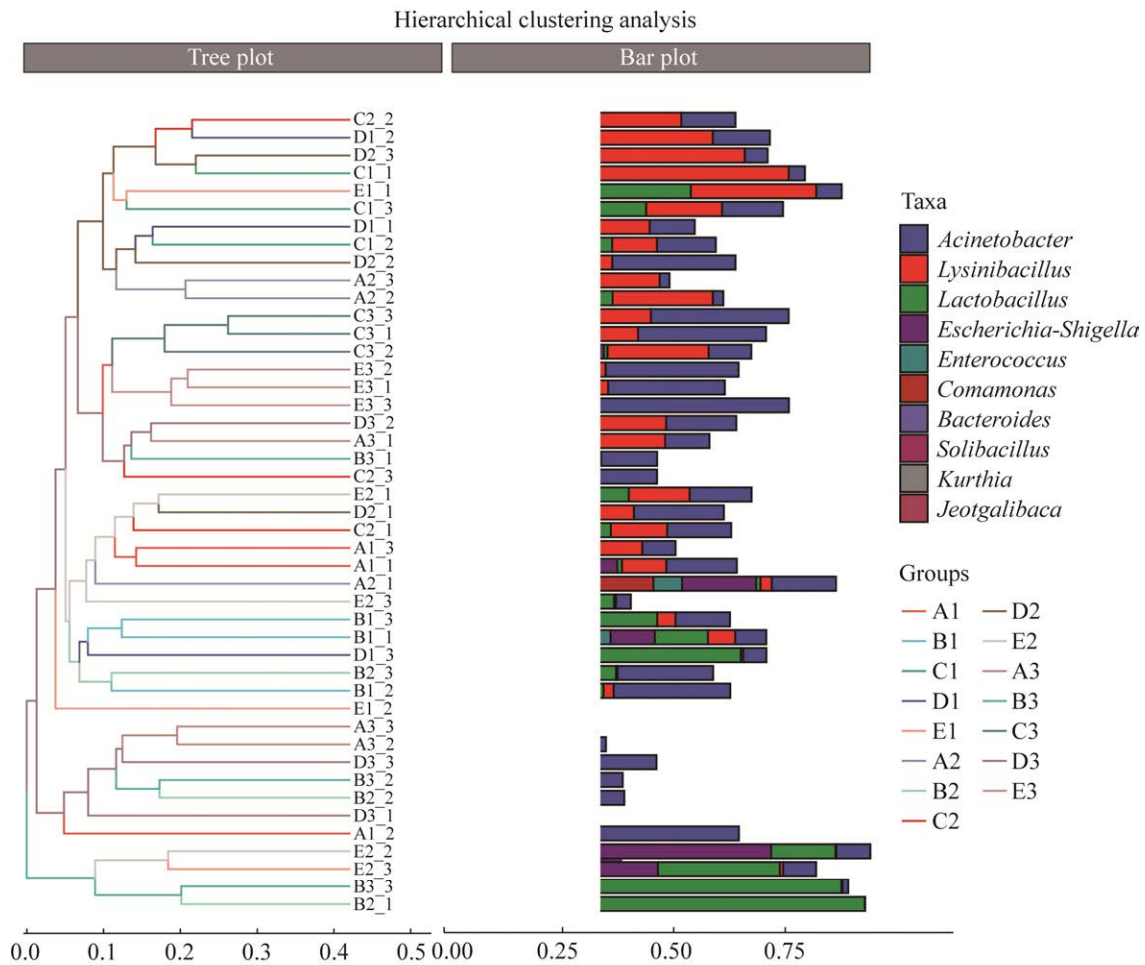


图 7 肠道微生物 Bray-Curtis 聚类树图
Figure 7 Bray-Curtis cluster tree diagram of intestinal microorganisms.

