

# 腹泻驴驹与健康驴驹粪便微生物多样性比较分析

崔嘉琪, 刘文华, 张 灿, 邹 玲, 任慧英\*  
(青岛农业大学 动物医学院, 山东 青岛 266109)

中图分类号: S822

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2023)05-0123-08

**摘要:**为了探究腹泻驴驹与健康驴驹粪便微生物多样性及结构组成差异,筛选出腹泻驴驹的特异性菌群,试验采集同等饲养条件下的腹泻驴驹和健康驴驹的粪便样本各5份,利用16S rRNA高通量测序技术,对腹泻驴驹和健康驴驹粪便在微生物多样性方面(结构和组成)存在的差异进行比较。结果表明:腹泻驴驹粪便微生物的多样性小于健康驴驹( $P>0.05$ )。与健康驴驹相比,在门水平上,厚壁菌门相对丰度显著减少( $P<0.05$ ),且梭杆菌门仅出现在腹泻驴驹粪便中;在属水平上,腹泻驴驹粪便微生物中拟杆菌属相对丰度明显升高。说明腹泻驴驹与健康驴驹在粪便微生物多样性方面存在显著差异,厚壁菌门相对丰度减少及拟杆菌属相对丰度增加可能是驴驹腹泻的重要原因。

**关键词:** 驴驹; 粪便微生物; 腹泻; 16S rRNA; 高通量测序技术

开放科学(资源服务)标识码  
Open Science Identity (OSID)



驴驹腹泻是驴驹的一种顽固性疾病,主要发生于出生到2月龄。超过50%的驴驹在出生后的6个月内会出现一次或多次腹泻,临床症状各不相同,粪便稠度可以呈水状到糊状,颜色不同,可能含有血液和凝乳块;当病情加重时,可能发生卧位、昏迷和死亡<sup>[1]</sup>。在30日龄以下的腹泻驴驹中,有多达50%表现为菌血症<sup>[2]</sup>。近年来,我国的驴产业发展迅速,驴驹腹泻的发病率也相应增加。驴驹腹泻对驴养殖产业影响巨大,造成严重的经济损失并阻碍养驴业的健康发展。因此,明确驴驹腹泻的病因对驴驹腹泻的治疗及防控至关重要。

驴的肠道是一个复杂、动态的微生物生态系统,由数百种常驻和暂居细菌、原生动物和真菌组成<sup>[3]</sup>。共生菌和致病菌分布在结肠中,其中革兰氏阴性杆菌占多数(50%),其次是革兰氏阳性杆菌(23%)、革兰氏阳性球菌(22%),革兰氏阴性球菌(4%)最少。厌

氧菌也非常丰富,在后肠发酵中起着至关重要的作用。在健康的马属动物体内,正常菌群必须与致病菌竞争以维持微妙的平衡,这种平衡很容易被各种环境破坏。研究表明,随着季节变化和饮食改变,肠道微生物组成也会发生变化。在集中饲喂条件下保持驴的健康是营养学家和兽医必须面临的挑战,需要兽医工作者更好地了解驴肠道微生物生态系统的复杂性,以及大型多样微生物群落之间、微生物与宿主动物之间的相互作用;另外,饮食对微生物的影响也同样重要。

近年来,高通量测序技术的大力发展推动了整个肠道菌群结构和功能基因组学的发展<sup>[4-6]</sup>。随着Illumina HiSeq技术平台的发展,运用16S rRNA技术全面反映肠道微生物的群落结构特征成为一个趋势<sup>[7]</sup>。为了更深入了解腹泻驴驹肠道菌群结构的变化情况,本试验分别测定了健康驴驹和腹泻驴驹粪便中微生物16S rRNA V3~V4区序列,并对其菌群结构和多样性进行比较分析,以为揭示驴驹腹泻的发病机理提供数据支撑。

## 1 材料

1月龄健康和腹泻驴驹粪便样本各5份,采自山东聊城某规模化养殖场。所有样本用于冰保存运输

收稿日期:2022-04-12; 修回日期:2022-12-18

基金项目:山东省产业技术体系驴产业创新团队项目(SDAIT-27)

作者简介:崔嘉琪(1997—),男,硕士研究生,研究方向为噬菌体治疗,752206457@qq.com.

\*通信作者:任慧英(1968—),女,教授,博士,研究方向为噬菌体治疗,renren0228@sina.com.



