

# 冬末春初圈养梅花鹿健康与腹泻个体粪便菌群的比较分析

吴家慧<sup>1</sup>, 石明慧<sup>1</sup>, 王一晨<sup>1</sup>, 韩香雨<sup>1</sup>, 吴怡宁<sup>1</sup>,

蒋元琳<sup>1</sup>, 刘树强<sup>1\*</sup>, 胡德夫<sup>1\*</sup>, 商 业<sup>2</sup>

(1. 北京林业大学 生态与自然保护学院 北京 100083; 2. 辽阳千山呈龙科技有限公司 辽宁 辽阳 111000)

**摘 要** 腹泻是制约梅花鹿 (*Cervus nippon*) 养殖发展的主要因素之一, 通常与肠道菌群失衡有关, 而健康与腹泻梅花鹿个体菌群组成变化尚不清楚。为探究健康与腹泻梅花鹿肠道菌群差异, 分析梅花鹿腹泻原因, 以圈养雄性梅花鹿为实验对象, 采集正常及腹泻梅花鹿粪便共 18 份, 通过 16S rRNA 基因测序进行比较分析。研究结果表明, 腹泻组菌群丰度及多样性较健康组均有所下降。在门至属水平, 腹泻组理研菌科 (Rikenellaceae)、克里斯滕森菌科 (Christensenellaceae) 等有益菌丰度下降, *Treponema\_2* 菌属等促炎菌丰度上升。此外, 瘤胃球菌科 UCG-014 菌属 (*Ruminococcaceae\_UCG-014*) 和理研菌科 RC9 菌属 (*Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*) 在健康组中显著富集; 疣微菌门 (Verrucomicrobia)、拟普雷沃氏菌属 (*Alloprevotella*)、阿克曼氏菌属 (*Akkermansia*) 在腹泻组显著富集。腹泻梅花鹿与健康梅花鹿粪便菌群组成和多样性存在显著差异, 疣微菌门丰度升高可能是导致梅花鹿腹泻的一个原因。

**关键词** 梅花鹿; 肠道菌群; 腹泻; 16S rRNA 基因测序; 疣微菌门; 阿克曼氏菌属

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2023)02-0068-10

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2023.02.008

## Comparative Analysis of Fecal Flora of Healthy and Diarrheic Captive Sika Deer (*Cervus nippon*) in Late Winter and Early Spring

WU Jia-hui<sup>1</sup>, SHI Ming-hui<sup>1</sup>, WANG Yi-chen<sup>1</sup>, HAN Xiang-yu<sup>1</sup>, WU Yi-ning<sup>1</sup>,

JIANG Yuan-lin<sup>1</sup>, LIU Shu-qiang<sup>1\*</sup>, HU De-fu<sup>1\*</sup>, SHANG Ye<sup>2</sup>

(1. Schl. of Ecol. & Nature Conserv., Beijing Forest. Uni., Beijing 100083;

2. Liaoyang Qianshan Chenglong Tech. Co. Ltd, Liaoyang 111000)

**Abstract** Diarrhea is one of the main factors restricting the development of sika deer (*Cervus nippon*) farming, which is usually related to the imbalance of intestinal microbial population. However, the changes of microbial population of healthy and diarrheic individual sika deer remain unclear. In order to explore the difference of intestinal microbial population between healthy and diarrheic sika deer and analyze the cause of diarrhea, a total of 18 samples of normal and diarrheic feces were collected from captive male sika deer for comparative analysis by 16S rRNA gene sequencing. The results showed that the abundance and diversity of microbial population in diarrheic group were lower than those in healthy group. At phylum to genus level, the abundance of beneficial bacteria such as Rikenellaceae and Christensenellaceae decreased in diarrheic group, while the abundance of proinflammatory bacteria such as *Treponema\_2* increased. In addition, *Ruminococcaceae\_UCG-014* and *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group* were significantly enriched in the healthy group, while Verrucomicrobia, *Alloprevotella* and *Akkermansia* were significantly enriched in diarrheic group. In summary, there were significant differences in intestinal microbial population composition and diversity be-

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0502200)

作者简介: 吴家慧 女 硕士研究生。研究方向为动物种质资源保护与利用。E-mail: wjh3190697@163.com

\* 通讯作者。刘树强 男 副教授 博士 硕士生导师。研究方向为动物生理生态学。E-mail: liushuqiang@bjfu.edu.cn

胡德夫 男 教授 博士 博士生导师。研究方向为野生动物生态与管理。E-mail: hudf@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2022-10-03

tween diarrheic sika deer and healthy sika deer, and the increased abundance of Verrucomicrobia may be a cause of diarrhea in sika deer.

**Keywords** sika deer (*Cervus nippon*); intestinal microbial population; diarrhea; 16S rRNA gene sequencing; Verrucomicrobia; *Akkermansia*

梅花鹿(*Cervus nippon*)不仅是森林生态系统的重要一环,也是我国饲养量最多的鹿类,出产中医药原料鹿茸、鹿肉等鹿产品,具有很高的经济及药用价值。腹泻是梅花鹿常见消化道疾病,临床上以排便频繁且粪便不成形为主要症状,发病率较高,急性、慢性腹泻症状均有,轻则导致梅花鹿健康不佳,进而影响到鹿肉、鹿茸等产品质量,重则致死,严重危害养鹿业发展。梅花鹿的腹泻原因很多,包括水质不洁、季节饲料更换、滥用药物等饲养管理因素,以及寄生虫、细菌、病毒等生物因素<sup>[1-2]</sup>。近年来的许多研究表明,动物肠道菌群通过代谢产物和免疫调节活性影响宿主健康<sup>[3-5]</sup>,腹泻与肠道菌群多样性变化有关<sup>[6]</sup>。例如厚壁菌门(Firmicutes)可产生短链脂肪酸抑制炎症,维持肠道健康。其丰度的下降会加剧肠道炎症,导致腹泻<sup>[7]</sup>。克里斯滕森菌科(Christensenellaceae)可产生丁酸改善肠道屏障,肠内丁酸的代谢水平与溃疡性结肠炎患者表现有关<sup>[8]</sup>。菌群的紊乱可导致腹泻,腹泻又可加重菌群失调,形成恶性循环<sup>[9]</sup>。随着16S rRNA高通量测序的发展,动物肠道菌群组成与消化系统疾病关系已成为研究热点,是研究动物健康及科学管护的重要途径。比如利用高通量测序手段获取腹泻犊牛的菌群组成,推测潜在致病菌为埃希氏-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*),为犊牛腹泻防控提供一定理论依据<sup>[10]</sup>。同时基于高通量测序手段,可判断粪菌移植对腹泻仔猪肠道菌群的改善作用<sup>[7]</sup>。本研究拟比较健康和腹泻梅花鹿的粪便菌群差异,探寻梅花鹿腹泻与肠道菌群的关系,为预防和治疗梅花鹿腹泻提供相应参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 2021年4月于辽阳国家鹿类种源繁育基地,选择近6个月内未用过驱虫药、抗生素且年龄相近的成年雄性梅花鹿,根据健康状况分为健康组MSD(male sika deer)和腹泻组DSD