(WPS-2)等含量较低属于劣势菌。综合分析表明, 14、33 和 42 d 联用 D 组(D1-D3)厚壁菌门占比最高, 并且随着时间的推移, 厚壁菌门也相应增加。第 42 天时, 对照组 E3 中厚壁菌门

显著降低, 肠道菌群以变形菌门为主, 而联用组中的变形菌门水平均低于对照组。

属水平上的物种丰度分析表明(图 9), 各组的主要组成物种分别为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、

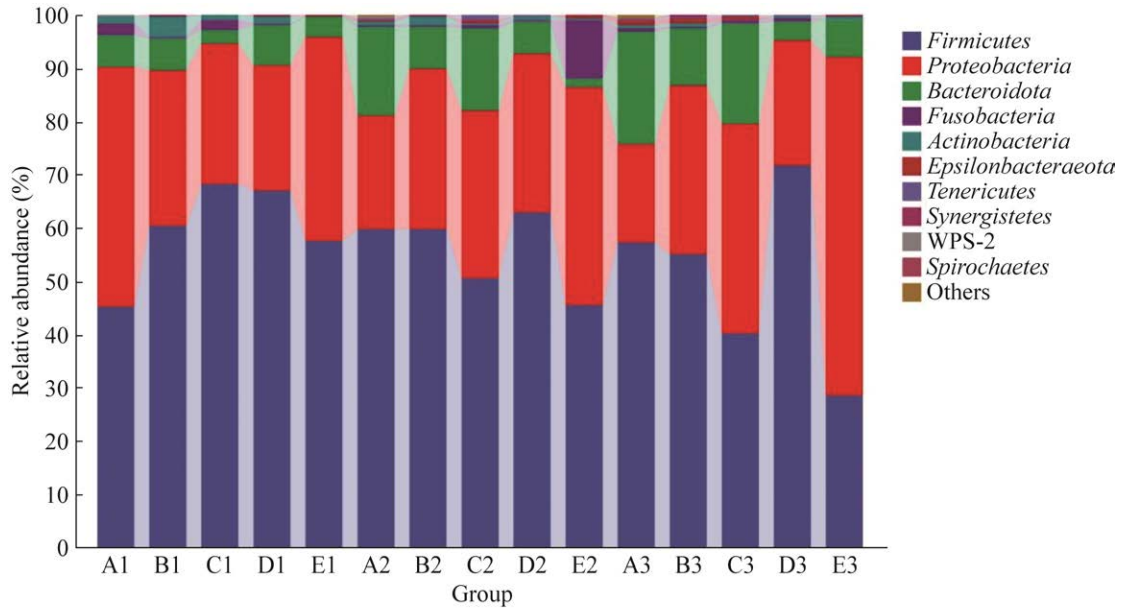


图 8 肠道微生物门水平各样本物种组成柱状图

Figure 8 Histogram of species composition at phylum level of intestinal microorganisms.