回实验室, -80 °C 冰箱中保存。

## 2 方法

### 2.1 样品的检测

将健康和腹泻驴驹粪便样本分为健康组和腹泻组并送至上海派森诺生物科技有限公司进行测序。首先对总细菌提取 DNA, 然后对样本 16S rDNA V3~V4 区进行 PCR 扩增, 通用引物序列为 338F 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3', 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。用纯化后的扩增产物构建文库, 构建好的文库经检测合格后, 在 Illumina MiSeq/HiSeq 平台上进行测序。

### 2.2 数据的处理和分析

用 Illumina MiSeq/HiSeq 平台对群落 DNA 片段进行双端 (Paired-end) 测序。使用 QIIME2 和 Vsearch 等分析软件对数据进行过滤, 剔除低质量数据, 通过 DADA2 方法<sup>[8]</sup> 进行去引物、去噪、质量过滤、去嵌合体与拼接工作, 通过 Vsearch 软件<sup>[9]</sup> 进行功能基因的分析。对整体概况进行了解, 展示各样本间的不同物种分类学水平的具体组成, 通过 QIIME2 软件的 classify-sklearn 算法<sup>[10]</sup> 和 BROCC 算法<sup>[11]</sup> 对物种进行整体注释分析。使用 mafft 程序<sup>[12]</sup> 进行多序列对齐, 并隐藏无系统发育信息的部分, 通过 FastTree 程序<sup>[13]</sup> 构建系统发育树, 最终获得基于聚类结果的多样性分析与基于注释结果的各分类水平物种组成信息。

### 2.3 粪便细菌微生物多样性分析

2.3.1 细菌微生物 OTUs 比较 使用 ASV/OTU 丰度表制作韦恩图, 根据各样本组间情况分别统计各个集合的成员数, 探究物种分布差异所导致的微生物群落组成上的差异。

2.3.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性是指局部均匀生境下的物种在丰富度、多样性和均匀度等方面的指标, 也被称为生境内多样性。使用 QIIME2 软件对物种 Alpha 多样性进行分析, 以 Chao1 指数表征丰富度, 并以 Simpson 和 Shannon 指数表征多样性。对两组数据 Alpha 多样性指数进行差异显著性分析, 两组间的显著差异性通过 Student's *t*-test 进行检验。

2.3.3 Beta 多样性分析 Beta 多样性是指沿着环境梯度变化的不同群落之间物种组成的相异性或物种沿着环境梯度变化的更替速率, 因此也被称为生境间多样性 (between-habitat diversity)。使用 QIIME2 软件通过主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 等非约束排序手段对多维微生物数据进行降维处理, 并通过在连续排序轴的分布展示数据变化的主要趋势。

### 2.4 微生物结构组成分析

依据序列物种分类学注释结果统计物种注释结果中每个分类水平各自含有的分类单元的数量。

## 2.5 微生物结构差异分析

LEfSe (LDA Effect Size) 分析是一种将非参数的 Kruskal-Wallis 及 Wilcoxon 秩和检验与线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 效应量 (Effect size) 相结合的分析手段<sup>[14]</sup>。

利用 LEfSe 分类学分支图可以直观展示腹泻驴驹和健康驴驹微生物群落从门到属主要分类单元的分类等级关系。本试验利用 LEfSe 分类学分支图将腹泻驴驹和健康驴驹两组样本中分类单元的平均相对丰度以节点大小的形式在图中呈现, 且分类单元的显著差异性以不同节点填充颜色进行展示, 从而直观展示两组样本的微生物结构差异。

## 3 结果与分析

### 3.1 粪便细菌微生物序列及多样性分析

3.1.1 数据预处理统计及质量控制 腹泻及健康驴驹粪便 DNA 片段经过测序、拼接与过滤, 共有有效序列 806 544 条, 其中最小样本序列数为 65 329 条。样本的序列数及质量良好, 满足后续分析要求。

3.1.2 细菌微生物 OTUs 比较 使用 ASV/OTU 丰度表制作韦恩图, 结果见 138 页彩图 1。

由 138 页彩图 1 可知, 健康组与腹泻组共有 11 994 个 OTUs, 其中 620 个 OTUs 为两组所共有, 健康组所有样本中有 6 178 个独有的 OTUs, 腹泻组则有 5 196 个独有的 OTUs。

3.1.3 微生物群落 Alpha 多样性分析 结果见表 1。

表 1 Alpha 多样性分析结果

Table 1 Results of Alpha diversity analysis

项目	健康组	腹泻组	<i>P</i> 值
Chao1 指数	1 583.0 ± 327.4	1 319.0 ± 333.7	0.58
Simpson 指数	0.843 7 ± 0.069 5	0.916 4 ± 0.029 8	0.36
Shannon 指数	5.526 ± 0.846	5.731 ± 0.786	0.75

