

孙静,陈奕龄,丁玉春,等. 环境空气暴露对猪粪悬液中菌群及代谢物的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 606-617.
Sun J, Chen YL, Ding YC, et al. Effects of aerobic and anaerobic FMT preparation on fecal microbiota and metabolite profiles in swine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 606-617.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.007

环境空气暴露对猪粪悬液中菌群及代谢物的影响

孙静^{1,2,3,4}, 陈奕龄^{1,2,3,4}, 丁玉春^{1,2,3,4}, 葛良鹏^{1,2,3,4}*

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460;
3. 重庆市养猪科学重点实验室, 重庆 402460; 4. 重庆市医用动物资源开发与利用工程技术研究中心, 重庆 402460)

【摘要】 目的 研究环境空气暴露对制备的粪悬液中微生物及代谢物的影响。**方法** 收集无特定病原体级巴马小型猪粪便:(1)未处理组(C组);(2)有氧暴露处理组(T1组);(3)厌氧暴露处理组(T2组)。利用扩增子测序技术和非靶向代谢组比较各组粪样的微生物群落组成及代谢产物。**结果** (1)T1和T2组粪悬液制备操作均保存了新鲜粪便中(C组)的全部细菌门,仍以厚壁菌门和拟杆菌门细菌为主,但显著降低了密螺旋体属细菌的丰度;(2)猪粪便中以子囊菌门、担子菌门真菌为主,粪悬液制备显著提高了猪粪便中子囊菌门真菌的丰度;有氧暴露处理去除了猪粪便中节单菌属真菌。(3)LC-MS结果显示:正负离子模式下各识别出402、195种代谢物,其中T1:C代谢集、T2:C代谢集的差异代谢物分别为155和201个。**结论** 猪粪悬液制备时间虽然不长,但有氧暴露对样本中真菌群落丰度的影响高于厌氧暴露,都显著地降低 *Treponema* 和 *Spirochaetes* 等有害菌群和相关代谢产物的丰度,提高了FMT的安全性。

【关键词】 有氧暴露;厌氧暴露;粪悬液制备;SPF猪;粪便菌群;代谢物图谱

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0606-12

Effects of aerobic and anaerobic FMT preparation on fecal microbiota and metabolite profiles in swine

SUN Jing^{1,2,3,4}, CHEN Yiling^{1,2,3,4}, DING Yuchun^{1,2,3,4}, GE Liangpeng^{1,2,3,4}*

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China. 2. Key Laboratory of Pig Industry Science, Ministry of Agriculture, Chongqing 402460. 3. Chongqing Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Chongqing 402460.
4. Technical Engineering Center for the Development and Utilization of Medical Animal Resources, Chongqing 402460)

Corresponding author: GE Liangpeng. E-mail: geliangpeng1982@163.com

【Abstract】 Objective Fecal microbiota transplantation (FMT) is a promising, but immature intervention in the current pig production. The aim of this study was to investigate the effects of aerobic and anaerobic FMT preparation (T1 group and T2 group, respectively) on fecal microbiota and metabolite profiles of SPF Bama mini pigs. **Methods** Amplicon sequencing and untargeted metabolomics method were used to reveal the effects of aerobic and anaerobic FMT preparation (T1 group and T2 group, respectively) on fecal microbiota and metabolite profiles of SPF Bama mini pigs. **Results** (1) The two FMT preparation method preserved all the bacterial phyla in untreated pig slurries (C group). *Firmicutes* and *Bacteroidetes* constituted the top two phyla in the gut microbiota in all groups, and FMT preparation resulted in a significant decrease of *Treponema* bacteria. (2) In untreated pig slurries, the two most abundant fungal phyla were *Ascomycota* and *Basidiomycota*. FMT preparation significantly increased the relative abundance of *Ascomycota*, and aerobic FMT preparation removed the *Wallemia* genus. These changes in microbial community did not affect the functional contributions.

【基金项目】 重庆市科研机构绩效激励引导专项(19238,20524),重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0413)。

Funded by Performance Incentive Guidance for Scientific Research Institution of Chongqing Science & Technology Commission(19238,20524), the National Natural Science Foundation for Surface Project of Chongqing(cstc2020jcyj-msxmX0413)。

【作者简介】 孙静(1985—),女,副研究员,博士,研究方向:无菌动物的培育与应用。Email:sunjing85026@163.com

【通信作者】 葛良鹏(1982—),男,研究员,博士,研究方向:动物资源的创新化利用。Email:geliangpeng1982@163.com

(3) A total of 402 and 195 characteristic metabolites were respectively detected by positive and negative mode liquid chromatography-mass spectrometry, including Lipids and lipid molecules, and Organoheterocyclic compounds. Disturbance of amino acid metabolism, and lipid metabolism were the most significant in T1 versus C comparison, and T2 versus C comparison, 155 and 201 confirmed differential metabolites using reference compounds were identified, respectively. Highly positive correlated metabolites with Spearman correlation coefficient $r > 0.6$ are connected with *Treponema_2* in T1 versus C and T2 versus C comparisons, and highly negative correlated metabolites with $r < -0.4$ are connected with *Ruminococcaceae_NK4A214* group in T1 versus C and T2 versus C comparisons. **Conclusions** Although the FMT preparation time is short, the effect of short aerobic exposure on the abundance of fungal communities in the samples was higher than that of short anaerobic exposure, and the relative abundance of harmful bacteria such as *Treponema* and *Spirochaetes* and related metabolites were effectively reduced, which could improve the safety of FMT.

【Keywords】 aerobic exposure; anaerobic exposure; FMT preparation; SPF pigs; fecal microbiota; metabolite profile

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

目前,粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)已成为干预微生物组的主要手段之一。微生物组的可变性为 FMT 等治疗性干预措施提供了希望,但也可能引起了严重的安全隐患。由于肠道微生物生态系统的复杂性高,无目的地干预措施可能会将微生物组转移为不期望的状态,反而给健康带来更意想不到的后果。比如,抗性基因的传播^[1-2]、产气荚膜梭菌感染^[3]等不良事件的发生。供体的选择、供体粪便的处理方式、受试者的准备、移植方式和次数等都可能影响 FMT 的疗效。目前,用于复发性 CDI 治疗的 FMT 并无统一的标准和监管,不同国家的政策差别较大^[4]。在丹麦, Jørgensen 等^[5]采取了比较严格的供体筛选方法,包括病史、体格检查、血液、粪便以及尿液检查,仅约 20% 的参与者符合捐赠粪便资格。Ramai 等^[6]根据 PubMed、MEDLINE、Google Scholar 和 Cochrane 数据库上 FMT 相关研究,推论证实 FMT 的成功并不取决于供体-患者的关系; Allegretti 等^[7]对 1924 例 FMT 治疗艰难梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)的数据进行分析,发现粪便运输时间和粪便冻存时间对 FMT 疗效的影响差异不明显:粪便处理时长超过 150 min,并未显著降低 FMT 的疗效;当粪便冻存时长超过 1 年甚至 3 年时, FMT 的疗效与冻存 30 d 内的效果相似。