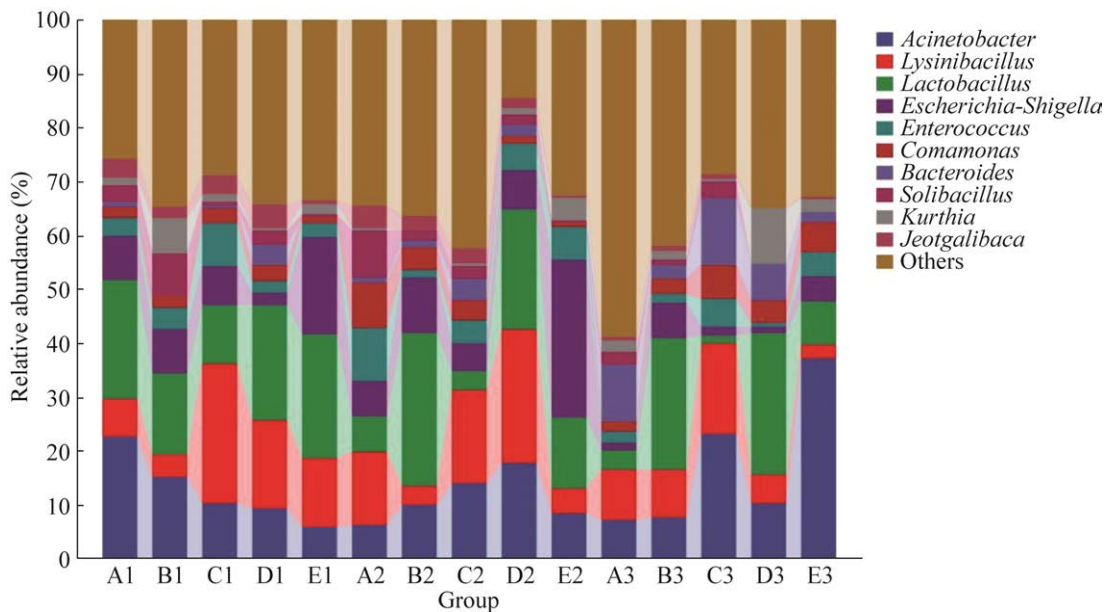


图 9 肠道微生物属水平各组物种组成柱状图

Figure 9 Histogram of species composition at genus level of intestinal microorganisms.

赖氨酸芽胞杆菌属(*Lysinibacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、大肠杆菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、土壤芽孢杆菌属(*Solibacillus*)、库尔特氏杆菌属(*Kurthia*)和约塔加利巴卡属(*Jeotgalibaca*)等,其中不动杆菌属(13.68%)、赖氨酸芽胞杆菌属(11.57%)和乳杆菌属(11.26%)占比较高,为优势菌属。33 d B2组和42 d D3组中的乳杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度最高,42 d A3、C3和D3组的大肠杆菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)相对丰度均低于14 d (A1-E1)、33 d (A2-E2)和42 d (B3、E3)。

2.5 蛋鸡肠道微生物组基因功能预测

在KEGG一级水平上,共获得六大类代谢通路(图10):细胞加工(cellular processes)、环境信息加工(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、人类疾病(human diseases)、代谢(metabolism)和生物体系统(organismal systems)。14 d D1组和33 d D2组肠道微生物在环境信息加工和疾病相关方面的功能较丰富,33 d A2组在细胞加工过程中的功能较为丰富,B2组遗传信息处理功能较丰富,42 d A3组主要表现在生物体系统,而D3组集中于代谢方面的功能。

在KEGG二级水平上,共预测出30条代谢通路(图11),14 d A1组的肠道微生物在内分泌系统(endocrine system)功能基因丰度表达显著高于其他组,14 d D1组的肠道微生物在神经退行性疾病(neurodegenerative diseases)代谢通路中,富集基因相对丰度极显著($P < 0.05$)。33 d A2组的肠道微生物主要参与细胞运动性(cell motility)代谢通路,33 d B2组的肠道微生物在复制与修复(replication and repair)和心血管疾病(cardiovascular diseases)代谢通路中,富集基因相对丰度显著高于其余处理组($P < 0.05$)。与对照组和其他处理组相比,42 d D3组的肠道微生物在排泄系统(excretory system)和免疫疾病(immune diseases)代谢通路中,富集基因相对丰度显著高于A3(60.49%)、B3(290.76%)、C3(153.16%)和对照组(E3)(755.95%) ($P < 0.05$)。

3 讨论

微生物群落在蛋鸡肠道健康和生产性能方面发挥着至关重要的作用。大多数与肠道微生物群相关的研究均聚焦于肉鸡,而与肉鸡相比,蛋鸡具有独特的微生物群落。蛋鸡肠道微生物群落受到多种因素的影响,如鸡群年龄、生产系统、疾病、饮食和抗生素使用等^[20]。在过去的几十年中,禽养殖业长期依赖于添加预防剂量