由表 1 可知, 健康组 Chao1 指数高于腹泻组, Simpson 和 Shannon 指数均低于腹泻组, 两组间均差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 表明健康组驴驹粪便微生物多样性高于腹泻组, 但差异无统计学意义。

3.1.4 微生物群落 Beta 多样性分析 结果见图 2。

PCoA 图可以反映不同样本间菌群的差异, 菌群组成越相似, 在图上的距离越近。由图 2 可知, 健康组驴驹粪便菌群明显聚集, 而腹泻组驴驹粪便菌群分布较分散, 且与健康组距离较远, 表明驴驹发生腹泻后粪便微生物结构发生明显改变。

### 3.2 组间粪便微生物结构组成分析

3.2.1 门分类学水平 结果见 139 页彩图 3。

由 139 页彩图 3A 经计算可知, 健康组驴驹粪便中, 厚壁菌门 (Firmicutes) 为优势菌, 约占总细菌的 85.78%。腹泻组驴驹粪便中, 厚壁菌门

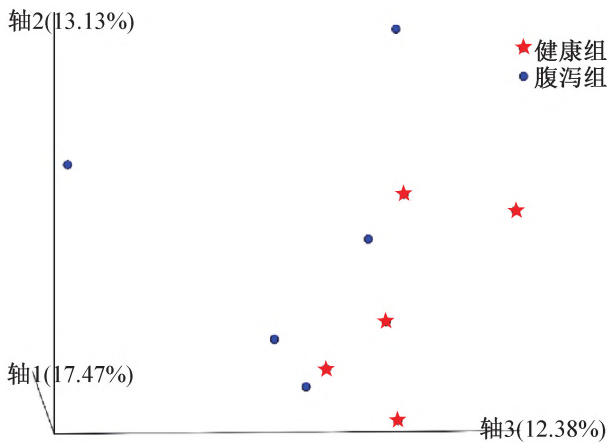


图2 距离矩阵与PCoA分析结果

Fig. 2 Distance matrix and PCoA analysis results

(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和梭杆菌门(Fusobacteria)为优势菌,约占总细菌的86.89%。其中,与健康组相比,腹泻组中厚壁菌门所占比例下降至51.43%,对两组厚壁菌门相对丰度差异性进行Student's *t*-test 检验,结果(见139页彩图3B)差异极显著( $P < 0.01$ );拟杆菌门所占比例上升,由8.08%上升至23.47%;梭杆菌门仅出现在腹泻组中,所占比例为11.99%。疣微菌门在健康组中占比为1.69%,在腹泻组中上升为8.60%;变形菌门在两组中占比变化很小,健康组中为2.25%,腹泻组中为2.96%。

3.2.2 科分类学水平 结果见139页彩图4。

由139页彩图4经计算可知,在健康组驴驹粪便中,乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)和链球菌科(Streptococcaceae)为优势菌,约占总细菌的71.80%。腹泻组驴驹粪便中,乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)和拟杆菌科(Bacteroidaceae)为优势菌,约占总细菌的55.69%。健康组与腹泻组毛螺菌科和疣微菌科相比占比相差不大,与健康组相比,腹泻组乳酸杆菌科下降了9.75个百分点,链球菌科下降了24.20个百分点,拟杆菌科上升了13.89个百分点。

3.2.3 属分类学水平 结果见139页彩图5。

由139页彩图5经计算可知,健康组驴驹粪便中,乳酸菌属(*Lactobacillus*)和链球菌属(*Streptococcus*)为优势菌,约占总细菌的55.69%。腹泻组驴驹粪便中,乳酸菌属、拟杆菌属(*Bacteroides*)和阿克曼菌属(*Akkermansia*)为优势菌,约占总细菌36.21%。健康组中占比最高的是链球菌属,腹泻组中占比最高的是拟杆菌属。链球菌属在健康组占比为25.54%,在腹泻组中占比为1.36%,下降了24.18个百分点。拟杆菌属在健康组占比为3.98%,在腹泻组占比为