同样是杂食动物,猪与人在消化道解剖学和生理学特征方面具有相似性。最近多项研究还利用无菌猪模型实现了动物肠道菌群“拟人化”的能力。比如, Zhang 等^[8]对无菌仔猪接种成人和婴儿的粪便悬液,成功模拟了成人和婴儿的肠道微生物群落结构;接种患有严重急性营养不良和中度急性营养不良的儿童粪便悬液构建悉生猪模型,揭示了共生

肠道菌群与宿主健康生长存在因果关系,阐明了治疗儿童营养不良的方法^[9]。此外,肠道微生物组与宿主动物的共同进化,它在营养消化与利用、抵御病原体、调节免疫和内分泌等方面发挥的微生物作用,促使养猪生产对 FMT 这一策略的应用也产生了兴趣。比如,通过比较常规饲养猪和悉生猪或无菌猪的生理和代谢参数等来研究肠道微生物的作用^[10];或使用 FMT 作为提高生猪饲料利用率的可能策略等^[11]。Hu 等^[12]以金华猪为例,尝试利用 FMT 方式调节杂种新生仔猪肠道菌群结构,来改善肠道屏障和免疫功能。这些研究提示 FMT 在构建悉生猪模型上的应用广泛,那么,对影响 FMT 的相关因素开展研究就十分必要。供体选择、粪便样本的处理、粪菌移植方式、粪菌库建立以及安全性保障等是影响 FMT 实施和效果的几个关键因素。本研究以 SPF 猪作为供体,在有氧或厌氧下处理并制备得到粪便悬液,比较环境空气暴露对粪便悬液中微生物组和代谢产物的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

供体猪由重庆市畜牧科学院双河实验猪基地自繁获得【SCXK(渝)2018-0002】。在符合现行国标(GB 14925-2010)规定的屏障环境内饲养,自由采食和饮水【SCXK(渝)2018-0002】。参考 GB/T22914-2008《SPF 猪病原的控制与监测》标准,选择健康的 5 头成年雌性无特定病原级别(specific pathogen free, SPF)巴马小型猪(耳号分别为 13, 14, 69, 77, 78),体重约 50 kg,包括非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒、口蹄疫病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、乙型脑炎病毒、猪圆环

病毒 2 型、猪细小病毒、布鲁氏菌、猪肺炎支原体、猪流感病毒、猪弓形虫、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、轮状病毒在内的 13 种病原均为阴性。经重庆市畜牧科学院伦理委员会的许可(XKY-20150113),所有实验均在重庆市畜牧科学院重庆国家现代畜牧业示范区实验用猪工程中心完成(重庆荣昌)【SYXK(渝)2018-0002】。

1.1.2 供体猪粪便的收集

供体猪选定后,单栏饲养。采样当天清晨,打扫其圈舍至无明显残留粪污。采用无菌密封采样袋分别收集上述 5 头供体猪的新鲜粪便,每头各收集 3 份。其中 1 份直接放入液氮保存(未处理对照组,或称 C 组),1 份直接保存在低温运输箱(4℃)(有氧暴露组,或称 T1 组),剩余 1 份转入厌氧采样盒(由密封培养罐和厌氧培养应用袋制造厌氧环境,广东环凯微生物科技有限公司,中国),再保存于低温运输箱(4℃)(厌氧暴露组,或称 T2 组),在 30 min 内运回实验室进一步处理。

1.1.3 主要试剂与仪器

QIAamp DNA stool Mini Kit (QIAGEN 公司);AxyPreDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司);TruSeq™ DNA Sample Prep Kit;色谱柱为 BEH C18 柱(100mm×2.1mm i.d., 1.7μm; Waters, Milford, USA)。厌氧工作站(英国 DWS 公司,型号 DG250);洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司,型号 DL-CJ-2ND1);QuantiFlour™-ST 蓝色荧光定量系统(美国 Promega 公司);PCR 仪(美国 ABI, GeneAmp9700 型);高分辨液质联用仪 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统(赛默飞公司)。

1.2 方法

1.2.1 供体猪粪悬液的制备

猪供体粪便的处理上参考 Pang 等^[13]描述的方法。T1 组在超净台内(氮气约占 78%,氧气约为 21%)完成粪悬液的制备,T2 组在厌氧工作站内(纯氮气和无氧混合气体供应,氮气 > 80%,其余气体为氢气和二氧化碳)完成粪悬液的制备。制备过程在样品采集后 2 h 内完成。粪悬液的制备操作为:无菌密封匀浆袋内,新鲜粪便和灭菌水按照 1:5 的比例混合均匀,再通过 4 层灭菌医用纱布过滤,收集获得粪悬液。每头供体猪的新鲜粪便样品(约 2 g),各个粪悬液样品抽取 4 mL,用于细菌基因组的提取和非靶向代谢组分析;剩余粪悬液和灭菌甘油按照体积比 9:1 混合,分装成每管 1 mL,-80℃保存。

1.2.2 测序与分析

(1)扩增子测序:采用 CTAB/SDS 方法提取各

粪便样品的总基因组 DNA,然后用 338F/806R 引物扩增 16S rRNA 的 V3-V4 区域,ITS1F/ITS2R 引物对扩增真菌 ITS 区域。利用 Illumina Miseq 测序平台完成扩增子测序,微生物多样性和组成的确定参考之前的分析方法^[14]。

(2)非靶向代谢组:采用 LC-MS 分析平台(赛默飞公司,超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统)对 15 个猪粪便样品进行代谢组学分析。样品经过前处理去除杂质、提取代谢物,然后 LC-MS 正、负模式下分别上级检测采集信息,得到代谢物的 MS 和 MS/MS 信息,采用 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA) 软件进行搜库鉴定,将 MS 和 MS/MS 质谱信息与代谢数据库(<http://www.hmdb.ca/>; <http://metlin.scripps.edu/>)进行匹配,最终得到代谢物列表及数据矩阵。

1.2.3 数据分析

细菌和真菌功能预测分析:利用 Tax4Fun 对 16S RNA 基因序列进行 COG 和 KEGG 功能注释,获得 OTU 在 COG 和 KEGG 各功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。FUNGuild 用于真菌功能分类分析。

1.3 统计学分析

Student's *t* 检验用于比较 α 多样性(Shannon 指数和 Chao 指数)的组间差异;单因素方差分析用于比较组间微生物丰度差异;Heatmap 分析展示不同分组/样品在各分类学水平上的群落组成的相似性和差异性;组间差异检验采用 ANOSIM 分析方法;基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析展示各组样品之间的微生物总体分布和离散程度;PCA 用于观察各组样品之间的代谢物的总体分布和离散程度;PLS-DA 用于区分组间差异,变量重要性(variable importance, VIP) > 1 用于筛选出对模型贡献较大的变量。本研究以 VIP > 1 的变量作为差异代谢物或潜在标志物。采用 Student's *t* 检验结合 OPLS-DA 方法,筛选出组间差异代谢物(同时满足 VIP > 1, *P* < 0.05)。Spearman 相关系数 *r* 展示菌群组成与差异代谢物丰度上的相关关系。