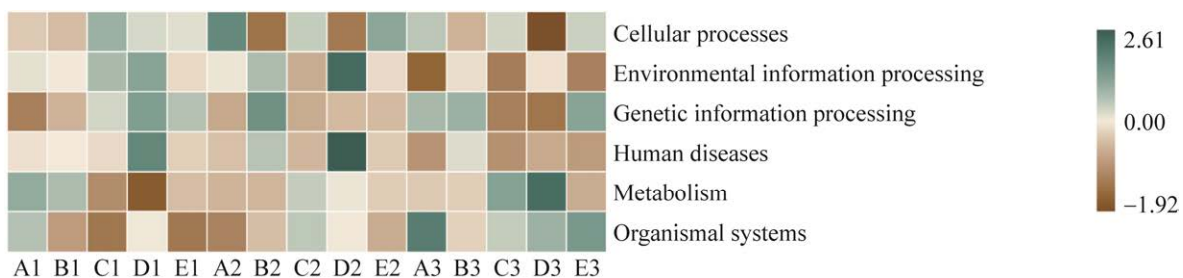


图10 蛋鸡盲肠菌群KEGG-L1代谢通路预测热图

Figure 10 Prediction heat map of KEGG-L1 metabolic pathway in the caecum of laying hens.



图 11 蛋鸡盲肠菌群 KEGG-L2 代谢通路预测热图

Figure 11 Prediction heat map of KEGG-L2 metabolic pathway in the caecum of laying hens.

的抗生素来提升蛋鸡生长性能，控制肠道疾病。“减抗、禁抗”的落实推进了噬菌体的发展，使其成为减抗资源，在禽绿色减抗养殖中具有应用潜力。

本研究利用 Cp 噬菌体、Sa 噬菌体及枯草芽孢杆菌联用，使蛋鸡肠道 Cp 降低 1.48 log₁₀ (CFU/mL)，

大幅减少 Cp 在肠道内的载量，随着饲喂周期的推移，Cp 噬菌体组能够持续减菌，提升了肠道健康。Bae 等^[20]研究表明，在饲料中添加 Cp 噬菌体 φCJ22 可有效预防 NE 的发生，并且肠道内 Cp 减少 1.24 log₁₀ (CFU/g)，从而有效缓解 NE 感染对鸡生产性能造成的损失。也有研究显

示,噬菌体裂解细菌后和活性杆菌衍生的病原体相关分子可以刺激局部先天免疫反应,从而促进肠道细菌清除^[21]。将不同日龄的鸡口服 Cp 噬菌体鸡尾酒“INT-401”(CPAS-7、CPAS-12、CPAS-15、CPAS-16 和 CPLV-42,含量为 10^5 PFU/mL) 42 d,死亡率显著低于对照组^[13]。Hosny 等^[12]将包含 6 种 Cp 噬菌体的鸡尾酒饲喂鸡,发现盲肠中 Cp 水平低于检出限。口服 Cp 噬菌体鸡尾酒,可显著减轻十二指肠和空肠的坏死病变,降低病变评分^[4]。Lee 等^[6]将包被后的 Cp 噬菌体饲喂所有年龄段的鸡,在肠道食糜中均检测到释放后的 Cp 噬菌体,可以增加肠道隐窝深度,绒毛高度与隐窝深度比值升高,并能抑制盲肠中 Cp 的数量。与本研究相似,噬菌体组十二指肠、空肠和回肠绒毛高度均显著升高($P<0.05$),隐窝深度较对照组显著降低($P<0.05$),绒毛高度/隐窝深度显著增大($P<0.05$)。