(diarrheic sika deer, DSD)。腹泻鹿的粪便不成形,粪水未分离,参照羔羊腹泻标准应判为轻度腹泻<sup>[11]</sup>。

1.1.2 样品采集 选择粪便正常的健康个体8只(n=8),腹泻个体10只(n=10),每日6:30(北京时间)进入圈舍,使用一次性无菌手套采集新鲜粪便。选择粪便上层未接触地面的部分放入无菌自封袋中,密封后标记采集日期、个体耳号等信息。采集完成后放入-20℃冰箱冷冻保存,等待后续处理。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 MN NucleoSpin® 96 Soil 试剂盒(德国 MACHERY-NAGEL 公司); E. Z. N. A. Gel & PCR Clean Up Kit 试剂盒(美国 OMEGA 公司); Monarch DNA Gel Extraction Kit 试剂盒(美国 NEB 公司); KOD FX Neo 酶(上海东洋纺管理有限公司); 微型离心机(1795, 北京天根生化科技有限公司); 振荡器(G560E, 美国 SI 公司); 96 well PCR 仪(9902, 美国 ABI 公司); 24 孔离心机(5424EQ766751, 德国 Eppendorf 公司); 高速离心机(Legend Micro 21, 德国 Eppendorf 公司); 真空泵(ZK-26/100, 杭州米欧仪器有限公司); 酶标仪(SynergyHTX, 香港基因有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取、扩增和测序 使用 MN NucleoSpin® 96 Soil 试剂盒提取梅花鹿粪便的基因组 DNA。之后用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度、总量、纯度及条带完整性。以提取的样品 DNA 为模板,使用通用引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAG-GCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(10 μL): 模板 DNA 50 ng, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 0.3 μL, KOD FX Neo Buffer 5 μL, dNTP(2 mmol/L) 2 μL, KOD FX Neo 酶(1 U/μL) 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 10 μL。PCR 反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s, 25 次循环; 72℃ 7 min。随后将 PCR 产物进行 Solexa PCR 扩增, 扩增产物进行

Nanodrop 定量,按 1 : 1 ( 体积比 ) 比例混样 ,混样后采用 E. Z. N. A. Gel & PCR Clean Up Kit 试剂盒纯化 ,最后使用 Monarch® DNA Gel Extraction Kit 试剂盒切胶回收。构建文库后 ,在 Illumina HiSeq 2500 平台对回收的 DNA 进行高通量测序。测序工作交付给北京百迈客生物科技有限公司完成。测序原始数据上传到 NCBI SRA 数据库 ,数据编号为 PRJNA787429。

1.2.2 生物信息学分析 对测序得到的原始数据进行拼接 ,使用 Trimmomatic( version 0.33) 将拼接得到的序列进行质量过滤 ,随后使用 USEARCH ( version 10) 对双端序列进行拼接 ,使用 UCHIME ( version 4.2) 去除嵌合体 ,最终得到高质量序列。使用 USEARCH( version 10) 将优化处理后的序列在 97% 的相似度水平下进行分类操作单元( operational taxonomic units ,OTU) 划分 ,得到 OTUs。以 SILVA( Release 132 <http://www.arb-silva.de>) 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行分类学注释 ,在各分类水平上统计样品群落组成。使用 QIIME2 软件生成不同分类水平上的物种丰度表 ,并对样品进行 Alpha 多样性分析和 Beta 多样性分析 ,比较组间菌群丰度和多样性。利用 R 语言工具绘制各分类水平的群落结构图、NMDS 分析图和 ANOSIM 分析图。利用 Metastats 软件对组间的物种丰度数据进行 *t* 检验 ,采用 LEfSe 分析方法筛选出样品中具有统计学差异的菌群。

1.2.3 统计分析 应用 SPSS 21.0 软件对数据进行独立样本 *t* 检验 ,数据结果以均值 ± 标准差表示 ,*P* ≤ 0.05 差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序水平

通过 Illumina MiSeq 测序技术检测扩增的健康及腹泻梅花鹿粪便共 18 个样本的菌群 16S rRNA 基因产物序列 ,后续质控和纯化后 ,健康组共获得 624 600 条有效序列 ,腹泻组共获得 780 123 条有效序列 ,共获得 1 404 723 条序列 ( 平均长度为 414.33 个碱基对) 。本研究在 97% 序列相似度下聚类共获得 1 294 个 OTUs ,归类为 14 个门、21 个纲、33 个目、64 个科、155 个属。两组测序 Tags 和 OTUs 统计表见表 1。

表 1 健康组与腹泻组 Tags 和 OTUs  
Table 1 The number of Tags and OTUs of each group

组别	序列数( Tags ) /条	分类操作单元( OTUs)
健康组( MSD)	78 075.00 ± 218.296	1 198.63 ± 25.134
腹泻组( DSD)	78 012.30 ± 182.104	1 156.80 ± 47.707
<i>P</i> 值	0.526	0.040*