17.88%,上升了13.90个百分点。另外,阿克曼菌属在健康组占比为1.69%,在腹泻组占比为8.26%,增长了6.57个百分点。

### 3.3 粪便微生物结构差异分析

结果见140页彩图6。

根据LEfSe分析,分类学分支图展示了样本群落中从门到属主要分类单元的分类等级关系。由140页彩图6可知,健康组粪便菌群中的厚壁菌门(Firmicutes)、红蝽菌纲(Coriobacteria)、红蝽菌目(Coriobacteriales)、伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales)相比腹泻组差异显著( $P < 0.05$ )。而腹泻组中互养菌门(Synergistetes)、互养菌纲(Synergistia)、巴斯德氏菌目(Pasteurellales)、互养菌目(Synergistales)相比健康组差异显著( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论与结论

动物肠道内有大量微生物,马属动物的肠道微生物群在马属动物的健康中发挥着至关重要的作用<sup>[15-16]</sup>。驴驹腹泻会造成肠道微生态失调,引起肠道菌群结构的变化<sup>[17]</sup>。本试验采用16S rRNA高通量测序技术全面评估驴驹粪便菌群,结果表明腹泻驴驹粪便菌群多样性低于健康驴驹,这与M. Pop等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。正常运作的肠道和微生物群对维持驴的健康至关重要,驴肠道菌群对各种疾病发生、药物使用及饲料改变非常敏感,肠道菌群的失调可能是导致腹泻的重要原因。

本试验中,健康驴驹粪便中的优势菌为厚壁菌门(85.78%),与Chen L.等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。驴驹腹泻后,其粪便菌群中梭杆菌门的相对丰度显著增加,变形菌门的相对丰度也有增加,而厚壁菌门相对丰度显著减少。驴的大肠是一个厌氧发酵室,其中的细菌分解纤维素产生短链脂肪酸,提供了驴的大部分能量需求。厚壁菌门可产生短链脂肪酸<sup>[20]</sup>,该菌门中有益菌占大多数,这些有益菌在腹泻驴驹粪便中的相对丰度显著减少,导致肠道抑制病原体黏附和抗炎能力减弱,可能与腹泻发生相关。

另外,变形菌门包括很多病原体,如埃希氏菌属、沙门氏菌属和螺杆菌属。作为动物肠道共栖菌和条件致病菌的大肠杆菌在临床上可引起幼畜腹泻,严重者可导致败血症<sup>[21-23]</sup>。作为一种条件致病菌,大肠杆菌通常是动物肠道微生物的正常组成成分,然而某些血清型的大肠杆菌也与农场动物甚至宠物的腹泻密切相关<sup>[24]</sup>,例如O8、O45、O147、O149和O157等血清型的产肠毒素型大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)都可引起动物腹泻<sup>[25]</sup>。

拟杆菌属主要参与碳水化合物等营养物质的代谢及维持肠道正常的生理功能,其中的主要致病菌是脆弱拟杆菌,该属细菌含有脆弱拟杆菌肠毒素(*Bacteroides fragilis* enterotoxin, BFT),它是一种锌金



属蛋白酶,可通过切割钙黏蛋白来破坏肠上皮中黏着小带的紧密连接,导致上皮细胞肌动蛋白细胞骨架的重排和紧密连接的丢失,结果该屏障泄露并导致腹泻<sup>[26]</sup>。据报道,细菌感染是导致新生马驹腹泻的最常见原因,超过50%的新生马驹会在前6个月至少发生1次腹泻<sup>[27]</sup>,因此此次驹腹泄可能与细菌感染相关。

综上所述,本试验利用16S rRNA高通量测序技术,对腹泻和健康驹粪便样本在生物多样性方面存在的差异进行了比较,某些菌群特异性的增加或减少可作为评价驹腹泄的参考指标,本试验结果为驹腹泄的治疗及预防提供了依据。