肠道菌群组成随日龄、基因型和生产系统变化而变化。健康蛋鸡肠道正常菌群主要由变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门和放线菌门组成。对盲肠内容物样本进行 16S rRNA 基因谱分析,在第 42 天的门水平上,相比对照组各组蛋鸡肠道菌群均以厚壁菌门和变形菌门为主。复合噬菌体和枯草芽孢杆菌联用组(D1-D3)厚壁菌门占比最高,并且随着时间的延长,厚壁菌门含量增多,属水平显示 42 d 时乳酸杆菌属占比显著提升,由此可见,噬菌体可以有效抑菌且不影响其他正常菌群^[22]。Devi Upadhaya 等^[23]研究发现鸡体摄入 Cp 噬菌体鸡尾酒显著提升了体重,仅添加 0.05%的噬菌体便足以增强肠道正常菌群的形成,从而表明噬菌体具有减菌促生长的潜力。大量研究表明,益生菌具有抗 Cp 的活性,其中主要包括芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌^[24-25]。枯草芽孢杆菌通过改善体重和饲料转化效率来改善 Cp 感染鸡

的生长^[26],不仅能调节 Cp 感染鸡肝脏中脂肪酸合成和氧化相关基因的表达,还能提高抗氧化活性^[27],产生抑制 Cp 生长的细菌素。Mahmoud 等^[28]也同样发现,枯草芽孢杆菌的添加可加强肉鸡空肠隐窝深度,提高回肠对粗蛋白的消化率^[29]。枯草芽孢杆菌作为益生菌使用时,还可通过免疫刺激和竞争排斥改善鸡肠道内的微生物平衡^[26]。益生菌的功效发挥具有多因素的依赖性,包括所使用的菌种、剂量、给药模式、宿主和潜在的管腔内微生物环境的特征,以及噬菌体的活性。

当蛋鸡肠道内 Cp 菌数失衡,诱发 Sa 混合感染,能够引起蛋鸡腹泻病,使肠道菌群严重紊乱。Huang 等^[25]对鸡胃肠道微生物群分析表明,Sa 攻击显著降低了蓝绿藻菌属和芽孢杆菌属的相对丰度,导致大肠杆菌-志贺氏菌和克雷伯氏菌显著增加,成为主要的细菌类群;相较而言,使用 Sa 噬菌体 CKT1 显著减少了大肠杆菌-志贺氏菌和克雷伯氏菌在肠道中的数量,厚壁菌门增殖。此外,Sa 噬菌体处理对鸡正常的肠道菌群结构无影响,而对感染 Sa 的鸡增加了盲肠细菌种类的丰富度。因此本研究将 Sa 噬菌体、Cp 噬菌体与枯草芽孢杆菌联用比单一使用 Cp 噬菌体或枯草芽孢杆菌能更好地防止 Cp 感染后引起的肠道微生物群紊乱,提高有益菌的丰富度,促进肠道的发育。

蛋鸡血清中的免疫球蛋白 IgA、IgG 和 IgM 是体液免疫的主要抗体,免疫球蛋白含量在一定程度上能够反映机体的免疫水平。IgA 主要参与中和感染因子,IgG 激活补体、中和毒素,IgM 的作用主要是激活补体系统发挥溶菌、溶细胞及中和病毒等免疫作用^[30-31]。在本研究中,复合噬菌体&枯草芽孢杆菌联用组(D)饮用后可以显著提高血清中 IgA、IgG 和 IgM 的含量,有助于蛋鸡提高机体免疫水平。相关研究表明

益生菌培养物中的活性物质(益生菌、有机酸和多肽等),可改善肠道菌群平衡从而有助于提高免疫性能^[32]。

Devi Upadhaya 等^[23]提出噬菌体治疗导致细菌感染性疾病基因的减少,因参与转运、分解代谢、转录、复制和修复等相关基因增加,表明致病菌的代谢活性降低,肠道内细菌多样性和其他微生物群的分解代谢发生改变。而本研究中,随着联用组饮用时间的增加,D3组的肠道微生物分别在排泄系统(excretory system)与免疫疾病(immune diseases)代谢通路中的富集基因相对丰度显著高于其他处理组与对照组($P<0.05$)。因此我们推测,Cp噬菌体、Sa噬菌体及枯草芽孢杆菌联用时,排泄系统和免疫疾病代谢通路更为活跃,相关基因表达增强,促进肠道抗菌成分的表达,进而有利于肠道防御系统的建立,通过纠正蛋鸡紊乱的肠道菌群,改善蛋鸡免疫功能,提高肠道菌群代谢功能,从而为噬菌体与益生菌协同联用提质增效提供重要依据。