注: Tags 和 OTUs 以均值 ± 标准差表示 ,以独立样本 *t* 检验评估组间差异 ,\* *P* < 0.05

稀释性曲线( rarefaction curve) 可以用来比较测序样品中物种的丰富度 ,也可以说明测序的样本量是否足够覆盖所有类群。通过样品稀释性曲线图分析( 图 1) ,发现腹泻组样本的丰富度整体低于健康组 ,且随着样本量的增加 ,曲线逐渐趋于平坦 ,新 OTU 增加量逐渐减少。该结果表明本研究测序数据量充足 ,可以覆盖样本中所有细菌类群。

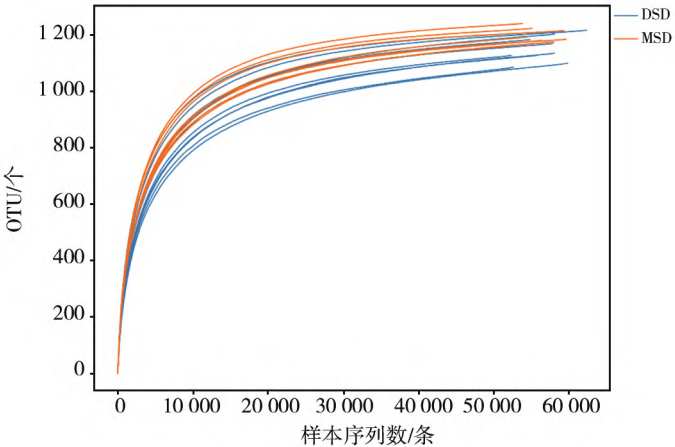


图 1 健康组( MSD) 及腹泻组梅花鹿( DSD) 粪样稀释性曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of fecal samples of healthy ( MSD) and diarrheic sika deer( DSD)

# 2.2 样品复杂度分析

2.2.1 样品多样性分析 等级丰度曲线( rank abundance curve) 主要用来展示样品的多样性, 解释了样品所含物种的丰富度和均匀度两个方面。物种的丰富度由曲线宽度反映, 曲线在横轴

上的范围越宽, 物种的丰富度越高; 物种均匀度由曲线形状反映, 曲线形状越平缓, 物种分布越均匀。由等级丰度曲线图( 图2) 可知, 腹泻组较于健康组, 其菌群丰富度和均匀度有一定程度的下降。

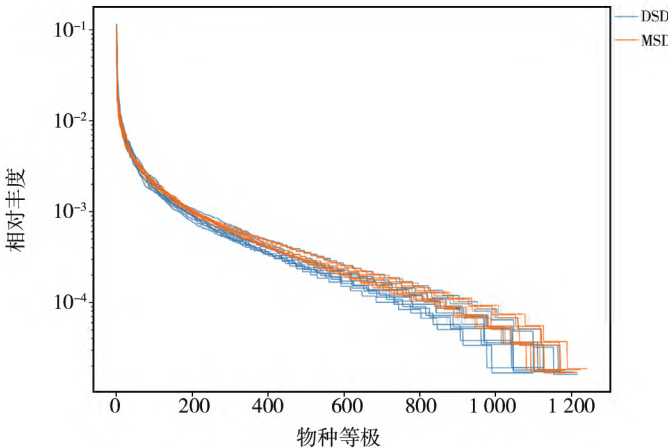


图2 健康组 (MSD) 及腹泻组梅花鹿 (DSD) 粪样等级丰度曲线

Fig.2 Rank abundance curves of fecal samples of healthy ( MSD) and diarrheic sika deer (DSD)

2.2.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性( Alpha diversity) 反映的是单个样品物种丰度及物种多样性, 有多种衡量指标。其中 Ace 和 Chao1 指数反映样品物种丰度, Simpson 和 Shannon 指数反映物种多样性。这些指数表明本次测序结果代表了样本中微生物的真实情况。分析结果( 表2) 表明, 健康组 Alpha 多样性指数均高于腹泻组。Ace 和 Chao1 指数表明健康组粪便菌群丰度显著高于腹泻组(  $P < 0.05$  )。Shannon 指数表明健康组粪便菌群多样性显著高于腹泻组(  $P < 0.05$  ), 而 Simpson 指数表明健康组粪便菌群多样性高于腹泻组, 但组间差异不显著(  $P > 0.05$  )。

表2 健康组与腹泻组样本 Alpha 多样性指数

Table 2 Alpha diversity indices of healthy and diarrheic group

指数	健康组	腹泻组	P 值
Ace	1 223.141 ± 18.276	1 190.881 ± 36.548	0.037*
Chao1	1 235.996 ± 16.718	1 203.467 ± 32.744	0.022*
Simpson	0.987 ± 0.002	0.983 ± 0.006	0.087
Shannon	8.250 ± 0.119	7.959 ± 0.340	0.035*

注: Alpha 指数以均值 ± 标准差表示, 独立样本  $t$  检验评估组间差异, \*  $P < 0.05$

2.2.3 Beta 多样性分析 Beta 多样性( Beta diversity) 分析用于反映样本或分组之间是否具有

显著的微生物群落差异。本研究基于加权 unifrac ( weighted unifrac) 算法计算样品间 Beta 多样性, 使用非度量多维尺度( non-metric multidimensional scaling, NMDS) 分析健康及腹泻梅花鹿的群落结构。图3A 中点分别表示各样品, 红色表示腹泻组, 蓝色表示健康组, 点与点之间的距离表示差异程度。在坐标图上距离越近的样品, 相似性越高。Stress 值小于 0.2, 表明 NMDS 分析具有一定的可靠性。如图3A 所示, 腹泻组与健康组有明显分离, 健康组集中在左上区域, 而腹泻组分布松散, 且结果可靠( Stress = 0.1085)。进一步使用相似性分析( analysis of similarities, ANOSIM) 进行计算,  $R = 0.188$ ,  $P = 0.033$ 。这一结果表明腹泻组和健康组的组间差异大于组内差异, 即腹泻组肠道菌群组成与健康组相比有显著差异。