### 参考文献:

- [1] BROUX B, LEFERE L, DEPREZ P, et al. Plasma exchange as a treatment for hyperbilirubinemia in 2 foals with neonatal isoerythrolysis [J]. J Vet Intern Med, 2015, 29(2):736-738.
- [2] FREDERICK J, GIGUERE S, SANCHEZ L C. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008) [J]. J Vet Intern Med, 2009, 23(6):1254-1260.
- [3] CHAPMAN A M. Acute diarrhea in hospitalized horses [J]. Vet Clin North Am Equine Pract, 2009, 25(2):363-380.
- [4] 王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1):109-114.
- [5] GOPALAKRISHNAN V, HELMINK B A, SPENCER C N, et al. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy [J]. Cancer Cell, 2018, 33(9):570-580.
- [6] SCHMIDT T S B, RAES J, BORK P. The human gut microbiome: from association to modulation [J]. Cell, 2018, 172(6):1198-1215.
- [7] JIANG X T, PENG X, DENG G H, et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland [J]. Microb Ecol, 2013, 66(1):96-104.
- [8] CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data [J]. Nat Methods, 2016, 13(7):581-583.
- [9] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. PeerJ, 2016, 4:e2584.
- [10] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing [J]. Nat Methods, 2013, 10(1):57-59.
- [11] NILSSON R H, RYBERG M, KRISTIANSSON E, et al. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective [J]. PLoS One, 2006, 1(1):e59.
- [12] KATO H, MISAWA K, KUMA K, et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(14):3059-3066.
- [13] PRICE M N, DEHAL P S, ARKIN A P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix [J]. Mol Biol Evol, 2009, 26(7):1641-1650.
- [14] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome Biol, 2011, 12(6):R60.
- [15] COSTA M C, ARROYO L G, ALLEN - VERCOE E, et al. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene [J]. PLoS One, 2012, 7(7):e41484.
- [16] STEWART H L, PITTA D, INDUGU N, et al. Changes in the faecal bacterial microbiota during hospitalisation of horses with colic and the effect of different causes of colic [J]. Equine Vet J, 2021, 53(6):1119-1131.
- [17] JEFFERY I B, QUIGLEY E M, OHMAN L, et al. The microbiota link to irritable bowel syndrome: an emerging story [J]. Gut Microbes, 2012, 3(6):572-576.
- [18] POP M, WALKER A W, PAULSON J, et al. Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition [J]. Genome Biol, 2014, 15(6):R76.
- [19] CHEN L, XU Y, CHEN X, et al. The maturing development of gut microbiota in commercial piglets during the weaning transition [J]. Front Microbiol, 2017, 8:1688.
- [20] ROSELLI M, FINAMORE A, BRITTI M S, et al. The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage [J]. J Nutr, 2007, 137(12):2709-2716.
- [21] HEBBELSTRUP J B, OLSEN K E, STRUVE C, et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli* [J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(3):614-630.
- [22] HERZOG K, ENGELER D J, HUGENTOBLE M, et al. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis [J]. Infection, 2014, 42(2):441-444.
- [23] 冯培祥, 杨莉, 庄桂玉, 等. 致驹腹泄大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(6):90-92,97.
- [24] AGUS A, DENIZOT J, THÉVENOT J, et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to adherent-invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation [J]. Sci Rep, 2016, 6:19032.
- [25] CUI J Q, LIU W H, ZANG Y X, et al. Characterization and complete genome analysis of a bacteriophage vB\_EcoM\_DE7 infecting donkey-derived *Escherichia coli* [J]. Virus Res, 2022, 321:198913.
- [26] WU S, LIM K C, HUANG J, et al. Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(25):14979-14984.
- [27] MAGDESIAN K G. Neonatal foal diarrhea [J]. Vet Clin North Am Equine Pract, 2005, 21(2):295-312.

(下转第131页)



- [12] WEIBEL E R, BOLENDER R P. Stereological techniques electronic microscope morphometry[J]. Princ Tech Electron Microsc, 1973, 3: 239-283.
- [13] WEIBEL E R. Stereological methods, Practical methods for biological morphometry[J]. Med Chem, 1979, 1: 30-37.
- [14] 郑富盛. 细胞形态立体计量学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1990.
- [15] WILLIAMS M A. Quantitative methods in biology, in practical methods in electron microscopy[J]. North-Holland, 1977, 6: 51-52.
- [16] KIESSLING A, ASGARD T, STOREBAKKEN T, et al. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age: III. Chemical composition[J]. Aquaculture, 1991, 93:335-356.
- [17] SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis[J]. Nature, 1992, 359(6398):843-845.
- [18] 李月明. 甘肃鼯鼠低氧适应研究[D]. 西安:陕西师范大学,2007.
- [19] WIDMER H R, HOPPELER H, NEVO E, et al. Working underground: Respiratory adaptations in the blind mole rat [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1997, 94(5): 2062-2067.
- [20] COSTA L E, BOVERIS A, KOCH O R, et al. Liver and heart mitochondria in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia[J]. Am J Physiol, 1988, 255(1):C123-9.
- [21] 齐新章,王晓君,朱世海,等. 高原鼯鼠和高原鼠兔心脏对低氧环境的适应[J]. 生理学报,2008,60(30): 348-354.