2 结果

2.1 细菌组成与丰度比较

利用 338F/806R 引物对,对 C、T1 和 T2 这三组共 15 个样品中微生物群落测序,共获得 raw reads 645275 × 2,总碱基数目为 388 455 550;优化后有效序列数目为 645 275,有效碱基数目为 266 910 646;序列平均长度为 413.64 bp(见表 1)。

对 97% 相似水平下的细菌 OTUs 进行统计分析,15 个样品中共检出 1020 个 OTUs。C 组、T1 组和 T2 组检出的 OTUs 数目分别为 915、982 以及 968,其中 856 个 OTUs 在三组间共享。此外,FMT 制备操作(T1 或 T2 组)与 C 组在 Shannon 指数和 Chao 指数上组间差异显著($P < 0.05$,图 1A,1B),提示需氧或厌氧下供体猪粪便的 FMT 制备操作均提高了样品中菌群多样性。相似性分析(ANOSIM 检验)显示 R 值为 0.314($P=0.005$),表明组间差异大于组内差异,提示实验分组成立。PCoA 分析显示 T1 与 T2 组在猪粪便菌群结构上组间差异小,而与 C 组间差异明显(图 1C)。

FMT 制备操作保存了新鲜供体粪样中的全部细菌门,组间共享 18 种细菌门(图 2A)。其中,厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对平均丰度在 C、T1 和 T2 组中分别为 65.07%、62.39% 和 61.90%,其次为拟杆菌门

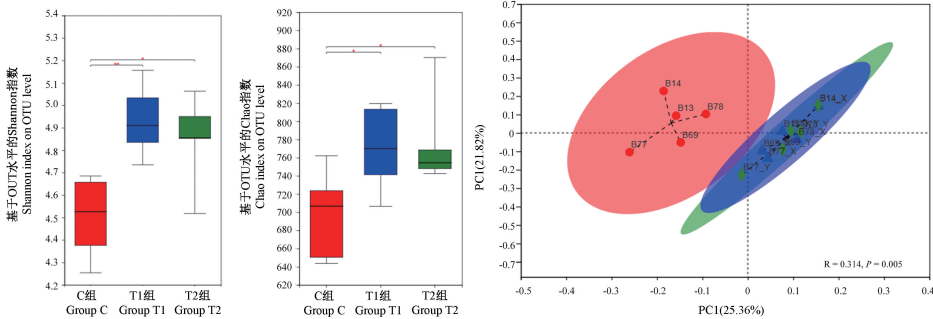
(*Bacteroidetes*),它在 C、T1 和 T2 组中相对平均丰度分别为 23.98%、32.72% 和 33.06%。FMT 制备操作后,大部分细菌门的丰度组间差异不明显($P > 0.05$),仅显著改变了黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)和互养菌门(*Synergistetes*)丰度($P = 0.035$ 和 $P = 0.002$)。两者在 C 组中的相对丰度极低,在 T1 组的相对平均丰度分别为 0.109% 和 0.037%,T2 组中分别为 0.019% 和 0.040%。值得注意的是,尽管螺旋体门(*Spirochaetes*)的丰度在组间差异不显著($P > 0.05$),但需氧下 FMT 制备操作后丰度从 8.34% 降低到 1.28%,厌氧下降低为 1.13%。该菌在 C 组各样本中丰度变化较大,从 2.18% ~ 13.28%。这提示,FMT 制备操作对猪粪便中的 *Spirochaetes* 丰度影响较大。Heatmap 分析显示 T1 和 T2 组菌落先聚类,再和 C 组聚类(图 2B)。

T1 和 T2 组间细菌属组成上无明显差异,但丰

表 1 基于 Illumina Miseq 测序平台的 16S rRNA V3-V4 测序结果

Table 1 Illumina Miseq sequencing of the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene

分组 Groups	样品号 Sample No.	序列数 Sequences	碱基数 (bp) Bases (bp)	平均长度 (bp) Average length (bp)
未处理对照组 (C 组) Untreated group (Group C)	B13	45 602	18 874 989	413.91
	B14	41 847	17 268 438	412.66
	B69	41 204	16 999 023	412.56
	B77	35 100	14 567 778	415.04
	B78	50 429	20 791 028	412.28
有氧暴露组 (T1 组) Aerobic FMT preparation (Group T1)	B13_X	43 238	17 857 477	413.00
	B14_X	35 740	14 829 723	414.93
	B69_X	47 934	19 896 852	415.09
	B77_X	47 291	19 421 394	410.68
	B78_X	38 284	15 884 911	414.92
厌氧暴露组 (T2 组) Anaerobic FMT preparation (Group T2)	B13_Y	41 589	17 189 225	413.31
	B14_Y	44 156	18 303 192	414.51
	B69_Y	39 474	16 367 520	414.64
	B77_Y	46 067	19 066 976	413.90
	B78_Y	47 320	19 592 120	414.03



注:A:基于 OTU 水平的 Shannon 指数组间差异检验结果;B:基于 OTU 水平的 Chao 指数组间差异检验结果;C:基于细菌属的 PCoA 分析结果; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 FMT 制备处理对 SPF 级猪粪便样品中细菌群落多样性的影响

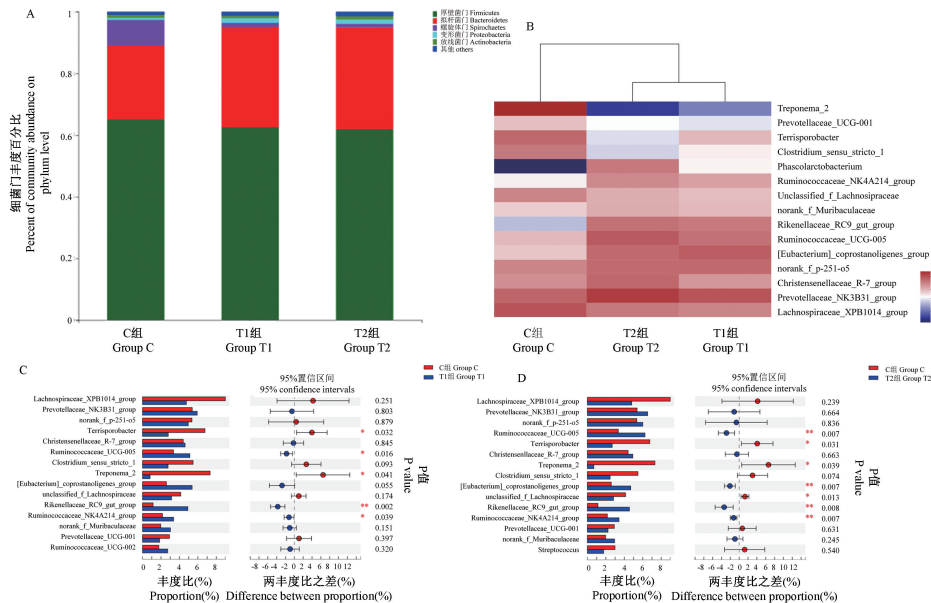
Note. A. Student's *t* test for Shannon index of OTU level. B. Student's *t* test for Chao index of OTU level. C. PCoA analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Influence of FMT preparation on bacterial community diversity in SPF pigs' fecal samples

