

引用格式:

翟少钦, 闫志强, 陈春林, 朱买勋, 唐红梅, 付文贵. 柔嫩艾美耳球虫感染对鸡盲肠菌群的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(3): 342–346.

ZHAI S Q, YAN Z Q, CHEN C L, ZHU M X, TANG H M, FU W G. Effect of *Eimeria tenella* infection on the caecal flora of chickens[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(3): 342–346.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



柔嫩艾美耳球虫感染对鸡盲肠菌群的影响

翟少钦^{1,2}, 闫志强¹, 陈春林¹, 朱买勋¹, 唐红梅¹, 付文贵^{1,2*}

(1.重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2.重庆市养猪工程技术研究中心, 重庆 402460)

摘要: 将 60 只健康罗曼粉鸡随机分为正常组和模型组, 每组 30 只, 模型组灌服 1×10^4 个孢子化卵囊进行人工复制鸡球虫病模型, 正常组灌服等体积生理盐水, 感染 5 d, 剖杀试验鸡, 无菌采集鸡盲肠内容物, 并通过 Illumina PE250 型高通量测序仪对肉鸡盲肠内菌群进行 16S rDNA 基因 V3–V4 可变区检测, 对肠道菌群可操作分类单元(OTUs)数、 α 多样性、 β 多样性及差异菌门与菌属进行综合性分析与评价, 探究柔嫩艾美耳球虫感染对鸡盲肠菌群结构和多样性的影响。结果表明: 与正常组相比, 感染柔嫩艾美耳球虫后鸡肠道菌群的 OTUs 数、Chao1 指数极显著降低, Shannon 指数显著降低, Simpson 指数显著升高; 门水平上, 模型组变形菌门的相对丰度极显著升高, 而厚壁菌门的相对丰度显著降低, 拟杆菌门和柔膜菌门的相对丰度显著降低; 属水平上, 正常组的优势菌属为拟杆菌属、瘤胃菌属–UCG014、副拟杆菌属, 而模型组瘤胃球菌属–uncultured、球藻菌属、埃希菌–志贺菌属相对丰度极显著升高。可见, 艾美耳球虫破坏了盲肠菌群的完整性, 促进潜在致病菌的建立和生长, 尤其使埃希菌–志贺菌属大量繁殖, 快速生长。

关键词: 罗曼粉鸡; 柔嫩艾美耳球虫; 肠道菌群; 16S rDNA; 多样性; 相对丰度

中图分类号: S858.312.72⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1007–1032(2022)03–0342–05

Effect of *Eimeria tenella* infection on the caecal flora of chickens

ZHAI Shaoqin^{1,2}, YAN Zhiqiang¹, CHEN Chunlin¹, ZHU Maixun¹, TANG Hongmei¹, FU Wengui^{1,2*}

(1.Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China; 2.Chongqing Pig-Raising Engineering Technology Research Center, Chongqing 402460, China)

Abstract: 60 healthy Roman powder chickens were randomly divided into normal group and model group, 30 in each group with 30 chickens in each group. The model group was fed with 1×10^4 sporulated oocysts to artificially replicate the chicken coccidiosis model. The normal group was treated with normal saline. Five days after infection, the test chickens were sacrificed, the contents of the chicken cecum were collected aseptically, and the 16S rDNA gene V3–V4 variable region of the intestinal flora of the cecal contents of broilers was detected by Illumina PE250 high-throughput sequencer. Comprehensive analysis and evaluation of the number of operable taxonomic units(OTUs) of the intestinal flora, α and β diversity, as well as differences in phylum and genus, to study the effect of *Eimeria tenella* infection on the structure and diversity of chicken cecal flora. The results showed as follows: after infection with *Eimeria tenella*, the number of OTUs and the Chao1 index in the model group decreased extremely significantly, and Shannon index in the model group decreased significantly, the Simpson index increased significantly. The composition of the bacteria group: at the phylum level, the abundance of Proteobacteria in the model group was increased extremely significantly, while that of Firmicutes was reduced extremely significantly. At the genus level, the predominant bacteria in the normal group were *Bacteroides*,

收稿日期: 2020–05–21

修回日期: 2022–03–28

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0061); 重庆市现代山地特色高效农业技术体系创新团队建设项目(2018[5]号)

作者简介: 翟少钦(1973—), 女, 四川绵竹人, 硕士, 副研究员, 主要从事中兽药研究, zhaishaoqin@126.com; *通信作者, 付文贵, 高级兽医师, 主要从事动物疫病防控研究, 437695698@qq.com

Ruminococcaceae-UCG014, and *Parabacteroides*; in the model group, the relative abundance of *Ruminococcaceae_uncultured*, *Tyzzarella* and *Escherichia-Shigella* increased extremely significantly. *Eimeria tenella* disrupted the integrity of the cecal microbiota and promotes the establishment and growth of potentially pathogenic bacteria, especially the growth of *Escherichia-Shigella*.