4 结论

本研究表明复合噬菌体(Cp噬菌体、Sa噬菌体)及枯草芽孢杆菌联用能够有效控制蛋鸡肠道Cp增殖,改善肠道微生物多样性,提高机体的免疫因子含量及微生物的免疫代谢基因表达,使其作用更为活跃,促进蛋鸡肠道健康,显示其作为“减抗”技术防治因Cp感染引发NE的潜力,为禽养殖业提供了有效的减抗产品来源。

REFERENCES

- [1] 文杰,蔡辉益,昝于明,齐广海,陈继兰,张桂芝,刘国华,熊本海,苏基双,计成,刁其玉,刘汉林. NY/T 33—2004 鸡饲养标准[S]. 北京: 中华人民共和国农业行业标准, 2004.
WEN J, CAI HY, GUO YM, QI GH, CHEN JL, ZHANG GZ, LIU GH, XIONG BH, SU JS, JI C, DIAO QY, LIU HL. NY/T 33—2004 chicken rearing standard[S]. Beijing: Agricultural Industry Standard of China, 2004 (in Chinese).
- [2] NOOR MOHAMMADI T, SHEN CK, LI YC, ZAYDA MG, SATO J, MASUDA Y, HONJOH KI, MIYAMOTO T. Characterization of *Clostridium perfringens* bacteriophages and their application in chicken meat and milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 361: 109446.
- [3] 于旭磊. 产气荚膜梭菌流行特点及其噬菌体遗传背景分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2020.
YU XL. The epidemic characteristics of *Clostridium perfringens* and analysis of its bacteriophage's genetic background[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [4] KEERQIN C, McGLASHAN K, VAN TTH, CHINIVASAGAM HN, MOORE RJ, CHOCT M, WU SB. A lytic bacteriophage isolate reduced *Clostridium perfringens* induced lesions in necrotic enteritis challenged broilers[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 1058115.
- [5] SEAL BS. Characterization of bacteriophages virulent for *Clostridium perfringens* and identification of phage lytic enzymes as alternatives to antibiotics for potential control of the bacterium[J]. Poultry Science, 2013, 92(2): 526-533.
- [6] LEE HG, KIM YB, LEE SH, MOON JO, CHAE JP, KIM YJ, LEE KW. *In vivo* recovery of bacteriophages and their effects on *Clostridium perfringens*-infected broiler chickens[J]. Veterinary Sciences, 2022, 9(3): 119.
- [7] 张园园,李简,郭丽君,薛冰,蔡亚南. 不同孵化方式对鸡肠道菌群的影响及益生菌调控的研究进展[J]. 中国家禽, 2022, 44(11): 137-142.
ZHANG YY, LI J, GUO LJ, XUE B, CAI YN. Research progress on composition of intestinal microbiota and application of probiotics in chickens with different incubation modes[J]. China Poultry, 2022, 44(11): 137-142 (in Chinese).
- [8] 丁小伟,何万领,李晓丽,丁美洁,杨龙帮. 裂殖壶菌发酵物对蛋鸡生产性能、蛋品质及肠道菌群结构的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(3): 1135-1147.
DING XW, HE WL, LI XL, DING MJ, YANG LB. Effects of *Schizochytrium* fermented products on production performance, egg quality and cecum microorganism of laying hens[J]. Acta Veterinaria et