# 2.3 不同分类水平优势菌群组成分析

2.3.1 细菌群落门水平组成 健康及腹泻梅花鹿肠道菌群在门水平上的组成见图4。在门水平上, 健康及腹泻梅花鹿的优势菌门均为厚壁菌门和拟杆菌门( Bacteroidetes), 相对丰度分别为 58.80%、30.10% 和 55.10%、29.20%。腹泻组厚壁菌门与拟杆菌门的比例( F/B ratio) 低于健康组。其他相对丰度  $> 1\%$  的包括螺旋体门

(Spirochaetes)、柔壁菌门(Tenericutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia),在健康组和腹泻组中分别

占比 5.53%、1.74%、1.11% 和 9.11%、1.17%、3.06%。

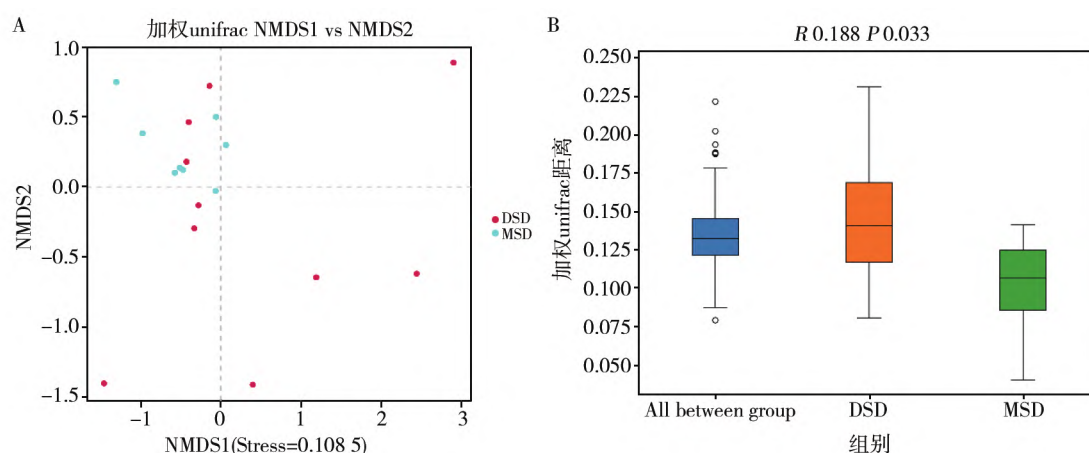


图3 健康组(MSD)及腹泻组梅花鹿(DSD)肠道菌群Beta多样性分析

Fig.3 Beta diversity analysis of healthy (MSD) and diarrheic sika deer(DSD)

A: 基于加权unifrac算法的NMDS分析; B: 基于加权unifrac算法的相似性分析

A: NMDS analysis based on weighted unifrac; B: ANOSIM based on weighted unifrac

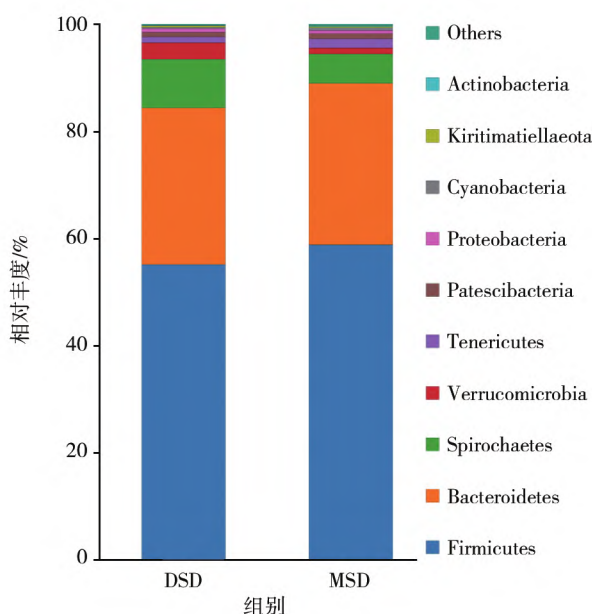


图4 健康组(MSD)及腹泻组梅花鹿(DSD)肠道菌群组成在门水平上的对比图

Fig.4 The comparison chart of intestinal microbiota at the phylum level of healthy and diarrheic sika deer

2.3.2 细菌群落科水平组成 健康及腹泻梅花鹿肠道菌群在科水平上的组成见图5。在科水平上,健康组优势菌科为瘤胃菌科(Ruminococcaceae)和理研菌科(Rikenellaceae),相对丰度为39.50%和9.63%。腹泻组优势菌科为瘤

胃菌科和螺旋体科(Spirochaetaceae),相对丰度为36.40%和9.11%。此外,腹泻组中瘤胃球菌科、理研菌科、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)、克里斯滕森菌科(Christensenellaceae)、Muribaculaceae菌科丰



度较健康组均有所下降,而螺旋体科、拟杆菌科( *Bacteroidaceae* )、阿克曼氏菌科( *Akkermansi-*

*aceae* ) 和 p-2534-18B5\_gut\_group 菌科丰度有所增加。

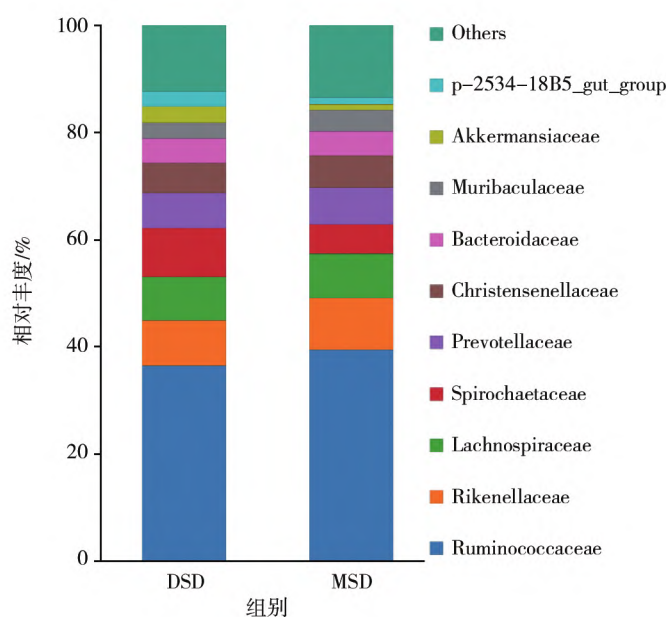


图5 健康组(MSD)及腹泻组梅花鹿(DSD)肠道菌群组成在科水平上的对比图

Fig. 5 The comparison chart of intestinal microbiota at the family level of healthy(MSD) and diarrheic sika deer(DSD)