Keywords: Roman powder chicken; *Eimeria tenella*; intestinal flora; 16S rDNA; diversity; relative abundance

鸡球虫病是由艾美耳属球虫感染引起的一种急性肠道寄生虫病, 发病率高达 80%, 死亡率为 20%~30%, 严重危害养鸡业的发展。每年支出的抗球虫药物成本在 6~8 亿元, 占鸡病防治总支出近三分之一^[1-3]。据报道, 全球每年因鸡球虫病造成的经济损失高达 20 亿英镑, 给养禽业带来了巨大的损失^[4-6]。研究^[7-9]发现, 寄生虫的侵染可导致畜禽肠道菌群失调, 肠功能障碍及生化稳态产生改变, 同时肠道菌群的多样性和结构的改变与寄生虫的毒力、定植及侵染有着密切关系。本研究中, 采用 16S rDNA 高通量测序技术分析鸡感染艾美耳球虫后盲肠菌群的结构和多样性变化, 从肠道微生物生态学角度阐释鸡感染艾美耳球虫的致病机理, 旨在为鸡球虫病的发病机制和防控技术研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试动物和虫株

60 只 1 日龄健康罗曼粉鸡购于重庆永川种鸡场。试验鸡饲喂于特制钢丝鸡笼内。鸡笼和用具提前进行火焰消毒。试验期间试验鸡自由采食, 饮水, 饲喂不含任何药物添加剂的饲料, 饲喂至 16 日龄备用。柔嫩艾美耳球虫由重庆市畜牧科学院兽医兽药研究所临床分离、保存。

1.2 主要试剂与仪器

TransGen AP221-02:TransStart Fastpfu DNA Polymerase 购自北京全式金生物有限公司; AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN; 细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。PE250 型高通量测序仪(Illumina); GeneAmpR 9700 型 PCR 扩增仪(ABI); 低温离心机(Eppendorf)。

1.3 试验设计

将 60 只 16 日龄的试验鸡随机分为正常组(ZC)和模型组(MX), 每组 30 只。模型组试验鸡每只经口灌服柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊 1×10^4 个; 正常组经口灌服等体积的生理盐水。灌服虫卵后第 5 天,

每组随机解剖 4 只, 无菌采集试验鸡盲肠内容物, 分别记为 ZC-1-1、ZC-1-2、ZC-1-3、ZC-1-4、MX-2-1、MX-2-2、MX-2-3、MX-2-4, 于液氮中速冻后放入 -80 °C 冰箱中保存, 备用。

1.4 肠道菌群 DNA 提取

采用细菌基因组提取试剂盒提取盲肠内容物样本中的微生物基因组 DNA, 具体步骤严格按照试剂盒说明书操作。

1.5 16S rDNA 基因 PCR 扩增及测序

根据细菌双高变 V3~V4 区基因序列, 由 Invitrogen 公司合成带有样本识别标记(barcode)的特异性引物: 341F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 扩增体系包括: 模板 DNA 10 ng, 正向和反向引物各 0.8 μ L, 5 \times Fast Pfu Buffer 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, Fast Pfu Polymerase 0.4 μ L, 灭菌双蒸水补至总体积 20 μ L。反应条件为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延长 30 s, 共 25 个循环; 最后 72 °C 延长 5 min, 4 °C 保存。PCR 扩增产物经纯化、定量和均一化形成测序文库, 送至上海中科新生命生物科技有限公司, 在 Illumina PE 250 平台上, 运用双末端测序的方法进行高通量测序。

1.6 测序数据分析

原始测序数据经拼接、质控和去除嵌合体序列后得到最终有效序列。在 97% 的相似度水平下使用 OTU 进行聚类, 获得操作分类单元 OTUs; 基于 Silva(细菌)和 UNITE(真菌)分类学数据库, 通过 RDP Classifier OTUs 进行分类学注释。置信度阈值 0.7。采用 QIIME 生成不同分类水平上的物种丰度表; 采用 Mothur 计算样本 α 多样性指数(Chao1、Shannon、Simpson); 采用基于 Weighted UniFrac 算法的主坐标分析(PCoA), 比较不同样本在物种多样