- Zootechnica Sinica, 2023, 54(3): 1135-1147 (in Chinese).
- [9] 张莉, 尹德凤, 向建军, 袁丽娟, 廖且根, 张大文, 罗林广. 日粮中添加蓝藻粉对崇仁麻鸡肠道菌群结构的影响[J]. 江西农业学报, 2022, 34(3): 73-79.
ZHANG L, YIN DF, XIANG JJ, YUAN LJ, LIAO QG, ZHANG DW, LUO LG. Effects of cyanobacteria powder in diet on intestinal microflora structure of Chongren partridge chicken[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2022, 34(3): 73-79 (in Chinese).
- [10] 张春宝. 乳酸菌制剂对肉种鸡肠道菌群数量的影响[J]. 中国畜禽种业, 2019, 15(10): 177-178.
ZHANG CB. Effect of lactic acid bacteria preparation on the number of intestinal flora in broilers[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2019, 15(10): 177-178 (in Chinese).
- [11] 张明伟, 杨雨, 杜雲利, 闫盛贤, 张鹏. 益生菌促进蛋鸡肠道菌群平衡及生产性能的研究进展[J]. 饲料研究, 2021, 44(10): 150-153.
ZHANG MW, YANG Y, DU YL, YAN SX, ZHANG P. Research progress on probiotics promoting gut microbiota balance and production performance of laying hens[J]. Feed Research, 2021, 44(10): 150-153 (in Chinese).
- [12] HOSNY RA, GABER AF, SOROUR HK. Bacteriophage mediated control of necrotic enteritis caused by *C. perfringens* in broiler chickens[J]. Veterinary Research Communications, 2021, 45(4): 409-421.
- [13] MILLER RW, SKINNER J, SULAKVELIDZE A, MATHIS GF, HOFACRE CL. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*[J]. Avian Diseases Digest, 2010, 5(1): e28-e29.
- [14] 蓝林诚. 饲用芽孢杆菌对不同养殖模式下黎村黄鸡肠道菌群与形态的影响[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2020.
LAN LC. Effects of *Bacillus* feeding on intestinal flora and morphology of licun yellow chickens in different breeding models[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2020 (in Chinese).
- [15] GUO SS, LIU D, ZHANG BB, LI Z, LI YH, DING BY, GUO YM. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and α -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells *in vitro*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2081.
- [16] 吴立婷, 刘半红, 田源, 王娟, 包红朵, 周艳, 庞茂达, 王冉, 张辉. 产气荚膜梭菌噬菌体鉴定及其环境消减效果评价[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(10): 3550-3560.
WU LT, LIU BH, TIAN Y, WANG J, BAO HD, ZHOU Y, PANG MD, WANG R, ZHANG H. Identification and environmental inhibition effect of *Clostridium perfringens* phage[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(10): 3550-3560 (in Chinese).
- [17] 张纯萍, 李颖, 赵琪, 叶子煜, 宋立, 刘洪斌, 崔明全, 蔡英华, 徐士新, 于焱, 王鹤佳. NY/T 4146—2022 动物源沙门氏菌分离与鉴定技术规程[S]. 北京: 中华人民共和国农业行业标准, 2022.
ZHANG CP, LI Y, ZHAO Q, YE ZY, SONG L, LIU HB, CUI MQ, CAI YH, XU SX, YU L, WANG HJ. NY/T 4146—2022 Technical code of practice for isolation and identification of *Salmonella* from animals[S]. Beijing: Agricultural Industry standards of the People's Republic of China, 2022 (in Chinese).
- [18] 朱红惠, 孙晓棠, 羊宋贞, 陈远良, 张鲜姣. GB/T 26428—2010 饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测[S]. 北京: 中华人民共和国国家标准, 2011.
ZHU HH, SUN XT, YANG SG, CHEN YL, ZHANG XJ. GB/T 26428—2010 Method for determination of *Bacillus subtilis* in feeds[S]. Beijing: State Standard of the People's Republic of China, 2011 (in Chinese).
- [19] 黄安群, 段海涛, 郭良兴, 杨建平, 郭金玲, 李新正, 乔致远, 席磊. 基于 16S rRNA 技术分析磁化水对蛋鸡肠道菌群多样性的影响[J]. 中国家禽, 2020, 42(12): 109-114.
HUANG AQ, DUAN HT, GUO LX, YANG JP, GUO JL, LI XZ, QIAO ZY, XI L. Analysis of the effect of magnetized water on the diversity of intestinal flora in laying hens based on 16S rRNA technology[J]. China Poultry, 2020, 42(12): 109-114 (in Chinese).
- [20] BAE D, LEE JW, CHAE JP, KIM JW, EUN JS, LEE KW, SEO KH. Characterization of a novel bacteriophage ϕ CJ22 and its prophylactic and inhibitory effects on necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* in broilers[J]. Poultry Science, 2021, 100(1): 302-313.
- [21] KRUT O, BEKEREDJIAN-DING I. Contribution of the immune response to phage therapy[J]. The Journal of Immunology, 2018, 200(9): 3037-3044.
- [22] ROACH DR, LEUNG CY, HENRY M, MORELLO E, SINGH D, Di SANTO JP, WEITZ JS, DEBARBIEUX L. Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 22(1): 38-47.e4.