2.3.3 细菌群落属水平组成 健康及腹泻梅花鹿肠道菌群在属水平上的组成见图6。在属水平上,瘤胃菌科 UCG-005 菌属( *Ruminococcaceae* \_ UCG-005) 和 *Treponema\_2* 菌属为腹泻组优势菌属,相对丰度为 15.40% 和 8.93%;健康组优势菌属为瘤胃菌科 UCG-005 菌属和克里斯滕森菌科 R-7 菌属( *Christensenellaceae* \_ R-7\_group),相对丰度为 15.70% 和 5.63%。此外,腹泻组中瘤胃菌科 UCG-005 菌属、克里斯滕森菌科 R-7 菌属、uncultured\_bacterium\_f\_Lachnospiraceae 菌属、理研菌科 RC9 菌属( *Rikenellaceae* \_ RC9\_gut\_group)、瘤胃菌科 UCG-010 菌属( *Ruminococcaceae* \_ UCG-010)、瘤胃菌科 UCG-014 菌属( *Ruminococcaceae* \_ UCG-014)、uncultured\_bacterium\_f\_Muribaculaceae 菌属、uncultured\_bacterium\_f\_Ruminococcaceae 菌属的丰度较健康组有所降低,而 *Treponema\_2* 菌属和拟杆菌属( *Bacteroides* )的丰度较健康组有所上升。

## 2.4 菌群差异分析

2.4.1 Metastat 分析 通过 MetaStat 方法分析组间不同分类水平上具有显著性差异的菌群。在门水平上,腹泻组疣微菌门高于健康组,差异极显著(  $P < 0.01$  );而柔壁菌门低于健康组,差异极显著

(  $P < 0.01$  )。在科水平上,腹泻组阿克曼氏菌科极显著高于健康组(  $P < 0.01$  ), p-2534-18B5\_gut\_group 菌科显著高于健康组(  $P < 0.05$  ),而 uncultured\_bacterium\_o\_Mollicutes\_RF39 显著低于健康组(  $P < 0.01$  )。在属水平上,健康组理研菌科 RC9 菌属和 uncultured\_bacterium\_f\_Prevotellaceae 菌属显著高于腹泻组(  $P < 0.05$  ),瘤胃球菌科 UCG-014 菌属极显著高于腹泻组(  $P < 0.01$  );腹泻组阿克曼氏菌属( *Akkermansia* )极显著高于健康组(  $P < 0.01$  ), uncultured\_bacterium\_f\_p-2534-18B5\_gut\_group 菌属显著高于健康组(  $P < 0.05$  )。

2.4.2 LEfSe 分析 通过 LEfSe 分析(图7), LDA 分值越大显示物种丰度对差异效果影响越大( LDA 阈值为 3.5 )。在门至属水平,柔壁菌门、柔膜菌纲( *Mollicutes* )、瘤胃球菌科 UCG-014 菌属和理研菌科 RC9 菌属在健康组中显著富集;疣微菌门、疣微菌纲( *Verrucomicrobiae* )、疣微菌目( *Verrucomicrobiales* )、阿克曼氏菌科、p-2534-18B5\_gut\_group 菌科、拟普雷沃氏菌属( *Alloprevotella* )、阿克曼氏菌属和 uncultured\_bacterium\_f\_p-2534-18B5\_gut\_group 菌属在腹泻组显著富集。

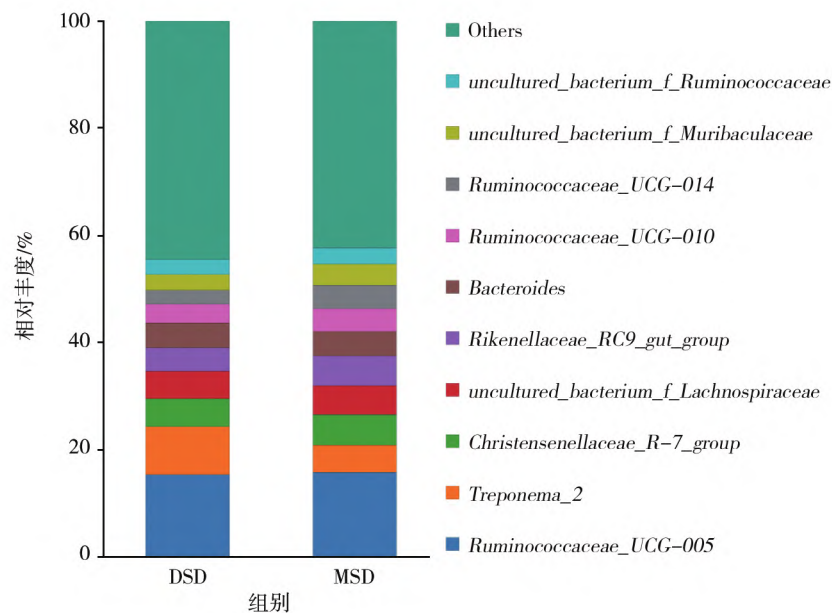


图 6 健康组( MSD) 及腹泻组梅花鹿( DSD) 肠道菌群组成在属水平上的对比图

Fig. 6 The comparison chart of intestinal microbiota at the genus level of healthy( MSD) and diarrheic sika deer( DSD)