性方面存在的相似程度(β 多样性)。

1.7 统计分析方法

采用 SPSS 20.0 对数据进行单因素方差分析并进行组间差异性比较。

2 结果与分析

2.1 OTU 聚类与生物注释结果

本研究中, 所测样本通过测序共获得 744 947 对 reads, 通过拼接、质控过滤后共产生 699 848 条

有效序列。在 97% 的相似度水平下对序列进行聚类, 获得 606 个 OTUs, 其中正常组 543 个, 模型组 359 个, 两组共有 296 个。

2.2 鸡盲肠肠道菌群的丰富度和多样性变化

由表 1 可知, 与正常组相比, 模型组 OTUs 数和 Chao1 指数均极显著下降, Shannon 指数显著降低, Simpson 指数极显著升高。

表 1 供试鸡肠道菌群的丰富度和 α 多样性

Table 1 Intestinal microflora abundance and α diversity of the tested chickens

组别	OTUs 数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
正常组	420.50±16.11	471.13±28.83	4.36±0.14	0.036±0.011
模型组	(208.50±48.53)**	(270.04±58.80)**	(3.12±0.34)*	(0.128±0.052)**

“*”“**”“***”分别示两组间的差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。

2.3 鸡盲肠肠道菌群 β 多样性分析结果

由图 1 可知, PC1 和 PC2 对肠道菌群间差异的贡献百分数分别为 55.23% 和 33.90%, 模型组样本点与正常组样本点完全分开, 表明感染艾美耳球虫后鸡肠道菌群的整体结构与组成发生了较大的变化。

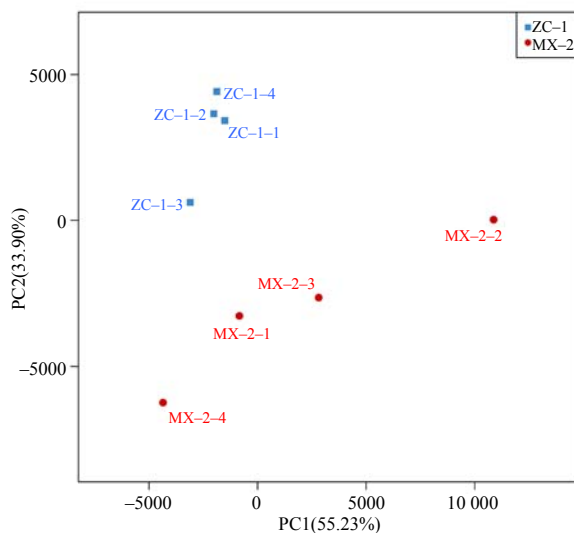


图 1 供试鸡肠道菌群的主坐标分析结果

Fig.1 Principal coordinate analysis result of intestinal flora of test chickens

2.4 感染艾美耳球虫后鸡肠道菌群结构及物种差异

由表 2 可知, 在门水平上, 所有样本中共检测到拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、

变形菌门(Proteobacteria)和柔膜菌门(Tenericutes)等 4 个优势细菌门。正常组以厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌群, 所占比例分别为 68.24% 和 28.09%; 模型组以厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门为优势菌群, 所占比例分别为 59.31%、20.22% 和 18.29%。在门水平, 与正常组相比, 模型组变形菌门的相对丰度极显著升高, 拟杆菌门和柔膜菌门的相对丰度极显著降低, 厚壁菌门的相对丰度显著降低。

表 2 供试鸡肠道菌群门水平上物种的相对丰度

Table 2 The relative abundance of species at the phylum level of the tested chicken

样品	相对丰度			
	Bacteroidetes	Firmicutes	Proteobacteria	Tenericutes
ZC-1-1	27.62	68.80	2.73	0.81
ZC-1-2	28.07	66.98	2.58	0.74
ZC-1-3	30.83	67.37	2.19	0.67
ZC-1-4	25.83	69.80	2.23	0.73
MX-2-1	24.03	62.22	17.41	0.11
MX-2-2	19.84	54.17	19.77	0.09
MX-2-3	16.74	65.41	17.75	0.08
MX-2-4	20.29	55.43	18.23	0.12
ZC 均值	28.09	68.24	2.43	0.74
MX 均值	20.22**	59.31*	18.29**	0.10**

“*”“**”“***”分别示两组间的差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。

由表 3 可知, 在属水平上, 正常组的优势菌属为拟杆菌属(*Bacteroides*)、瘤胃菌属-UCG014(*Ruminococcaceae* UCG-014)、副拟杆菌属(*Parabacteroides*)