## Histological characteristics of myocardial hypoxic adaptation in *Marmota himalayana*

LI Lin<sup>1</sup>, QIN Hongnan<sup>1</sup>, ZHOU Juan<sup>1</sup>, WAN Ruidong<sup>1</sup>, SHEN Shiju<sup>2</sup>, ZHANG Qinwen<sup>1\*</sup>

(1. Department of Animal Medicine, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Province Haidong Center for Animal Disease Control and Prevention, Haidong 814000, China)

**Abstract:** In order to clarify the histological characteristics of the myocardium of *Marmota himalayana* adapted to the hypoxic environment at high altitude, in this study, five adult *Marmota himalayana* were selected as subjects, and SD rats were used as control. The myocardium tissue of left ventricle was used to study the myocardium muscle fiber diameter and surface area density. Immunohistochemical methods were used to measure vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvascular density (MVD) in myocardial tissue, and electron microscopy was used to measure some structural parameters of Myocardial mitochondria, including average volume, surface density, volume density, etc. The myocardial muscle fiber diameter of *marmota himalaya* was smaller than that of SD rats, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ), while the myocardial muscle fiber surface area density of *Marmota himalaya* was larger than that of SD rats, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). The VEGF content and MVD levels of *Marmota himalaya* were higher than those of SD rats and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). The mean cross-sectional area and mean volume of myocardial mitochondria of *Marmota himalaya* were smaller than those of SD rats, and the differences were significant ( $P < 0.05$ ). The volume density and surface number density of myocardial mitochondria of *Marmota himalaya* were higher than those of SD rats, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). These results indicated that compared with SD rats, the myocardial characteristics of *Marmota himalayana* were smaller diameter of muscle fibers, larger surface area density, and higher content of VEGF and MVD. The myocardial mitochondria showed small mean volume, high surface density and high volume density. The myocardial muscle of *Marmota himalaya* had the histological characteristics of adaptation to low oxygen environment in high altitude.

**Keywords:** *Marmota himalayana*; cardiac muscle; hypoxia adaptation; histological features; mitochondria

(020)

(上接第126页)

## Comparative analysis of fecal microbial diversity between diarrhea foals and healthy foals

CUI Jiaqi, LIU Wenhua, ZHANG Can, ZOU Ling, REN Huiying\*

(College of Veterinary medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The purpose of this experiment was to explore the difference of fecal microbial diversity and structural composition between healthy donkey foals and donkey foals with diarrhea. The specific bacterial community of donkey foals with diarrhea was screened. Five fecal samples were collected from diarrhea foals and five from healthy foals under the same feeding conditions. 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to compare the differences in microbial diversity (structure and composition) between feces from diarrhea foals and from healthy foals. The results showed that the diversity of fecal microorganisms of diarrhea donkey foals was less than that of healthy donkey foals. At the taxonomic level, the relative abundance of *Firmicutes* decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and *Fusobacteria* only appeared in the faeces of donkey foals in the diarrhea group. At the genus level, compared with the healthy group, the genus relative abundance of *Bacteroidetes* in the faeces of donkey foals in the diarrhea group was significantly higher. It indicated that there were significant differences in fecal microbial diversity between diarrhea donkey foals and healthy donkey foals. The decrease of relative abundance of *Firmicutes* and the increase of relative abundance of *Bacteroidetes* might be important reasons for foal diarrhea.

**Keywords:** foals; fecal microorganism; diarrhea; 16S rRNA; high-throughput sequencing

(020)

· 动物保健品研究 ·

## 空心莲子草醇提物抗 AIV-H9N2 作用的研究

(作者郑新等,正文见 117-122 页)