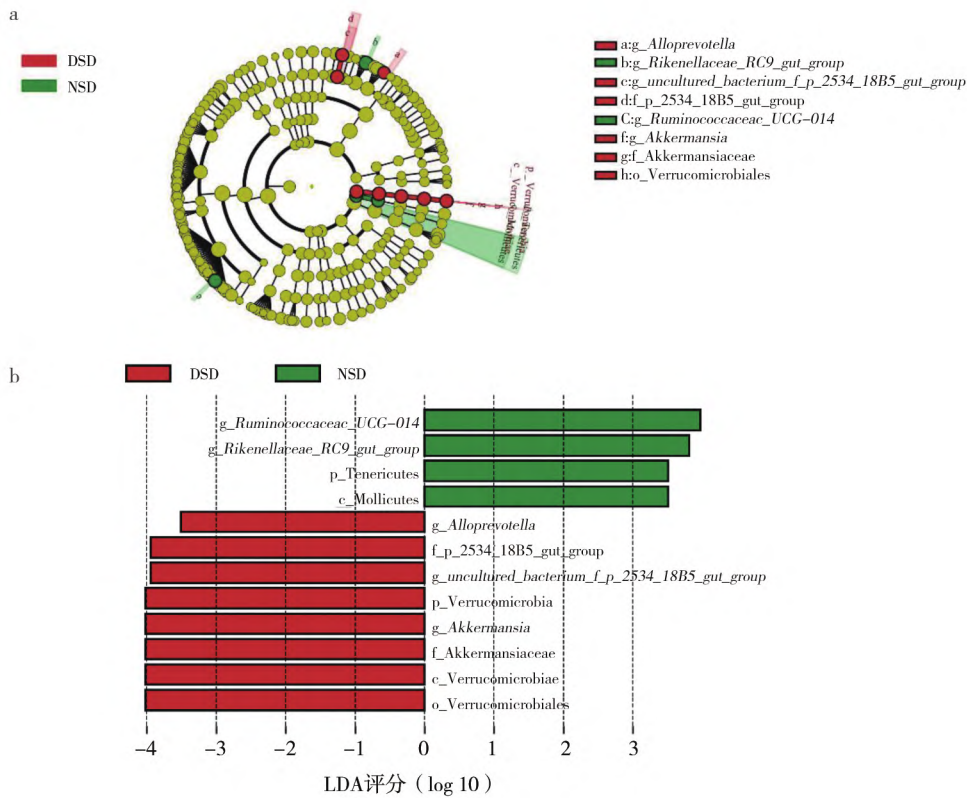


图 7 健康组( MSD) 及腹泻组( DSD) 梅花鹿肠道菌群 LEfSe 分析

Fig. 7 LEfSe analysis about intestinal microbiota of healthy( MSD) and diarrhea sika deer( DSD)

a: 进化分支图; b: LDA 值分布柱状图( LDA > 3.5)

a: Cladogram diagram; b: LDA value distribution histogram ( LDA > 3.5)

### 3 讨 论

本研究采用 16S rRNA 基因测序技术比较健康及腹泻梅花鹿粪便菌群,获得的稀释性曲线趋近平坦,且测序覆盖度(good coverage)均超过 99%,说明本研究的测序数据能够体现样本中的绝大部分物种。Alpha 多样性和 Beta 多样性分析结果表明,腹泻组和健康组菌群组成存在显著差异,且腹泻组菌群相对丰度和多样性均显著低于健康组,符合腹泻组肠道菌群结构趋于简单的结论<sup>[6]</sup>,这与林麝(*Moschus berezovskii*)<sup>[12]</sup>、仔猪(*Sus scrofa domestica*)<sup>[13]</sup>、小鼠(*Mus musculus*)<sup>[14]</sup>等研究结果一致。研究表明,健康个体的肠道菌群相对丰度和多样性较高,其肠道微生态系统具有一定的稳定性和恢复性,可维持肠道菌群的动态平衡,保障肠道的正常生理功能。而腹泻组肠道菌群相对丰度和多样性的降低,说明其动态平衡已遭到破坏,这可能是导致腹泻的原因。

实验梅花鹿无论是否腹泻,厚壁菌门和拟杆菌门均为粪便菌群中的优势菌,这与 Yamano 等<sup>[15]</sup>在北海道野生梅花鹿和田鑫等<sup>[16]</sup>在野生及圈养梅花鹿上的研究一致。厚壁菌门与拟杆菌门参与纤维素分解产生短链脂肪酸和肠道免疫调节<sup>[17]</sup>,其中,厚壁菌门与拟杆菌门的比值(F/B ratio)的平衡对维持正常肠道内环境稳定及肠道健康有重要影响,该比值的增加或降低被认为是菌群失调,后者通常被认为与炎症性肠病有关<sup>[18]</sup>。腹泻组 F/B 比值低于健康组,意味着腹泻组肠道内环境失衡,菌群失调。在科水平上,瘤胃菌科隶属厚壁菌门,是健康组及腹泻组的优势菌科,功能为分解纤维素。理研菌科是健康组次优势菌科,具有肠道保护功能,属于有益菌<sup>[19]</sup>,而腹泻组的理研菌科丰度下降,螺旋体科丰度上升为次优势菌科。螺旋体科属于螺旋体门,多为致病菌或条件致病菌<sup>[20]</sup>,如短螺旋体属可感染多种哺乳动物,诱导产生结肠炎,发生腹泻<sup>[21-22]</sup>。在属水平上,瘤胃菌科 UCG-005 菌属是健康组和腹泻组的优势菌属。克里斯滕森菌科 R-7 菌属是健康组的次优势菌属,属于克里斯滕森菌科,被认为是健康肠道特征的五个分类群之一,可产生丁酸。丁酸不仅是结肠上皮细胞的主要能量来源,还具有抗炎特性,能下调促炎细胞因子,改善结肠黏膜

屏障功能<sup>[8]</sup>。有研究表明,在肠道快速运动及炎症状态下,克里斯滕森菌科丰度逐渐下降<sup>[23]</sup>。这与腹泻梅花鹿肠道中克里斯滕森菌科 R-7 菌属丰度下降的结果一致。*Treponema\_2* 菌属在腹泻组丰度增加,属于螺旋体门。有研究显示,*Treponema\_2* 菌属可能在肠道通透性中发挥一定作用,进而影响肠道屏障和肠道炎症<sup>[24]</sup>。可见,腹泻组肠道菌群稳态失衡,有益菌丰度下降,有害菌或条件致病菌丰度上升,这将进一步加剧肠道炎症,从而形成恶性循环。