度上差异明显。相对丰度较高的细菌属主要集中在 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes*, 比如 *Lachnospiraceae_XPB1014_group*, *Prevotellaceae_NK3B31_group*, *Ruminococcaceae_UCG_005*。和 C 组相比, T1 和 T2 组的 *Terrisporobacter*, *Treponema_2* 的丰度显著低于 C 组 ($P < 0.05$), 而 *Ruminococcaceae_UCG_005*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group* 以及 *Ruminococcaceae_XPB1014_group* 的丰度显著高于 C 组 ($P < 0.05$) (图 2C, 2D)。

2.2 真菌组成和丰度比较

利用 ITS1F-ITS2R 引物对, 对各样品中真菌群落组成情况进行测序。结果显示 raw reads 数为 898449×2 , 总碱基数目为 540 866 298, 有效碱基数目为 245 604 522, 具体测序信息见表 2。



注: A: 细菌门的丰度柱状图; B: 细菌属上的聚类热图; C: 未处理组 (C 组) 与有氧暴露组 (T1 组) 在细菌属的丰度差异条形图; D: 未处理组 (C 组) 与厌氧暴露组 (T2 组) 在细菌属分类上的丰度差异条形图; Student's t 检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 FMT 制备处理对供体猪粪便细菌群落组成的影响

Note. A. Barplot results of community abundance on bacterial phylum level. B. Heatmap results on bacterial genus level. C. Student's t -test barplot on bacterial genus level between C and T1 groups. D. Student's t -test barplot on bacterial genus level between group C and T2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Influence of FMT preparation on bacterial community of SPF pigs' feces

表 2 基于 Illumina Miseq sequencing 平台的真菌 ITS1-ITS2 区域的测序结果

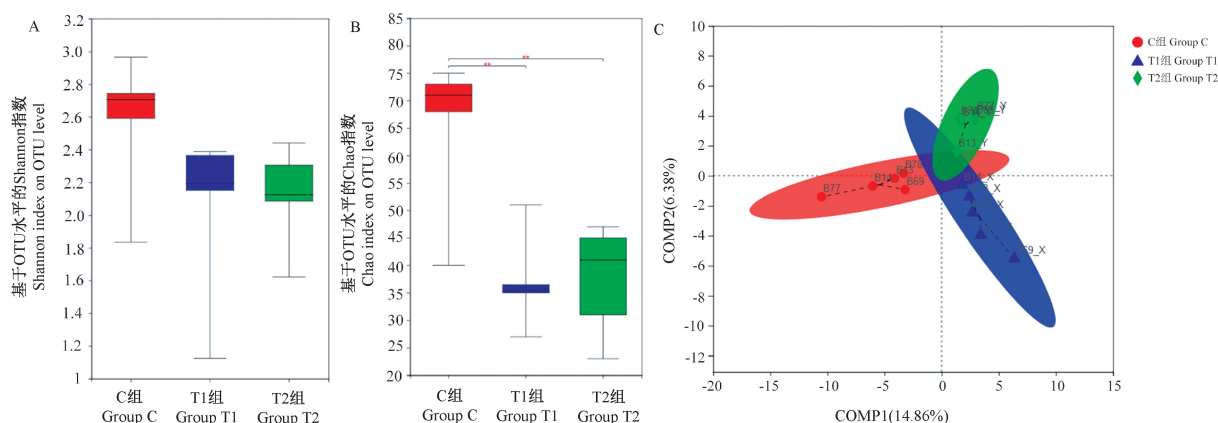
Table 2 Illumina Miseq sequencing of ribosomal RNA ITS1-ITS2 genomic region in fecal mycobiota

分组 Groups	样本编号 Sample No.	序列数 Sequences	碱基数 (bp) Bases (bp)	平均长度 (bp) Average length (bp)
未处理对照组 (C 组) Untreated group (Group C)	B13	38 056	10 755 161	282. 61
	B14	53 456	13 858 394	259. 25
	B69	58 798	15 600 278	265. 32
	B77	70 776	19 348 726	273. 38
	B78	74 110	17 371 675	234. 40
需氧暴露组 (T1 组) Aerobic FMT preparation (Group T1)	B13_X	55 139	15 055 302	273. 04
	B14_X	47 996	17 422 611	363. 00
	B69_X	72 876	19 364 345	265. 72
	B77_X	70 514	19 198 171	272. 26
	B78_X	69 328	17 552 576	253. 18
厌氧暴露组 (T2 组) Anaerobic FMT preparation (Group T2)	B13_Y	31 017	9 553 379	308. 00
	B14_Y	43 031	12 351 827	287. 04
	B69_Y	71 811	23 539 325	327. 80
	B77_Y	70 761	15 173 799	214. 44
	B78_Y	70 780	19 458 953	274. 92

对 97% 相似水平下的真菌 OTUs 进行统计分析, 15 个样品中共检出 158 个 OTUs。C 组、T1 组和 T2 组各检出的 OTUs 数目分别为 128、85 和 77 个, 其中 3 组间共享 48 个 OTUs。Shannon 指数组间差异不显著 ($P > 0.05$); C 组与 T1 组、T2 组之间在 Chao 指数上差异显著 ($P < 0.01$)。ANOSIM 检验显示 $R = -0.068$, $P > 0.05$, 提示猪粪便中真菌组成, 组间差异不明显, 与 PLS-DA 分析结果相同 (见图 3)。

C 组共识别出 128 个真菌 OTU, T1 组识别出 85 个, T2 组识别出 77 个 OTU。群落组成分析结果显示, C 组以子囊菌门 (*Ascomycota*) 为主, 相对平均丰度为 63.26%; 其次为担子菌门 (*Basidionmycota*) 和 *Neocallimastigomycota*, 分别占 27.13% 和 9.17%。当粪便经过 FMT 制备操作处理后, 无论是在需氧或厌氧条件下 *Ascomycota* 相对丰度大幅度提升, 在 T1 组

平均丰度达到 87.65%, 在 T2 组达到 85.15%; 而 *Neocallimastigomycota* 丰度降低到 1% 以下 (T1 组为 0.25%, T2 组为 0.44%)。基于样本中群落丰度数据, 结果显示在真菌门上组间差异均不显著 ($P > 0.05$); 节单菌科 (*Wallemiaceae*)、*Sporidiobolaceae* 和 *Bulleribasidiaceae* 组间存在显著差异 ($P < 0.05$), 这三种真菌科在 C 组的丰度很低, 少于 1%。*Wallemiaceae* 在 C 组的平均丰度为 $0.999\% \pm 1.049\%$, 在 T2 组中丰度为 $0.476\% \pm 1.065\%$, 但在 T1 组未检出。在真菌属上, 节单菌属 (*Wallemia*) 的丰度在组间存在差异, 但它在 C 组和 T2 组中丰度也低于 1%, 在 T1 组中未检出 (图 4)。这提示这类真菌在需氧下 FMT 制备操作时, 可能因为其含量过低而未被保存下来, 而厌氧暴露似乎部分保存了这类真菌。