和瘤胃菌属-uncultured (*Ruminococcaceae-uncultured*), 其中相对丰度超过 10% 的有拟杆菌、副拟杆菌属、瘤胃菌属-UCG014, 分别占 16.40%、11.45%、12.51%; 模型组中的拟杆菌属(*Bacteroides*)、埃希菌-志贺菌属(*Escherichia-Shigella*)、瘤胃菌属-uncultured(*Ruminococcaceae_uncultured*) 和球藻菌属(*Tyzzereella*)为优势菌属, 分别占 20.20%、16.75%、

14.95%、4.71%; 与正常组相比, 模型组瘤胃球菌属 UCG-014 的相对丰度极显著降低, 瘤胃球菌属-uncultured、球藻菌属、埃希菌-志贺菌属的相对丰度极显著升高, 且在模型组中未检测到副拟杆菌属(*Parabacteroides*)、瘤胃球菌属-NK4A214(*Ruminococcaceae NK4A214*)、嗜胆菌属(*Bilophila*)。

表3 供试鸡肠道菌群属水平上物种的相对丰度

Table 3 The relative abundance of species at the genus level of the tested chicken

样品	相对丰度								%
	<i>Bacteroides</i>	<i>Ruminococcaceae</i> UCG-014	<i>Ruminococcaceae-uncultured</i>	<i>Tyzzereella</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Bilophila</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Ruminococcaceae</i> NK4A214	
ZC-1-1	15.40	12.32	5.64	0.46	0.05	1.46	11.94	1.36	
ZC-1-2	15.69	11.52	4.45	0.29	0.27	1.51	11.99	2.66	
ZC-1-3	24.04	16.13	3.88	0.18	0.07	0.64	11.64	1.49	
ZC-1-4	10.47	10.10	3.86	0.50	0.11	1.43	10.23	1.77	
MX-2-1	24.03	0.02	15.83	4.86	13.04	0.00	0.00	0.00	
MX-2-2	19.84	0.01	15.00	5.42	16.75	0.00	0.00	0.00	
MX-2-3	16.73	0.00	15.10	5.04	16.40	0.00	0.00	0.00	
MX-2-4	20.20	0.01	13.86	3.53	20.81	0.00	0.00	0.00	
ZC 均值	16.40	12.51	4.44	0.36	0.13	1.26	11.45	1.82	
MX 均值	20.20	0.04**	14.95**	4.71**	16.75**	0.00	0.00	0.00	

“***”示两组间的差异极显著($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

肠道菌群是长期定植于动物胃肠道、参与宿主的新陈代谢、多酚的生物转化、肠道免疫调节及病原体排除的一类共生微生物。肠道菌群可通过促进机体细胞因子, 如 TNF- α 、IL-6 的生成, 进而阻止病原微生物在肠道的定植和入侵^[10-11]。宿主与肠道菌群的共生构成了一个微生态系统, 在维持肠道稳态和调节宿主免疫系统方面起着重要作用。同时, 肠道菌群的改变可直接或间接地影响寄生虫的定植和感染状态等^[12-14]。本研究中, 供试鸡感染柔嫩艾美耳球虫后, 鸡盲肠菌群的 OTUs 数、Chao1 指数极显著降低, Shannon 指数显著降低, 表明感染柔嫩艾美耳球虫后试验鸡盲肠菌群的丰富度和多样性降低。

本研究中, 从门、属水平对感染柔嫩艾美耳球虫后肠道菌群的研究发现, 在门水平, 正常组厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌群, 模型组厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门为优势菌群。在属水平, 正常组优势菌属为拟杆菌属、瘤胃球菌属-UCG014、副拟杆菌属和瘤胃菌属-uncultured; 柔嫩艾美耳球虫感

染后, 拟杆菌属、瘤胃球菌属-uncultured、埃希菌-志贺菌属的相对丰度明显升高, 副拟杆菌属明显降低, 推测可能是柔嫩艾美耳球虫的侵染造成机体肠道黏膜损伤, 改变了鸡盲肠的微生物定植区域环境, 促进潜在致病菌的建立和生长, 如变形菌门中埃希菌-志贺菌属大量繁殖, 占比高达 16.75%。