LEfSe 分析表明,腹泻与健康梅花鹿粪便菌群的丰度存在显著差异,但前者粪便并未发现丰度显著变化的大肠埃希菌(*Escherichia coli*)或志贺氏菌(*Shigella castellani*)等常见致病菌,这与大多数腹泻研究结果相异。因此推测本研究的腹泻梅花鹿可能是菌群紊乱导致的生理性腹泻。同时,腹泻梅花鹿疣微菌门的相对丰度显著增加,这与唐磊<sup>[25]</sup>对腹泻仔猪研究结果一致。肠道疣微菌门可降解黏蛋白<sup>[26]</sup>,而黏蛋白是肠道粘液行使限制细菌穿透,保护上皮细胞功能的主要成分<sup>[27]</sup>。黏蛋白含量的降低导致肠道屏障功能下降,进而增大了病原微生物入侵的可能性,这意味着疣微菌门可能推动了腹泻进程的发展。此外,健康组瘤胃球菌科 UCG-014 菌属和理研菌科 RC9 菌属显著高于腹泻组,而拟普雷沃氏菌属、阿克曼氏菌属显著低于腹泻组。其中,瘤胃球菌属是主要的纤维素降解菌,可降解纤维物质产生乙酸。瘤胃球菌科 UCG-014 菌属可能参与挥发性脂肪酸代谢,为机体提供能量<sup>[28]</sup>。理研菌科 RC9 菌属属于理研菌科,通常发酵碳水化合物或蛋白质<sup>[29]</sup>,参与机体能量代谢。这表明健康组的纤维消化率和能量利用率高于腹泻组,腹泻导致机体消化功能下降,腹泻时拟普雷沃氏菌属丰度增加,这与前人对仔猪的研究一致<sup>[30-31]</sup>。有研究显示,拟普雷沃氏菌属的某些菌株能够产生适量的醋酸和大量的琥珀酸作为发酵最终产物<sup>[32]</sup>。这些短链脂肪酸被认为是维持肠道内稳态的关键。腹泻状态下,拟普雷沃氏菌属丰度增加似乎是为维持肠道菌群平衡和调节肠道生理活动,以防止其他细菌丰度减少进一步损害肠道<sup>[31]</sup>。阿克曼氏菌属属于疣微菌门,可降解黏蛋白,是肠腔与黏膜间的关键菌群<sup>[33]</sup>,推测其丰度变化可能与黏蛋白含



量相关<sup>[34]</sup>,且该菌可激活调节性 T 细胞和杯状细胞<sup>[33]</sup>维持机体免疫稳态和促进黏液产生。因此,我们推测,肠道免疫反应被激活,杯状细胞分泌大量粘液促使阿克曼氏菌丰度增加。随着黏蛋白的大量消耗,势必导致黏液层变薄,肠道屏障功能减弱。这点在前人研究中有所证实,小鼠体内阿克曼氏菌在其他菌群和碳水化合物耗尽后大量繁殖,导致远端结肠黏液层变薄<sup>[35]</sup>。这种过度的黏蛋白降解不仅会产生有毒代谢物(尤其是氨、酚、吲哚、胺、硫化物和 N-亚硝基化合物),还会促进机会性病原体 and 促炎性细菌的大量繁殖,很可能导致肠炎类疾病<sup>[36-37]</sup>。若不及时加以干预,个体的生理性腹泻将会向病理性腹泻转变,加剧肠道内环境失衡。

值得注意的是,本研究在采样时正处于冬春之交,气候变化剧烈的时期,每日昼夜温差可达 12℃ 以上。推测尽管此时环境菌群尚不活跃,较大的气温变化可能影响饮水和多汁精料的温度,在不考虑病毒和寄生虫的情况下,可能引发梅花鹿肠道菌群失调进而导致生理性腹泻。鹿场技术人员也表示,每年梅花鹿在这一时期腹泻频发。因此,认为每年的冬末春初时期,需要关注鹿群的饮水和饲料的温度,预防发生腹泻,提高鹿场饲养管理水平,保证鹿场的正常运作和健康发展。同时,鹿场饲养员应注意在腹泻发生时,不能盲目使用抗生素,需要对症下药。对于这种生理性腹泻,若盲目使用抗生素,很可能进一步加剧菌群紊乱,导致病情加重<sup>[38]</sup>。有研究者表明使用益生菌等微生态制剂能够调整宿主菌群结构,恢复肠道稳态,改善肠道发育和健康<sup>[39]</sup>。在之后的研究中可以进一步关注微生态制剂对于腹泻鹿只菌群的影响。

本研究认为较大的昼夜温差可引发梅花鹿肠道菌群失调进而导致生理性腹泻,同时腹泻梅花鹿肠道中疣微菌门及其门下的阿克曼氏菌属丰度的升高可能推动腹泻进程,这可为鹿场提高梅花鹿饲养管理水平、防控腹泻提供参考。同时,利用微生态制剂改善梅花鹿肠道菌群,恢复菌群平衡,可进行进一步的探讨和研究。

#### 参考文献:

[1] 曾德军,吴忠宝,赵贵军,等. 梅花鹿腹泻病的病因及防治

对策[J]. 畜禽业 2015, 26(8): 90-91.