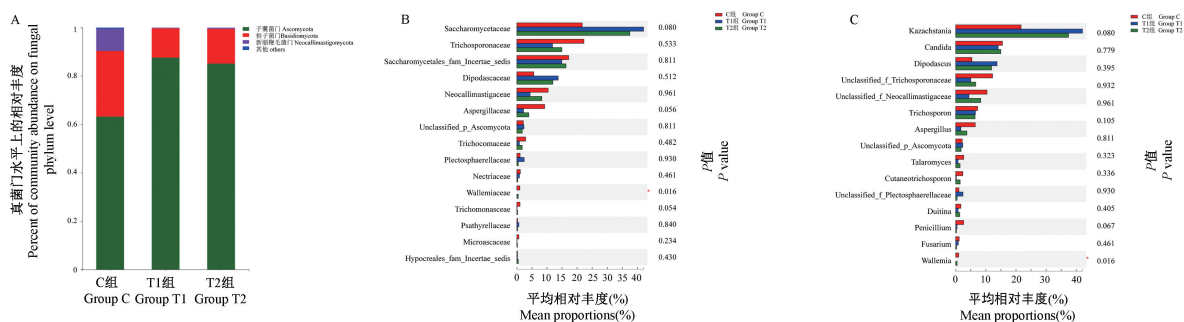


注: A: 基于 OTU 水平的 Shannon 指数; B: 基于 OTU 水平的 Chao 指数; C: 基于 OTU 水平的 PLS-DA 分析。* $P < 0.01$ 。

图 3 FMT 制备操作对供体猪粪便样品中真菌群落多样性的影响

Note. A. Student's *t*-test for Shannon index of OTU level. B. Student's *t*-test for Chao index of OTU level. C. PLS-DA analysis. * $P < 0.01$.

Figure 3 Influence of FMT preparation on the fungal community diversity in SPF pigs' fecal samples



注: A: 真菌门水平的组成柱状图; B: 真菌科水平上的组间丰度差异比较条形图; C: 真菌属水平上的组间丰度差异比较条形图。* $P < 0.05$ 。

图 4 FMT 制备处理对供体猪粪便真菌群落组成的影响

Note. A. Barplot results of community abundance on fungal phylum level. B. One-way ANOVA barplot results of community abundance on fungal family level. C. One-way ANOVA barplot results of community abundance on fungal genus level. * $P < 0.05$.

Figure 4 Influence of FMT preparation on fungal community of SPF pigs' fecal samples

2.3 菌群功能预测

利用 Tax4Fun 对样品中细菌进行 COG 和 KEGG pathway 功能注释和丰度比较,结果显示共注释到 24 个 COG 功能分类,组间丰度相似。其中, Carbohydrate transport and metabolism 和 Amino acid transport and metabolism 丰度最高,相对丰度均超过 8.0% ($P > 0.05$,图 5A)。KEGG pathway level1 水平上共注释到 cellular processes, environmental information processing, genetic information processing, human diseases, metabolism 以及 Organismal systems 这 6 个 KEGG 通路,组间差异小 ($P > 0.05$)。其中,注释到 metabolism 的通路达到 137 个,但各相对丰度在组间差异不明显 ($P > 0.05$)。

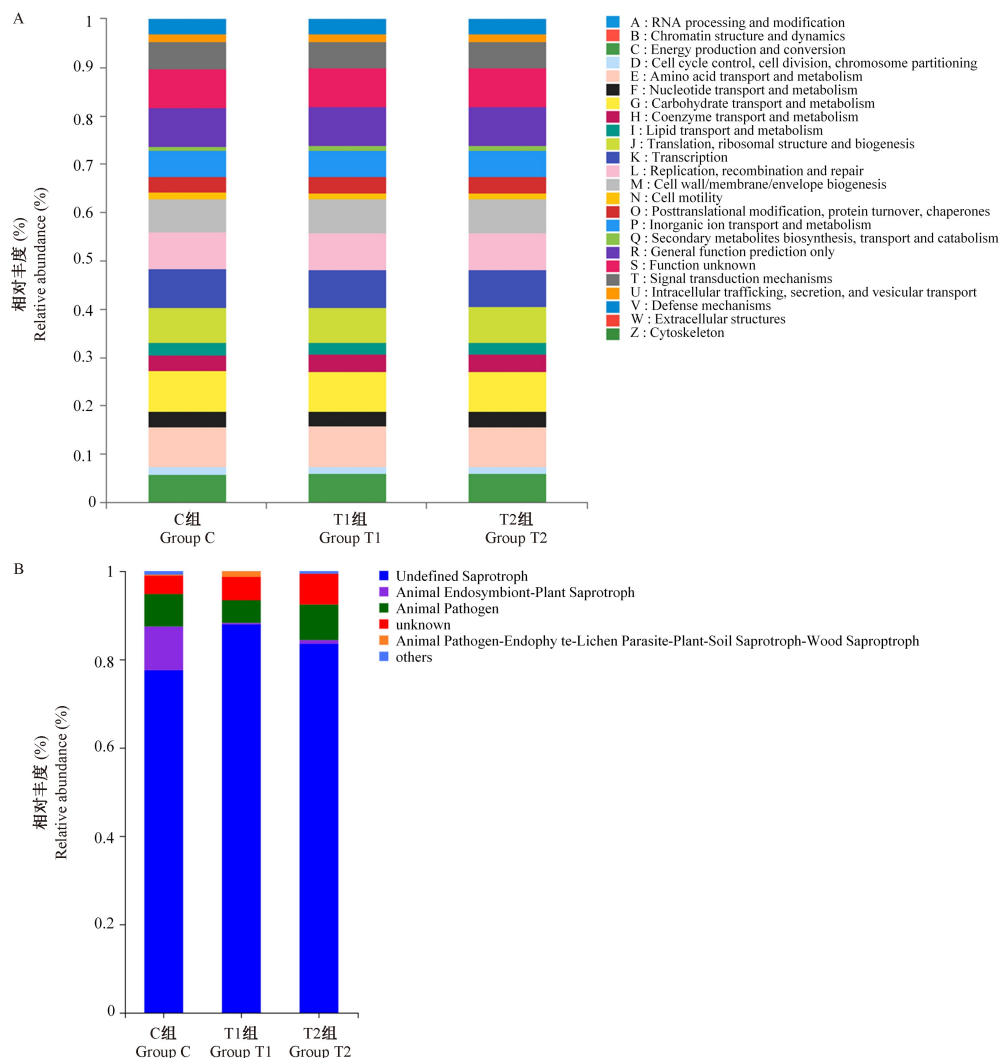
FUNGuild 通过微生物 guild 对真菌群落进行分

类分析。由图 5B 发现,粪便中真菌的主要功能为腐生营养型,其中未定义腐生真菌 (undefined Saprotroph) 平均相对丰度在 C 组高达 77.56%, T1 组为 87.92%, T2 组为 83.53%。C 组中, Animal Endosymbiont-Plant Saprotroph 平均相对丰度达到 9.89%,略高于 Animal Pathogen 的平均相对丰度 (7.35%)。相比之下,粪便经过过滤处理后, Animal Endosymbiont-Plant Saprotroph 丰度急剧减少,在 T1 组仅为 0.34%, T2 组为 0.85%;其他功能分类,如 Animal Pathogen,组间丰度差异不明显 ($P > 0.05$)。