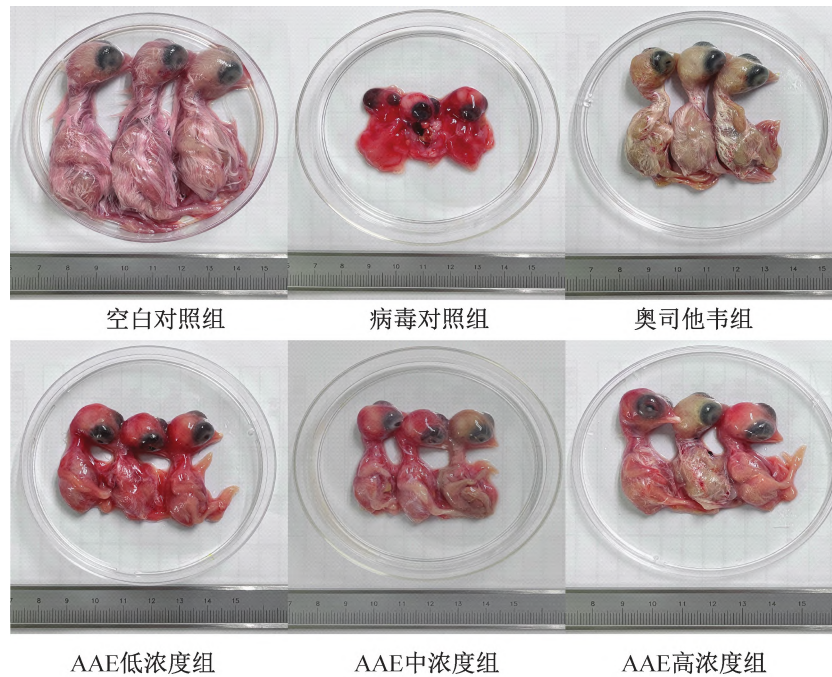


图 2 AIV-H9N2 感染鸡胚病理变化结果

Fig. 2 Pathological changes results of chickens embryos infected with AIV-H9N2

· 特种动物研究 ·

## 腹泻驴驹与健康驴驹粪便微生物多样性比较分析

(作者崔嘉琪等,正文见 123-126,131 页)

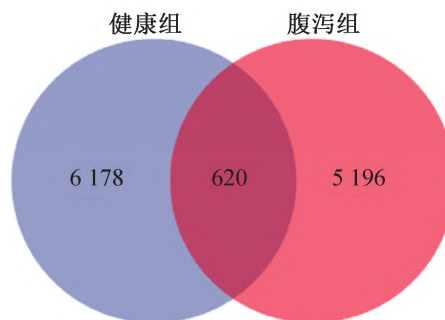


图 1 腹泻驴驹与健康驴驹粪便微生物 OTUs 分布结果

Fig. 1 Results of fecal microbe OTUs distribution in diarrhea and healthy donkey foals

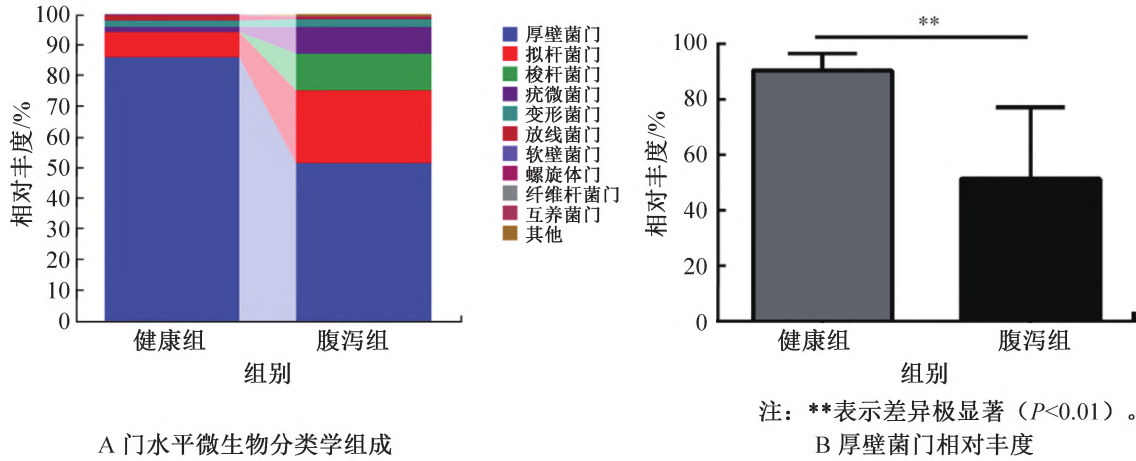


图3 门水平微生物结构组成测定结果

Fig. 3 Determination results of microbial structure composition at phylum level



图4 科水平微生物分类学组成测定结果

Fig. 4 Determination results of taxonomic composition determination of microorganisms at family level