- [2] 黄海娇. 梅花鹿腹泻治疗的误区及其对策[J]. 饲料博览, 2019, 32(12): 69.
- [3] Huang G, Ye L, Du G, et al. Effects of curcumin plus soy oligosaccharides on intestinal flora of rats with ulcerative colitis [J]. Cellular & Molecular Biology 2017, 7(63): 20-25.
- [4] Nagashima K, Yasokawa D, Abe K, et al. Effect of a *Lactobacillus* species on incidence of diarrhea in calves and change of the microflora associated with growth: full paper [J]. Bioscience & Microflora 2010, 29(2): 97-110.
- [5] Zhang J, Chen SL, Li LB. Correlation between intestinal flora and serum inflammatory factors in patients with Crohn's disease [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences 2017, 21(21): 4913-4917.
- [6] 张飞燕,金洁,刘超,等. 利用 Illumina MiSeq 测序平台分析健康与腹泻食蟹猴粪样菌群[J]. 野生动物学报 2019, 40(3): 595-601.
- [7] Tang WJ, Chen DW, Yu B, et al. Capsulized faecal microbiota transplantation ameliorates post-weaning diarrhoea by modulating the gut microbiota in piglets [J]. Veterinary Research, 2020, 51(1): 55.
- [8] Liu H, Liu WD, Huang XL, et al. Intestinal flora differences between patients with ulcerative colitis of different ethnic groups in China [J]. Medicine 2021, 100(32): e26932.
- [9] 任平,夏天,李平,等. 脾虚腹泻患者肠道菌群的研究[J]. 中医杂志, 1992, 33(6): 33-34.
- [10] 张子敬,朱肖亭,吕世杰,等. 腹泻犊牛与健康犊牛粪便菌群结构组成与功能研究[J]. 中国畜牧兽医 2020, 47(9): 2779-2788.
- [11] 杨柠芝,李婷,王燕,等. 断奶前后非特异病原性腹泻羔羊生长生理及肠道菌群差异性比较[J]. 中国农业科学, 2021, 54(2): 422-434.
- [12] Li YM, Hu XL, Yang S, et al. Comparison between the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic captive musk deer [J]. Frontiers in Microbiology 2018, 9(1): 300.
- [13] 汪群,闫鹤. 腹泻仔猪与健康仔猪粪便菌群多样性的比较[J]. 中国畜牧杂志 2019, 55(8): 106-110.
- [14] He L, Long CX, Liu YJ, et al. Effects of *Debaryomyces hansenii* treatment on intestinal microorganisms in mice with antibiotics-induced diarrhea [J]. 3 Biotech 2017, 7(5): 347.
- [15] Yamano H, Ichimura Y, Sawabe Y, et al. Seasonal differences in rumen bacterial flora of wild Hokkaido sika deer and partial characterization of an unknown bacterial group possibly involved in fiber digestion in winter [J]. Animal Science Journal 2019, 90(6): 790-798.
- [16] 田鑫,田来明,贾赦,等. 野生和圈养梅花鹿肠道菌群的分析[J]. 黑龙江畜牧兽医 2020, 44(18): 138-140.
- [17] Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases [J]. Frontiers in Microbiology 2016, 7(1): 1081.

- [18] Stojanov S, Berlec A, Atrukelj B. The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. *Microorganisms* 2020, 8 (11): 1715.
- [19] 高岩, 殷术鑫, 王璐, 等. 饲喂酸化乳对犊牛粪便微生物多样性的影响 [J]. *动物营养学报* 2020, 32(5): 2427-2439.
- [20] 杨东吉, 张静静, 朱随亮, 等. 酿酒酵母培养物替代抗生素对断奶仔猪生长性能、养分消化率及盲肠微生物区系的影响 [J]. *动物营养学报* 2020, 32(1): 138-147.
- [21] Norris SJ. Hiding in plain sight: colonic spirochetosis in humans [J]. *Journal of Bacteriology* 2019, 201(21): e00465-19.
- [22] Råsbäck T, Jansson DS, Johansson KE, et al. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. [J]. *Environmental Microbiology* 2007, 9(4): 983-991.
- [23] Waters JL, Ley RE. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health [J]. *BMC Biology* 2019, 17(1): 83.
- [24] Sun LL, Jia HM, Li JJ, et al. Cecal gut microbiota and metabolites might contribute to the severity of acute myocardial ischemia by impacting the intestinal permeability, oxidative stress, and energy metabolism [J]. *Frontiers in Microbiology* 2019, 10(1): 1745.
- [25] 唐磊. 利用 16S rDNA 测序技术分析腹泻仔猪肠道菌群结构特征及灌服粪肠球菌对其调节作用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [26] Loudon AH, Woodhams DC, Parfrey LW, et al. Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*) [J]. *The ISME Journal* 2014, 8(4): 830-840.
- [27] Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins [J]. *Nature Reviews Immunology* 2016, 16(10): 639-649.
- [28] 曾钰, 高彦华, 彭忠利, 等. 饲料中添加酵母培养物对舍饲牦牛瘤胃发酵参数及微生物区系的影响 [J]. *动物营养学报* 2020, 32(4): 1721-1733.
- [29] Su XL, Tian Q, Zhang J, et al. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 2014, 64(9): 2986-2991.
- [30] 徐莉, 刘影, 张江, 等. 健康与腹泻梅花山仔猪粪便微生物变化分析 [J]. *饲料研究* 2021, 44(11): 70-74.
- [31] He K, Yan WC, Sun CY, et al. Alterations in the diversity and composition of gut microbiota in weaned piglets infected with *Balantidium coli* [J]. *Veterinary Parasitology* 2020, 288(1): 109298.
- [32] Downes J, Dewhirst FE, Tanner ACR, et al. Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneri* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneri* gen. nov., comb. nov. [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 2013, 63(4): 1214-1218.
- [33] Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions [J]. *Microbial Pathogenesis* 2017, 106(1): 171-181.
- [34] Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, et al. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract [J]. *Gut Microbes* 2010, 1(4): 254-268.
- [35] Kristen AE, Gabriel B, Michael S, et al. Quantitative imaging of gut microbiota spatial organization [J]. *Cell Host & Microbe* 2015, 18(4): 478-488.
- [36] Ganesh BP, Klopffleisch R, Loh G, et al. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella typhimurium*-infected gnotobiotic mice [J]. *PLOS ONE* 2013, 8(9): e74963.
- [37] Amaretti A, Gozzoli C, Simone M, et al. Profiling of protein degraders in cultures of human gut microbiota [J]. *Frontiers in Microbiology* 2019, 10(1): 2614.
- [38] Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, et al. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing [J]. *PLOS Biology* 2008, 6(11): e280.
- [39] Olajugbagbe TE, Odukoya SOA, Omafuvbe BO. Evaluation of the effects of *Pediococcus acidilactici* isolated from wara, a Nigerian milk product, in the prevention of diarrhea and the modulation of intestinal microflora in Wistar rats [J]. *Asian Journal of Medicine & Health* 2020, 18(9): 94-106.