2.4 代谢组分析

2.4.1 数据质控

利用 LC-MS 分析平台测定 15 个猪粪便样品中代谢物组成和丰度情况,并采用 PCA 对数据结



注:A:供体猪粪样中细菌 COG 功能注释结果;B:FUNGuild 对供体猪粪便中真菌功能注释结果。

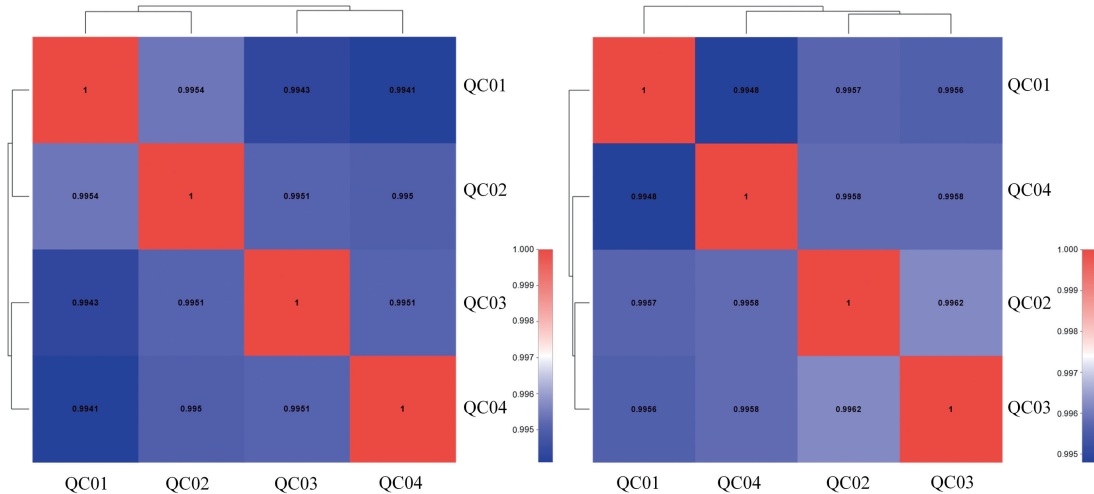
图 5 T1、T2 和 C 组中粪菌功能预测结果

Note. A. The result of COG function classification of fecal bacterial community from donor pigs. B. The result of fungal functional annotation from donor pigs inferred by FUNGuild.

Figure 5 Bacterial and fungal function classification in groups C, T1 and T2

果进行质控分析。质控样本 (Quality Control, QC) 用于评价在上级过程中分析系统的稳定性。QC 样本相关性越高 (越接近于 1) 表明测试方法稳定性越好, 数据质量越高。在正负离子 2 个模式下, QC 样本相关性最小值为 0.994, 表明此次检测方法稳定, 数据可信 (见图 6)。通过 PLS-DA 得到模型评价参数 (R^2 , Q^2), R^2 和 Q^2 值越接近 1, 表明模型越稳定可靠; 如果 R^2 和 $Q^2 < 0.5$, 则模型可

靠性较差。相关评价参数结果: C 组与 T2 组比较时 (即 T2: C 代谢集): $R^2X = 0.513$, $R^2Y = 0.935$, $Q^2 = 0.897$; C 组与 T1 组比较时 (即 T1: C 代谢集): $R^2X = 0.521$, $R^2Y = 0.614$, $Q^2 = 0.451$; 说明模型构建稳定, 数据可靠; T1 与 T2 比较时 (即 T2: T1 代谢集): $R^2X = 0.326$, $R^2Y = 0.41$, $Q^2 = -0.709$, 提示 T1 和 T2 模型效果不好, 这两组间得到的差异物质不可信。



注: A: 阳离子模式; B: 阴离子模式。

图 6 QC 样本相关性分析结果

Note. A. Positive ion mode. B. Negative ion mode.

Figure 6 Results of QC sample correlation analysis

2.4.2 代谢物分类统计

利用代谢组数据库 (HMDB, www.hmdb.ca) 对猪粪便中代谢物进行注释。正、负离子模式下, 402 和 195 种代谢物被分类为 14 个超类别 (superclass) 和 21 个子类别 (subclass)。其中, 有 243 种代谢物注释到“脂类和类脂分子” (lipids and lipid-like molecules), 有 54 种代谢物注释到“有机杂环化合物” (organoheterocyclic compounds), 50 种代谢物注释到“有机酸和杂环化合物” (organic acid and derivatives)。子类别中, 注释到“氨基酸、肽和类似物” (amino acids, peptides and analogues), “脂肪酸和偶联物” (fatty acids and conjugates) 以及“胆汁酸、醇类和衍生物” (bile acids, alcohols and derivatives) 的代谢物数量分别为 41、26 和 25 个。

2.4.3 差异代谢产物的筛选与鉴定

采用 Student's *t* 检验结合 OPLS-DA, 筛选出组间差异代谢物。同时满足变量重要性 $VIP > 1$, $P < 0.05$, 差异倍数 $FC > 1$ 或 $FC < 1$ 。阳离子模式下

T1-C 代谢集筛选出差异代谢物数量为 90 个, T2-C 代谢集筛选出差异代谢物数量 122 个, T2-T1 代谢集筛选出差异代谢物 3 个。阴离子模式下 T1-C 代谢集筛选出差异代谢物 65 个, T2-C 代谢集筛选出差异代谢物 79 个, T2-T1 代谢集筛选出差异代谢物 1 个 (见表 3)。因此, T1: C 代谢集筛选出的差异代谢物共有 155 个, T2: C 代谢集筛选出的差异代谢物共有 201 个, 它们之间共享的差异代谢物达 142 种。