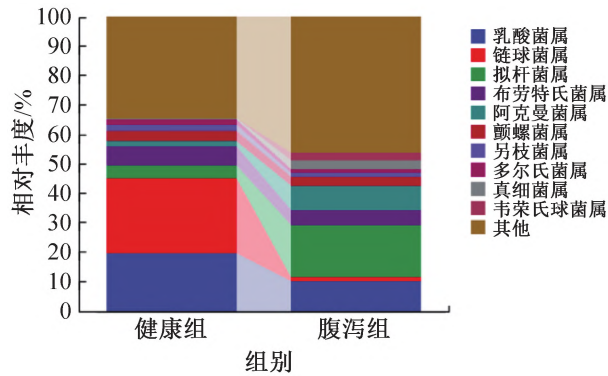
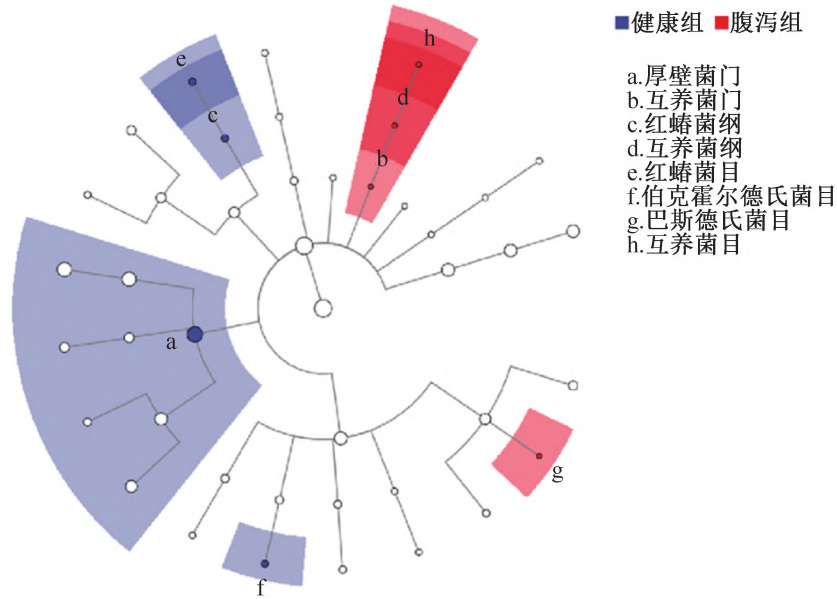


图5 属水平微生物分类学组成测定结果

Fig. 5 Determination results of taxonomic composition determination of microorganisms at genus level



注:节点大小表示该分类单元平均相对丰度的高低;空心节点表示组间差异不显著的分类单元,蓝色和红色的节点表示组间差异显著的分类单元,且在该色所代表分组样本中相对丰度较高。字母表示存在显著差异的分类单元名称。

图6 腹泻驴驹与健康驴驹粪便 LefSe 分析结果

Fig. 6 LEfse analysis results of feces of diarrhea donkey foals and healthy donkey foals

· 特种动物研究 ·

## 喜马拉雅旱獭心肌低氧适应的组织学特点

(作者李琳等,正文见 127-131 页)

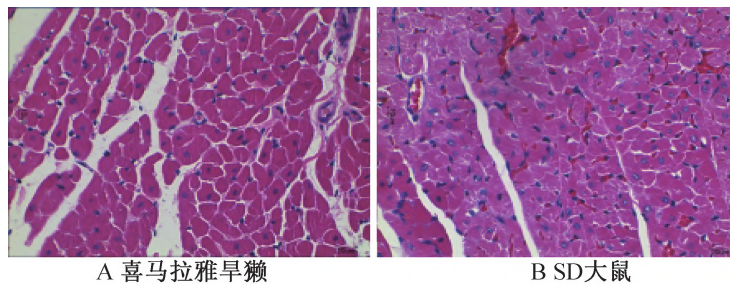


图2 心肌结构的检测结果(H. E. 染色,400×)

Fig. 2 Results of myocardial structure examination(H. E. staining,400×)

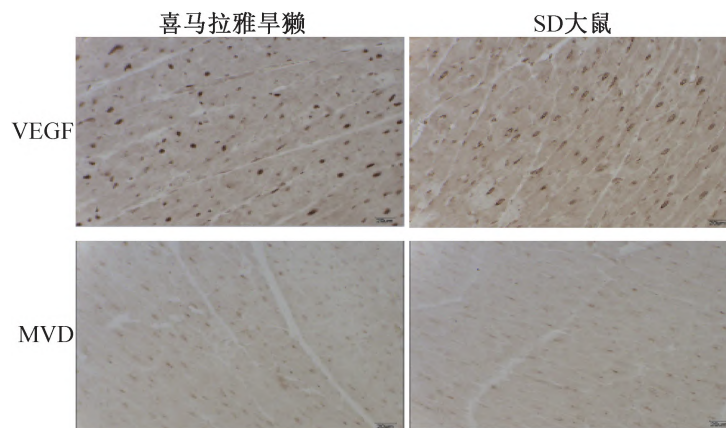


图4 心肌免疫组织化学染色结果(400×)

Fig. 4 Results of myocardial immunohistochemical staining(400×)