- [23] DEVI UPADHAYA S, AHN JM, CHO JH, KIM JY, KANG DK, KIM SW, KIM HB, KIM IH. Bacteriophage cocktail supplementation improves growth performance, gut microbiome and production traits in broiler chickens[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 1-12.
- [24] KORTRIGHT KE, CHAN BK, KOFF JL, TURNER PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 219-232.
- [25] HUANG JQ, LIANG L, CUI KT, LI PY, HAO GJ, SUN SH. *Salmonella* phage CKT1 significantly relieves the body weight loss of chicks by normalizing the abnormal intestinal microbiome caused by hypervirulent *Salmonella Pullorum*[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(3): 101668.
- [26] KHAN S, MOORE RJ, STANLEY D, CHOUSALKAR KK. The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(13): e00600-e00620.
- [27] KHALIQUE A, ZENG D, SHOAIB M, WANG HS, QING XD, RAJPUT DS, PAN KC, NI XQ. Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 1-10.
- [28] MAHMOUD KZ, OBEIDAT BS, AL-SADI MZ, HATAHET SR. Effect of *Bacillus subtilis* supplementation and dietary crude protein level on growth performance and intestinal morphological changes of meat type chicken[J]. *Livestock Science*, 2017, 195: 99-104.
- [29] LI Z, WANG WW, LIU D, GUO YM. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on the growth performance and intestinal health of broilers challenged with *Clostridium perfringens*[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9: 25.
- [30] ZHOU MJ, ZENG D, NI XQ, TU T, YIN ZQ, PAN KC, JING B. Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth performance and expression of lipid metabolism-related genes in broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2016, 15: 48.
- [31] 木仁, 格根图雅, 张欢, 冉田田, 陈志, 文狄, 马媛, 徐文斌. 长顺绿壳蛋鸡肠道菌群结构及基因功能分析[J]. *现代畜牧兽医*, 2022(7): 7-11.
- MU R, GEGENTUYA, ZHANG H, RAN TT, CHEN Z, WEN D, MA Y, XU WB. Analysis of gut microbiota structure and gene function in Changshun green-shell laying hens[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022(7): 7-11 (in Chinese).
- [32] 孟小林, 祁巧芬, 陈英, 赵永旭. 日粮添加复合益生菌对肉鸡生长性能、免疫功能及肠道健康的影响[J]. *饲料研究*, 2022, 45(15): 52-56.
- MENG XL, QI QF, CHEN Y, ZHAO YX. Effect of dietary compound probiotics on growth performance, immune function and intestinal health of broilers[J]. *Feed Research*, 2022, 45(15): 52-56 (in Chinese).