表 3 差异代谢物分析结果

Table 3 Results of metabolite differential analysis

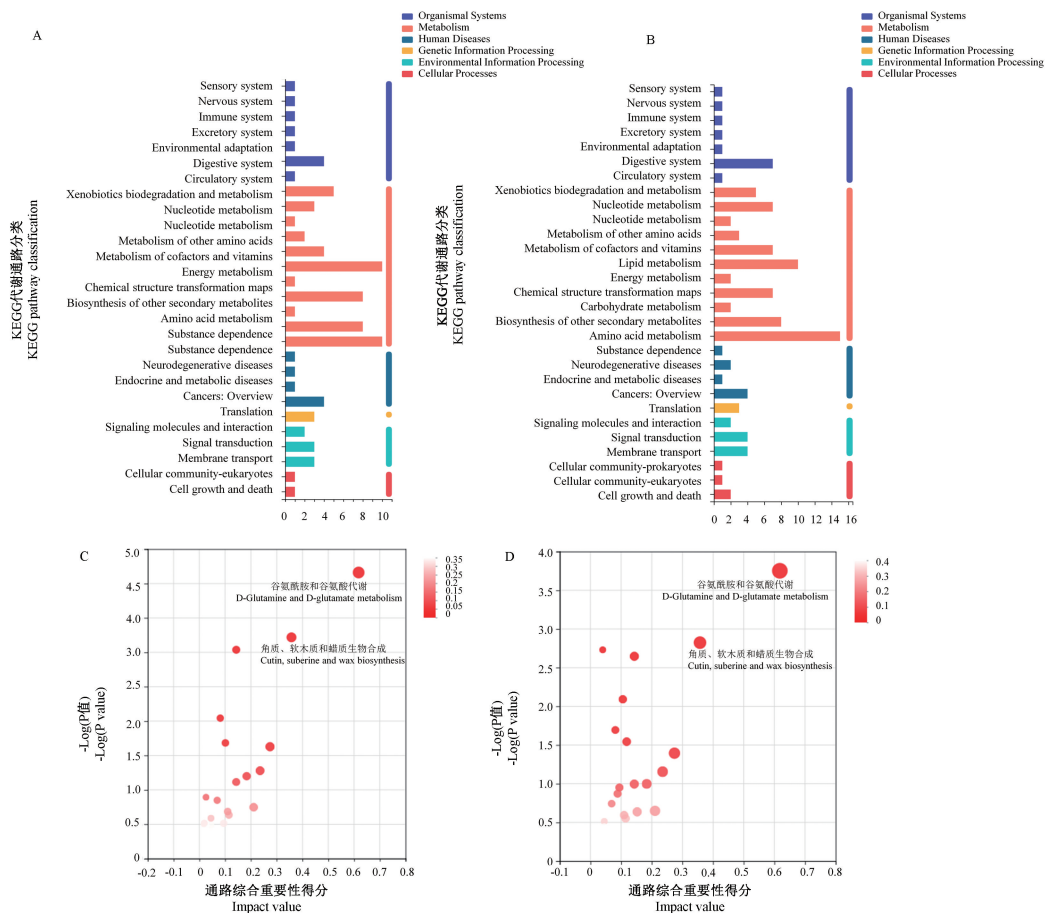
代谢集 Metabolite comparison	阳离子模式 Positive ion mode		阴离子模式 Negative ion mode	
	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down
T1: C 代谢集 T1: C metabolite comparison	9	81	0	65
T2: C 代谢集 T2: C metabolite comparison	5	117	0	79
T2: T1 代谢集 T2: T1 metabolite comparison	1	2	0	1

由于 T2:T1 代谢集模型拟合不可信,因此,本研究仅对 T1:C 和 T2:C 两代谢集进行 KEGG 功能注释与富集分析。T2:C 代谢集注释到“代谢”(metabolism)一级分类的代谢物最多。其中,“氨基酸代谢”(amino acid metabolism)二级分类通路下的代谢物个数达到为 15 个;其次为“脂质代谢”(lipid metabolism)有 10 个。类似的,T1:C 代谢集注释到“代谢”一级分类下代谢物最多。其中,amino acid metabolism 二级分类下代谢物为 10 个,和 lipid metabolism 分类下数目相同(图 7A,7B)。此外,对代谢集内各代谢物在 KEGG 通路中进行通路富集和通路拓扑学分析。其中,代谢途径 D-Glutamine and D-glutamate metabolism (pathway ID:map00471; $P < 0.01$) 的相对重要性最大,其次为 Cutin, suberine

and wax biosynthesis (pathway ID: map00073, $P < 0.01$),它们在 T1:C 和 T2:C 代谢集中的重要性得分均高于 3.0(图 7C,7D)。

2.4.4 样本中代谢物组成与微生物群落组成相关性分析

图 8A,8B 可知,T1:C 代谢集丰度前 10 的差异代谢物为 2-Amino-2-methylbutanoate, (-)-Stercobilin、2,4-Dimethylpimelic acid、L-Proline、3'-Deaminofusarochromanone、Gingerglycolipid B、Prednisolone、Spirolide D、Polysorbate 20 以及 PS (16:0/18:02(9Z,12Z)),它们与 *Spirochaetes* 的相对丰度均呈正相关。除(-)-Stercobilin 外,其余差异代谢物与 *Spirochaetes* 呈显著正相关($r > 0.60$, $P < 0.05$);T2:C 代谢集丰度前 10 的差异代谢物为 PE



注:A:T1:C 代谢集;B:T2:C 代谢集;C:T1:C 代谢集拓扑学分析结果;D:T2:C 代谢集拓扑学分析结果。

图 7 KEGG 代谢通路富集和注释结果

Note. A. T1:C metabolite comparison. B. T2:C metabolite comparison. C. KEGG Topology analysis for T1:C metabolite comparison. D. KEGG Topology analysis for T2:C metabolite comparison.

Figure 7 KEGG pathway classification.

3 讨论

在以前的研究中,供体的作用已被证明是重要的^[15]。SPF 猪是在屏障或隔离环境下饲养,排除了特定的病原微生物和寄生虫的猪群,是优良的动物实验、生物制剂及生命科学研究用猪。因此,选择 SPF 猪的粪便作为 FMT 的供体具备合理性。此外,多捐赠者方法已被证实可以提高供体微生物群落多样性,有助于 FMT 后取得一个良好的结果^[16]。因此,参照现行国家标准 GB/T22914-2008,本研究最终选择了 5 头 SPF 巴马小型猪作为 FMT 供体动物。

供体猪粪悬液的制备方法影响了样品中菌群组成结构,这是影响 FMT 效果的又一重要因素。过去研究发现益生菌的活力对其发挥重用具有重要影响。然而,Andresen 等^[17]研究发现死菌也能对肠易激综合征发挥益处;冷冻和新鲜粪便制剂对 CDI 具有相似的治疗功效^[18-20],提示粪便制剂中活菌数可能并不制约 FMT 的使用。制备 FMT 用的粪悬液时,短暂的有氧暴露和厌氧暴露均未显著改变样品中细菌和真菌组成,但影响了菌群的丰度。和未处理粪便样品相比,有氧和厌氧操作都完整地保留了全部的细菌门分类,猪 FMT 用粪悬液中仍然是以 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 为主,和健康猪群的直肠微生物研究结果一致^[21]。然而,有氧和厌氧下 FMT 制备操作导致了 *Spirochaetes* 细菌的丰度减少约 8 倍, *Terrisporobacter* 的丰度减少 3 倍, *Treponema_2* 丰度减少 9 倍以上。此外,结果显示 SPF 巴马小型猪粪便中真菌群落以 *Ascomycota*, *Basidionmycota* 和 *Neocallimastigomycota* 为主, FMT 制备操作导致了粪便中真菌群落丰度的降低。比如,有氧处理组降低了粪便中 *Neocallimastigomycota* 的丰度超过 36 倍,厌氧处理组降低该菌的丰度也达到 20 倍。值得注意的,有氧或厌氧下 FMT 制备操作也造成 *Wallemmina* 等低丰度菌群丰度的降低,甚至无法通过扩增子测序手段检出。当然, FMT 制备操作也提高了某些菌群的丰度,包括 *Ruminococcaceae* *UGC-005*, *Rikenellaceae* *RC9 gut group* 以及 *Ruminococcaceae* *NK4A214 group* 的丰度都显著高于未处理的粪样 ($P < 0.05$)。值得注意的是, *Spirochaetes* 含有猪肠道内与猪痢疾有关的主要病原,尤其是密螺旋体属 (*Treponema*) 细菌^[22]。本研究中,5 头供体猪粪便样本按照 NY/T545 的方法完成了猪痢疾密螺旋体病原检测,结果为阴性。

Treponema_2 在 15 个样本中均被检出,并随 FMT 制备操作丰度显著降低 ($P < 0.05$)。其中,它在未处理组的平均丰度为 ($7.31\% \pm 4.90\%$),在有氧暴露组为 ($0.81\% \pm 0.51\%$),在厌氧暴露组为 ($0.69\% \pm 0.37\%$)。此外,研究显示对供体猪粪便样品实施处理后,样品中代谢物含量也发生改变,且厌氧下处理对供体猪粪便悬液中的代谢产物更具影响,毕竟与未处理组相比,厌氧暴露组中检出了 201 种差异代谢物,而有氧暴露组中检出 155 种差异代谢物。相关性分析结果揭示粪便中 *Treponema_2* 与多种代谢物的产生密切相关。值得注意的是,经 FMT 制备操作后 *Spirochaetes* 丰度降低,更导致了 Prednisolone 和 Spirolide D 两种代谢产物的减少。Spirolide D 是一种脂溶性贝毒素, Prednisolone (中文名:波尼松龙)是常用的抗炎肾上腺皮质激素类药物,具有抗炎作用,这些结果提示本研究采用的粪便 FMT 制备操作方法可有效降低猪粪便中 *Treponema* 和 *Spirochaetes* 菌群的丰度,一定程度上提高了 FMT 的安全性。

目前, FMT 不仅作为治疗复发性 CDI,恢复患者肠道多样性的一种技术^[23-24],还广泛用于悉生动物模型的构建,在宿主代谢、营养、免疫力以及药物发现中肠道生态学的研究上发挥着重要作用。仅从这一出发点而言,没有必要采用标准化的制备方法,但应尽可能地保证移植的粪悬液反映的是供体原始的粪便微生物组。除制备时环境空气暴露的差异外,研究使用的供体猪数量、动物个体差异以及新鲜粪便采集量、实验操作时间、以及每份测序样本中所含细菌、真菌以及代谢物含量的差异等都可能成为潜在影响因素。当然,在今后实际使用上可通过扩大供体猪数量和粪便采集量、自动化粪悬液制备、增加测序样本重复数等操作来降低这些潜在问题。

4 结论

SPF 巴马小型猪粪便样品中主要的细菌群落为 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes*,主要的真菌群落为 *Ascomycota*, *Basidionmycota* 和 *Neocallimastigomycota*。尽管处理时间短暂,粪悬液的制备操作仍强烈地降低了包括 *Spirochaetes*, *Terrisporobacter* 和 *Treponema_2* 在内的细菌群落以及 *Neocallimastigomycota* 真菌群落的丰度,提高了 *Ascomycota* 的相对平均丰度,并显著影响猪粪悬液中包括 Prednisolone, Spirolide D

等在内的多种代谢物的产生。值得注意的是,有氧暴露对猪粪悬液中真菌群落丰度的影响高于厌氧暴露处理。结果提示,粪悬液的 FMT 制备操作有效地降低 *Treponema* 和 *Spirochaetes* 等有害菌群和相关代谢产物的丰度,提高了 FMT 的安全性。

参 考 文 献(References)

- [1] Leung V, Vincent C, Edens TJ, et al. Antimicrobial resistance gene acquisition and depletion following fecal microbiota transplantation for recurrent clostridium difficile infection [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(3): 456-457.
- [2] DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, et al. Drug-resistant *E.coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant [J]. N Engl J Med, 2019, 381(21): 2043-2050.
- [3] Azimirad M, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, et al. Enterotoxigenic clostridium perfringens infection as an adverse event after faecal microbiota transplantation in two patients with ulcerative colitis and recurrent clostridium difficile infection: a neglected agent in donor screening [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(7): 960-961.
- [4] Verbeke F, Janssens Y, Wynendaele E, et al. Faecal microbiota transplantation: a regulatory hurdle? [J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1): 128.
- [5] Jørgensen SMD, Erikstrup C, Dinh KM, et al. Recruitment of feces donors among blood donors: Results from an observational cohort study [J]. Gut Microbes, 2018, 9(6): 540-550.
- [6] Ramai D, Zakhia K, Ofosu A, et al. Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness [J]. Ann Gastroenterol, 2019, 32(1): 30-38.
- [7] Allegretti JR, Elliott RJ, Ladha A, et al. Stool processing speed and storage duration do not impact the clinical effectiveness of fecal microbiota transplantation [J]. Gut Microbes, 2020, 11(6): 1806-1808.
- [8] Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. A pig model of the human gastrointestinal tract [J]. Gut Microbes, 2013, 4(3): 193-200.
- [9] Gehrig JL, Venkatesh S, Chang HW, et al. Effects of microbiota-directed foods in gnotobiotic animals and undernourished children [J]. Science, 2019, 365(6449): eaau4732.
- [10] 李梦颖,周华,丁玉春,等. 肠道微生物对仔猪胆汁酸谱及胆汁酸代谢的影响 [J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 49-61.
- [11] Li MY, Zhou H, Ding YU, et al. Effects of gut microbiota on bile acid profile and bile acid metabolism in piglets [J]. Biotechnol Bull, 2020, 36(10): 49-61.
- [12] Zhou H, Sun J, Ge L, et al. Exogenous infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal functions independently of the gut microbiota [J]. J Anim Sci, 2020, 98(12): skaa371.
- [13] Pang X, Hua X, Yang Q, et al. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs [J]. ISME J, 2007, 1(2): 156-162.
- [14] Sun J, Du L, Li X, et al. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18675.
- [15] Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, et al. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial [J]. Gastroenterology, 2015, 149(1): 102-109.
- [16] Vermeire S, Joossens M, Verbeke K, et al. Donor species richness determines faecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease [J]. J Crohns Colitis, 2016, 10(4): 387-394.
- [17] Andresen V, Gschossmann J, Leyer P. Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(7): 658-666.
- [18] Satokari R, Mattila E, Kainulainen V, et al. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection-an observational cohort study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41(1): 46-53.
- [19] Lee CH, Steiner T, Petrof EO, et al. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent clostridium difficile infection: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2016, 315(2): 142-149.
- [20] Tang G, Yin W, Liu W. Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: A meta-analysis? [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 88(4): 322-329.
- [21] Sun J, Du L, Li X, et al. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18675.
- [22] Lee JJ, Hampson DJ, Lymbery AJ, et al. The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups [J]. Vet Microbiol, 1993, 34(3): 273-285.
- [23] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile* [J]. N Engl J Med, 2013, 368(5): 407-415.
- [24] Mullish BH, Ghani R, McDonald JAK, et al. Faecal microbiota transplant for eradication of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a lesson in applying best practice? Re: 'A five-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: A Randomized Clinical Trial' [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(7): 912-913.

[收稿日期] 2020-09-21