志贺菌属是引起全球范围内细菌性痢疾的重要病原菌。鸡源志贺菌可引起不同品种、不同日龄的鸡发生腹泻, 并可导致雏鸡死亡^[15]。本研究结果表明, 感染艾美耳球虫后, 变形菌门的相对丰度极显著升高, 尤其是埃希菌-志贺菌属极显著升高, 由正常组的 0.13% 升高到模型组的 16.75%, 这可能是试验鸡腹泻便血的原因之一。同时, 从模型组盲肠内容物微生物菌群中未检出嗜胆菌属和副拟杆菌属, 而这 2 个菌属主要产生短链脂肪酸(如乙酸、乳酸、琥珀酸等), 抵御炎症反应, 降低炎症水平。短链脂肪酸是肠上皮细胞的能量来源, 产酸微生物减少, 会导致肠道 pH 值升高, 有害微生物大量繁殖, 肠道内环境的稳定紊乱, 盲肠菌群的丰富度和多样性发生变化^[16-17], 这可能是引起肠道组织结构发生炎性细胞浸润、上皮细胞胞内可见大量虫体、

上皮细胞坏死脱落、上皮层充血或出血等病变的主要原因, 雏鸡临床表现为采食量下降、腹泻, 甚至出现血便^[18-19]。

综上所述, 柔嫩艾美耳球虫破坏了鸡盲肠菌群的完整性, 改变了鸡盲肠的微生物组成和结构, 促进潜在致病菌的建立和生长, 尤其使变形菌门中埃希菌-志贺菌属大量繁殖, 快速生长。

参考文献:

- [1] 毕菲菲, 郝振凯, 孙霏, 等. 鸡球虫病防治药物及抗药性研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(4): 242-253.
- [2] 郭志廷, 梁剑平, 韦旭斌. 常山、常山碱及其衍生物防治鸡球虫病的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(8): 1382-1386.
- [3] 张艳冰, 许笑, 古少鹏, 等. 柔嫩艾美耳球虫感染对雏鸡肠道紧密连接相关蛋白表达的影响[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(6): 746-752.
- [4] SOUTTER F, WERLING D, TOMLEY F M, et al. Poultry coccidiosis: design and interpretation of vaccine studies[J]. *Frontiers in Veterinary science*, 2020, 7(4): 101.
- [5] 李超, 顾小龙, 卢春霞, 等. 我国鸡球虫病流行病学研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(4): 230-241.
- [6] 汤新明, 索勋, 刘贤勇. 集约化养殖模式下鸡球虫病的防控[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(4): 279-286.
- [7] WHITE E C, HOULDEN A, BANCROFT A J, et al. Manipulation of host and parasite microbiotas: survival strategies during chronic nematode infection[J]. *Science Advances*, 2018, 4(3): 7399.
- [8] ROOKS M G, VEIGA P, WARDWELL-SCOTT L H, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(7): 1403-1417.
- [9] 陈祎琦, 马天, 秦元华, 等. 寄生虫与肠道微生物群落的相互作用[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(2): 246-249.
- [10] 王海昆, 崔旻, 姚萍. 肠道菌群变化对肠上皮细胞 Myd88 蛋白及炎症因子的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(9): 1004-1007.
- [11] 黄艳芬, 刘湘红, 伍浩, 等. 肠黏膜屏障与肠道菌群的相互关系[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(12): 1465-1469.
- [12] SCHNEEBERGER P H H, COULIBALY J T, PANIC G, et al. Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome[J]. *Parasites & Vectors*, 2018, 11: 168.
- [13] 徐梦, 沈玉娟. 蠕虫及肠道原虫感染与肠道菌群关系研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(1): 77-85.
- [14] 周永春, 王坤轮, 闫亚群, 等. 肠道寄生虫与菌群互作关系研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(10): 2876-2881.
- [15] 王硕. 鸡源多重耐药药志贺氏菌病的流行病学调查[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [16] 李龙, 蒋守群. 球虫感染对鸡肠道的损伤及其营养调控研究进展[J]. 中国家禽, 2017, 39(20): 47-53.
- [17] WANG X H, ZOU W B, YU H L, et al. RNA sequencing analysis of chicken cecum tissues following *Eimeria tenella* infection in vivo[J]. *Genes*, 2019, 10(6): 420-431.
- [18] ZHOU B H, JIA L S, WEI S S, et al. Effects of *Eimeria tenella* infection on the barrier damage and microbiota diversity of chicken cecum[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(3): 1297-1305.
- [19] CHEN H L, ZHAO X Y, ZHAO G X, et al. Dissection of the cecal microbial community in chickens after *Eimeria tenella* infection[J]. *Parasites & Vectors*, 2020, 13: 56.

责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳正