



生长猪结肠乳酸菌菌群的昼夜节律性变化

冯露分, 王红玉, 苏勇*, 朱伟云

南京农业大学动物科技学院, 江苏省消化道营养与动物健康重点实验室, 国家动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏 南京 210095

冯露分, 王红玉, 苏勇, 朱伟云. 生长猪结肠乳酸菌菌群的昼夜节律性变化. 微生物学报, 2022, 62(11): 4494–4504.

Feng Lufen, Wang Hongyu, Su Yong, Zhu Weiyun. Circadian rhythm of lactic acid bacteria in colon of growing pigs. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4494–4504.

摘要:【目的】本文旨在研究生长猪在 24 h 内结肠乳酸菌的多样性变化、丰富度变化与节律性变化。【方法】选取 6 头装有结肠瘘管的“杜×长×大”三元杂交生长猪, 于清晨 6:00 开始, 每隔 3 h 连续采集一天内生长猪的结肠食糜, 提取 DNA, 用乳酸菌特异性引物进行高通量测序, 在属和种水平上分析结肠乳酸菌菌群丰度与节律性变化。【结果】生长猪结肠乳酸菌在 24 h 内 Chao1 和 Simpson 指数发生显著性变化($P<0.05$); 属水平上 *Lactobacillus* 相对丰度最高, 一天内在 6:00 时相对丰度最低, 为 94.15%, 18:00 时相对丰度最高, 为 97.46%; 种水平上 *Lactobacillus johnsonii* 相对丰度最高, 一天内在 3:00 时相对丰度最低, 为 47.66%, 18:00 时相对丰度最高, 为 71.59%, *Lactobacillus reuteri* 丰度次之。生长猪结肠乳酸菌中 46 个核心 OTU 具有节律性, 均为 *Lactobacillus*; 而在种水平上 *Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus* sp. KC45a 和 *Lactobacillus reuteri* 显现出节律性($P<0.05$)。【结论】生长猪结肠乳酸菌在 24 h 内多样性发生显著性变化, 在种水平上显现出节律性, 丰富了我们对猪肠道微生物昼夜节律的了解。

关键词: 高通量测序; 生长猪; 乳酸菌; 昼夜节律

基金项目: 国家自然科学基金(32072688, 318723623); 江苏省农业科技自主创新资金[CX(19)1006]

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32072688, 318723623) and by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund [CX(19)1006]

*Corresponding author. E-mail: yong.su@njau.edu.cn

Received: 19 March 2022; Revised: 18 May 2022; Published online: 17 June 2022

Circadian rhythm of lactic acid bacteria in colon of growing pigs

FENG Lufen, WANG Hongyu, SU Yong*, ZHU Weiyun

National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] The present study aims to investigate the richness, diversity, and rhythm of lactic acid bacteria in the colon of growing pigs within 24 h. [Methods] The colonic contents from 6 growing pigs with colon fistula were collected every 3 h within 24 h starting from 6:00. The DNA of colonic bacteria was extracted for PCR which was performed with the primers specific to lactic acid bacteria. The abundance and rhythm of intestinal lactic acid bacteria at genus and species levels were analyzed via high-throughput sequencing. [Results] The Chao1 and Simpson indexes of intestinal lactic acid bacteria in growing pigs changed significantly within 24 h ($P < 0.05$). *Lactobacillus* was the dominant genus in total lactic acid bacteria, with the lowest relative abundance of 94.15% at 6:00 and the highest relative abundance of 97.46% at 18:00. *Lactobacillus johnsonii* was the most dominant species with the lowest relative abundance of 47.66% at 3:00 and the highest relative abundance of 71.59% at 18:00. *Lactobacillus reuteri* took the second place in the relative abundance at the species level. Forty-six core OTUs of the lactic acid bacteria in the colon of growing pigs showed circadian rhythm, all of which belonged to *Lactobacillus*. At the species level, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus* sp. KC45a and *Lactobacillus reuteri* showed circadian rhythm ($P < 0.05$). [Conclusion] The richness and diversity of lactic acid bacteria in the colon of growing pigs changed significantly within 24 h, showing circadian rhythm at the species level. This study enriches our understanding on the circadian rhythm of intestinal microbiota in pigs.

Keywords: high-throughput sequencing; growing pigs; lactic acid bacteria; circadian rhythm

昼夜节律是在 24 h 内生物体细胞、组织包括行为等发生的周期性变动, 它受到光照、日粮组成、饲喂频率等许多因素的影响, 也会对肠道微生物的相对丰度和绝对丰度、宿主的代谢免疫等产生影响, 对宿主的生长发育与健康有着重要的意义^[1]。动物肠道菌群在动物的消化吸收、免疫代谢等方面发挥重要作用, 它与宿主相互作用, 共同维持稳态与健康生长^[2]。肠道菌群的结构、丰度及其代谢产物虽与光照无直接联系, 但也受昼夜更替的影响, 表现出节律性震荡^[3]。有研究显示, 小鼠肠道菌群中

属于拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门的一些菌属会发生昼夜震荡^[4]。Zarrinpar 等^[5]的研究也显示, 自由进食小鼠肠道菌群中约 17% 的 OTU 显现昼夜节律, 拟杆菌门、厚壁菌门、疣微菌门中的许多菌属都显现出周期性波动。目前有关昼夜节律的研究主要集中在小鼠中, 仅有少量关于猪的报道。猪血浆与肝脏中的短链脂肪酸、外周血免疫细胞数量、肠黏膜中编码转运蛋白基因的 mRNA 表达均表现出昼夜节律^[6-7]。Yin 等^[8]发现, 猪的肠道微生物具有显著的节律性, 并且外源性褪黑素能够缓解脂肪代谢紊乱, 调

节肠道微生物的节律性。乳酸菌是一类能够产生乳酸、广泛分布于动物肠道内的益生菌。它可以调节肠道微生物的多样性和丰度，抑制有害微生物生长，维持肠道屏障完整性，减少炎症的发生，促进机体免疫功能提高^[9-12]。作为肠道的核心菌群，一些肠道菌群节律性研究也涉及到乳酸菌，如 *Thaiss* 等^[13]的研究发现，小鼠粪便中罗伊氏乳杆菌和一些乳酸杆菌目的菌种表现出昼夜节律。*Wang* 等^[14]发现高脂饲喂的小鼠肠道中的乳酸杆菌属显现出节律性。但目前对乳酸菌节律性变化的研究尚不完整，未有针对猪肠道乳酸菌节律性的系统性研究。本研究对生长猪结肠乳酸菌 24 h 内多样性、结构性与节律性的变化进行分析，旨在系统研究生长猪结肠乳酸菌特别是乳酸杆菌与昼夜节律的关系，有助于增加对生长猪结肠乳酸菌群的认知，促进乳酸菌特别是乳酸杆菌在猪生产中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

选取 6 头装有结肠瘘管的“杜×长×大”三元杂交生长猪，根据美国国家研究委员会 (National Research Council, NRC) 营养标准配置玉米-豆粕性基础日粮(表 1)，试验猪自由采食与饮水，严格按照猪场的饲喂管理方式饲养。于清晨 6 点开始，每隔 3 h 连续采集一天内的结肠食糜，将不同时间点采集的结肠食糜冷冻保存于-20 °C 冰箱，以待后续试验。

1.2 DNA 提取

样品解冻后取 0.3 g 加入 2 mL 无菌离心管，加入 1.2 mL PBS 溶液，涡旋振荡，12 000×g 离心 5 min，去除上清液。样品清洗 3 次后加入 900 μL CTAB 缓冲液，充分振荡混匀，转移至无菌铅珠管，采用珠磨式组织研磨器(Beadbeater, Biospec)破碎样品。70 °C 培养 20 min 后

表 1 日粮营养组成和营养水平

Table 1 Nutrient composition and nutrient level of experimental diets for growing pigs

Ingredient	Percentage/%
Corn	70.00
Soybean meal	18.00
Wheat bran	6.50
Soybean oil	1.90
Lysine	0.69
Methionine	0.24
Threonine	0.30
Tryptophan	0.07
Calcium hydrogen phosphate	0.45
Stone powder	0.50
Sodium chloride	0.30
Multivitamins ¹	0.03
Minerals ²	0.20
Choline chloride (50%)	0.12
Zeolite powder	0.60
Antioxidant	0.05
Antifungal agent	0.05
Total	100.00
Nutrients ³	
Digestible energy/(MJ/kg)	14.60
Crude protein	16.00
Lysine	1.23
Methionine+cystine	0.70
Threonine	0.79
Tryptophan	0.22

¹: multivitamin content per kilogram of diet: vitamin A: 11 000 IU; vitamin E: 16 IU; vitamin B₁: 0.6 mg; vitamin B₂: 0.6 mg; vitamin D₃: 1 000 IU; vitamin B₅: 6 mg; vitamin B₃: 10 mg; vitamin K: 1 mg; vitamin B₁₂: 0.03 mg; vitamin B₉: 0.8 mg; vitamin B₆: 1.5 mg. ²: mineral content per kilogram of diet: iron: 165 mg; zinc: 165 mg; copper: 16.5 mg; manganese: 30 mg; iodine: 0.25 mg. ³: nutrient values were calculated from Tables of Feed Composition and Nutritive Values in China (twenty-nine edition, 2018).

10 000 r/min 离心 10 min，取上清，加 3 μL RNA 酶，37 °C 培养 30 min。加入等体积的酚和氯仿/异戊醇，混匀后 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min，取上清，重复 3 次提取 DNA^[15]。通过核酸蛋白检测仪 Nano-Drop 2100 (Thermo Scientific)检测 DNA 的浓度和纯度。

1.3 PCR 扩增纯化与测序

使用 *FastPfu* DNA 聚合酶和乳酸菌特异性引物(Lac1: 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' 和 Lac2: 5'-ATTYCACCGCTACACATG-3')进行 PCR 扩增^[16]。反应体系为 20 μ L, 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 2%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测和纯化, 在 Illumina HiSeq 平台进行测序。

1.4 生物信息分析

运用 QIIME (1.17)软件对原始数据进行整理过滤处理。删除长度小于 150 bp、碱基模糊或错配、单独碱基重复 6 个以上的序列, 以 97% 的序列相似度为阈值, 用 UPARSE (version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>)对筛选序列进行 OTU (operational taxonomic unit)聚类分析。采用 QIIME 平台 (V1.9.0, http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)和 RDP Classifier (version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>)算法, 对比数据库 Silva (Release132, <http://www.arb-silva.de>)和 RDP (Release 11.5, <http://rdp.cme.msu.edu>), 以 70%为置信度阈值进行物种注释。绘制稀释曲线图, 计算 Chao1、Shannon、Simpson 指数以评估生长猪在 24 h 内结肠乳酸菌的菌群多样性与丰富度变化, 对不同时间点 OTU 水平进行主坐标分析, 统计 OTU 在属和种分类水平上的组成与丰度变化, 分析 24 h 内乳酸菌中乳酸杆菌在种分类水平上的组成与丰度变化。

1.5 数据处理与统计分析

通过 R 3.5.3 的 JTK_CYCLE 程序对 OTU、乳酸菌菌属与菌种进行节律性分析^[17], 用 Bonferroni 法校正 *P* 值。测序所得数据经 Excel 2016 整理后, 通过 SPSS STATISTICS 20 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 比较不

同时间点猪结肠乳酸菌丰富度和多样性。用 GraphPad Prism 9.0 绘制乳酸菌多样性和丰度图, 显著水平置于 0.05。

2 结果与分析

2.1 生长猪结肠乳酸菌的多样性

测序共获得 2 522 562 条有效序列, 平均长度 307.97 bp。单个样本中的最小读数为 18 893, 最大读数为 59 956, 样本中的平均读数为 46 714。如图 1 所示, 不同时间点的生长猪结肠乳酸菌稀释曲线不同, 最终趋于平缓。3:00 时稀释曲线最高, 猪结肠乳酸菌的丰富度最高; 18:00 时稀释曲线最低, 结肠乳酸菌的丰富度最低。不同时间点(图 2A)和不同生长猪个体(图 2B)样品的 PCoA 分析显示, 各样品散点图没有明显分开, 没有显著性差异。图 3 通过 Chao1、Shannon、Simpson 分析了结肠乳酸菌的多样性与丰富度, 结果显示 24 h 内生长猪结肠乳酸菌的 Chao1 和 Simpson 发生了显著性变化($P < 0.05$)。

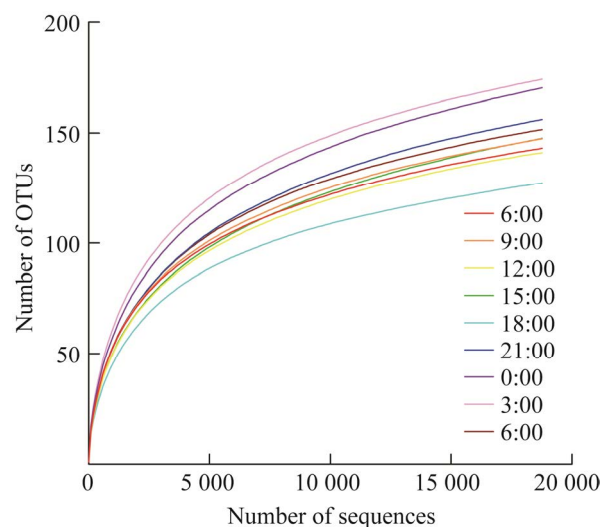


图 1 生长猪结肠乳酸菌稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curves comparing the number of reads in lactic acid bacteria in colon of growing pigs.

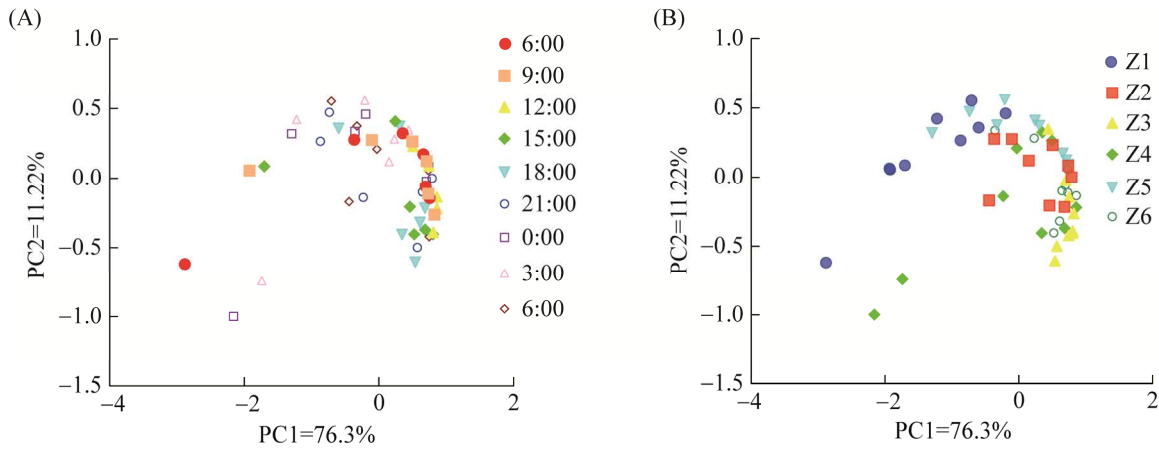


图 2 不同时间点(A)和不同生长猪个体(B)结肠乳酸菌 PCoA 图

Figure 2 Principal coordinate analysis (PCoA) analysis of lactic acid bacterial diversity of different time (A) and each pig (B) in colon of growing pigs.

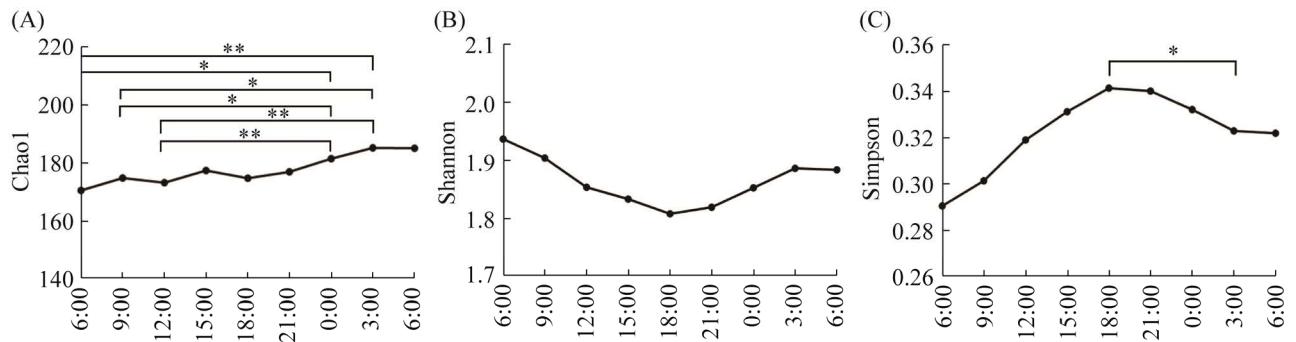


图 3 生长猪结肠乳酸菌多样性指数 Chao1 (A)、Shannon (B)和 Simpson (C)

Figure 3 The richness and diversity of lactic acid bacteria in colon of growing pigs Chao1 (A), Shannon (B) and Simpson (C). *: $0.01 \leq P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.2 生长猪结肠乳酸菌在属水平上的节律性

测序结果显示(图 4), 结肠乳酸菌中 *Lactobacillus* 丰度最高, 在 6:00 时丰度最低, 为 94.15%; 在 18:00 时丰度最高, 为 97.46%。*Lactococcus* 为丰度第二的菌属, 6:00 时丰度最高, 为 5.78%; 18:00 时丰度最低, 为 2.47%。其他菌属相对丰度较低, 均在 0.15% 以下。图 5 分析了生长猪结肠乳酸菌在属水平上的昼夜震荡, 各菌属均没有显现出节律性。

2.3 生长猪结肠乳酸菌 OTU 的节律性

结肠乳酸菌的高通量测序共检测出 378 个

OTU, 将样品中出现频率高于 66% 的 OTU 记为核心 OTU, 筛选出 189 个核心 OTU, 图 6 为生长猪结肠乳酸菌中核心 OTU 昼夜震荡的分析。其中有 46 个 OTU 具有节律性, 这 46 个 OTU 均为 *Lactobacillus*, 包括 19 个 *Lactobacillus reuteri*、13 个 *Lactobacillus johnsonii*、10 个 *Lactobacillus agilis*、2 个 *Lactococcus lactis*、1 个 *Lactobacillus gasseri* 和 1 个 *Lactobacillus* sp. KC45a。

2.4 生长猪结肠乳酸杆菌在种水平上的节律性

Lactobacillus 为明显的优势菌属, 分析生

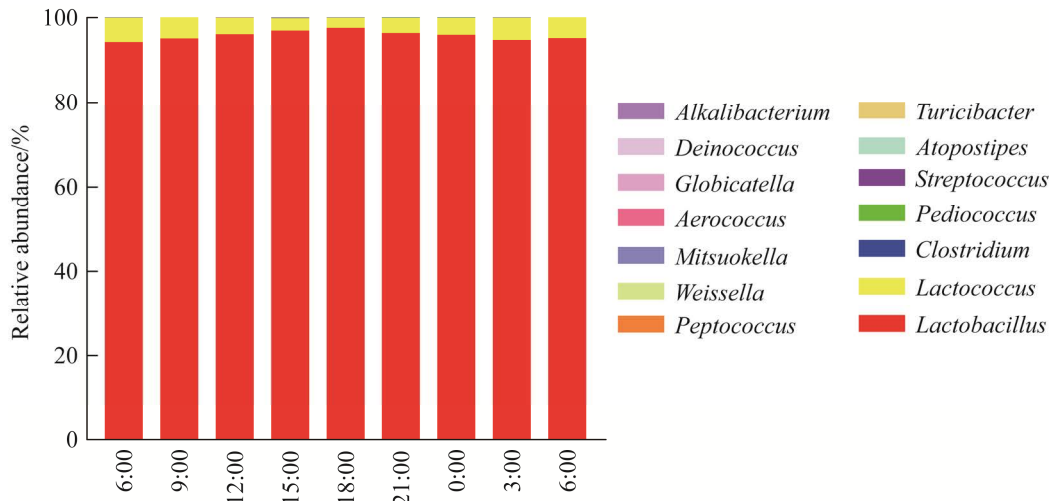


图 4 生长猪结肠乳酸菌在属水平上的 24 h 丰度变化

Figure 4 Changes in the abundance of lactic acid bacteria at the genus level in colon of growing pigs within 24 hours.

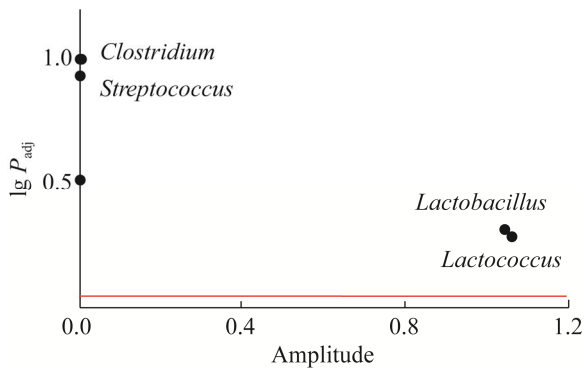


图 5 生长猪结肠乳酸菌在属水平上的昼夜振荡
Figure 5 Circadian oscillation of lactic acid bacteria at the genus level in colon of growing pigs.

长猪结肠中 *Lactobacillus* 在种水平上的 24 h 内丰度变化。如图 7 所示, 丰度最高的菌种为 *Lactobacillus johnsonii*, 丰度第二的菌种为 *Lactobacillus reuteri*。图 8 表示生长猪结肠乳酸杆菌相对丰度的昼夜振荡, 结果显示 *Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus sp.* KC45a 和 *Lactobacillus reuteri* 这 4 种乳酸杆菌具有节律性。*Lactobacillus johnsonii* 的振幅最大, *Lactobacillus gasseri* 的

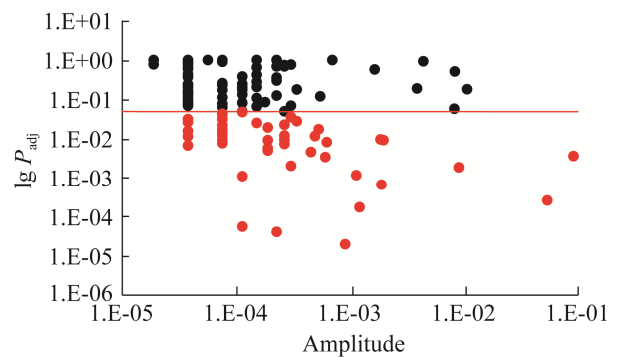


图 6 生长猪结肠乳酸菌核心 OTU 的昼夜振荡
Figure 6 Circadian oscillation of lactic acid bacteria core OTU in colon of growing pigs.

振幅最小。*Lactobacillus johnsonii* 在 18:00 时相对丰度为 71.59%, 达到峰值; 在 3:00 时相对丰度为 47.66%, 降为最低。*Lactobacillus sp.* KC45a 同样在 18:00 时达到峰值, 相对丰度为 0.59%; 在 6:00 时相对丰度为 0.18%, 降到最低。*Lactobacillus reuteri* 和 *Lactobacillus gasseri* 的昼夜波动则相反, 在 18:00 时丰度最低, 分别为 13.23% 和 0.08%。它们的峰值分别在 6:00 和 9:00 (图 9)。

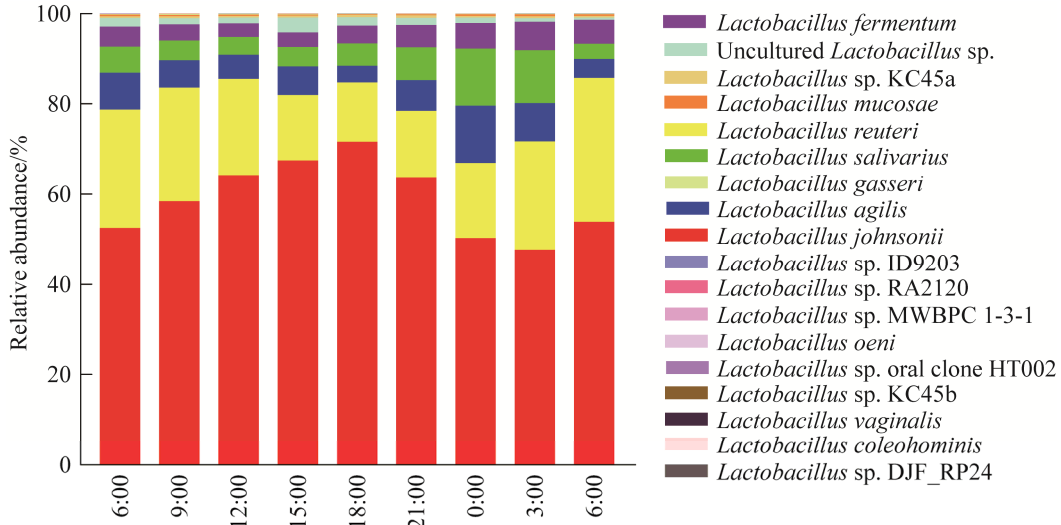


图 7 生长猪结肠乳酸杆菌在种水平上的 24 h 丰度变化

Figure 7 Changes in the abundance of *Lactobacillus* at the species level in colon of growing pigs within 24 hours.

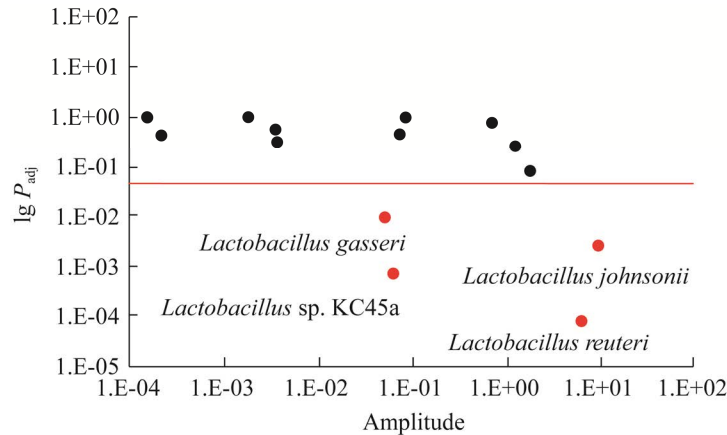


图 8 生长猪结肠乳酸杆菌相对丰度的昼夜振荡

Figure 8 Circadian oscillation of *Lactobacillus* at the species level in colon of growing pigs.

3 讨论

乳酸菌能够诱导肠道最佳微生物群的形成、改善胃肠道环境、抵御病原体入侵、提高免疫力，作为猪生长阶段的核心微生物群对生长猪的健康发挥着重要作用^[18-19]。随着对肠道乳酸菌认知的不断加强，人们越发重视乳酸菌在实际生产中的应用，利用乳酸菌的特性不断

改善日粮，调节仔猪肠道微生物群，提高猪的生产性能^[20]。与通常的总菌群高通量测序不同，本研究采用了乳酸菌特异性引物进行高通量测序^[16]，专注研究乳酸菌在生长猪肠道中的多样性与丰富度变化。Thaiss 等^[21]研究肠道微生物在 48 h 内的昼夜震荡，2 个暗光循环中肠道黏膜黏附微生物波动幅度相近，以 24 h 为周期显现出节律性；对 48 h 内样品的宏转录组分析也

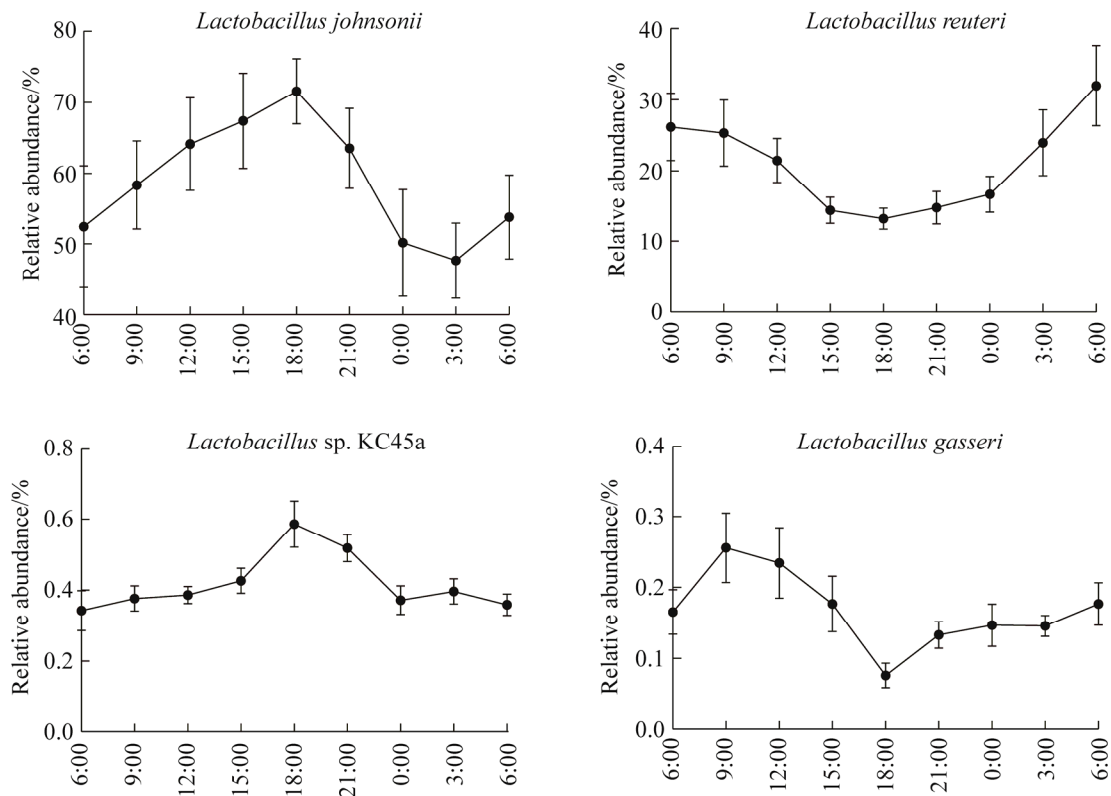


图9 节律性乳酸杆菌的丰度变化

Figure 9 Changes in the abundance of rhythmic *Lactobacillus*. Data are presented as mean±SEM (n=6).

揭示了肠道微生物在组成和功能上的昼夜节律^[13]。Zarrinpar 等^[5]采集了 24 h 内的样品对小鼠肠道微生物的节律进行分析, 研究结果显示, 正常饲喂小鼠肠道中 *Prevotella* 具有节律性, 限制蛋氨酸组、高脂饲喂小鼠、限制蛋氨酸的高脂饲喂小鼠肠道中 *Lactobacillus* 具有节律性。Wang 等^[14]同样分析了 24 h 内小鼠肠道微生物, 发现正常饲喂小鼠肠道 *Lactobacillus* 具有节律性, 该组几乎检测不到 *Lactococcus*; 而高脂饲喂小鼠肠道 *Lactobacillus* 和 *Lactococcus* 种类较多, 且 *Lactococcus* 显现节律性。理论上 48 h 的样本可以更好地研究节律, 但目前生物信息学的发展使 24 h 昼夜节律分析成为可能, 人们可从更有限的分析菌群昼夜节律^[22]。本研究采集 24 h 内结肠食糜, 测序结果显示, 生

长猪结肠乳酸菌在 24 h 内 Chao1 和 Simpson 均发生显著性变化; 优势菌属为 *Lactobacillus*, 24 h 内丰度一直保持在 94% 以上; *Lactobacillus* 中的优势菌种为 *Lactobacillus johnsonii*, 丰度几乎一直保持在 50% 以上。*Lactobacillus johnsonii* 能够合成大量肉桂酰酯酶, 增强酯化植物多酚的生物活性, 改善细胞膜运输, 有助于胃肠道环境的变化, 降低胃肠道炎症的发生, 增强免疫^[23]。有研究表明, *Lactobacillus johnsonii* 有助于抑制仔猪腹泻并提高日增重, 增加肠道厌氧菌的丰度^[24]。在生长猪肠道乳酸菌中, *Lactobacillus johnsonii* 维持菌群稳态, 促进生长。

动物肠道微生物的丰度会随时间变化而产生振荡, 一天内不同时间点的肠道微生物组成可能具有显著性差异。本研究分析了一天内不

同时时间点的结肠乳酸菌,结果显示乳酸菌的丰度发生震荡,不同菌种丰度的峰值与低谷期有所差异。18:00时,*Lactobacillus johnsonii*和*Lactobacillus* sp. KC45a丰度达到当天峰值,*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus agilis*和*Lactobacillus gasseri*丰度为当天最低。0:00时*Lactobacillus agilis*和*Lactobacillus salivarius*达到峰值,3:00时*Lactobacillus fermentum*丰度达到峰值。猪肠道微生物的相关研究中,往往采集任一时间点的粪样或肠道内容物进行分析,代表当日肠道微生物的组成。本研究证明了猪肠道微生物在一天内发生变化,仅某个时间点并不能完全代表当日状态。试验采样时间一般定为早上采食前6:00,而*Lactobacillus reuteri*在该时间点的丰度为一天最高,*Lactobacillus salivarius*和*Lactobacillus* sp. KC45a的丰度为一天最低,其他菌种的丰度也处于波动中。用该时间点采集的样品来分析肠道微生物并不完全准确,可能会造成一定的误差。动物肠道菌群处于动态变化,将采样时间设定为每日同一时间点可降低昼夜节律带来的影响;在进食前的时间点进行采样可减少饮食带来的影响;依据节律性研究,选择肠道菌群丰度变化较平缓的时间点进行采样可以降低误差。

先前有许多对小鼠与人类肠道微生物的节律研究,表明了肠道微生物存在节律性,并且微生物能够反过来驱动宿主的节律变化^[25]。肠道会随着昼夜节律分泌褪黑素等激素,诱导肠道微生物释放功能性细胞因子和趋化因子,肠道微生物也能反过来促进肠道细胞释放激素,微生物组成与功能的昼夜波动与宿主行为的昼夜波动相联系,共同维持生物节律^[26]。肠道微生物的多样性与组成很大程度上取决于宿主饮食^[27],日粮组成与摄食时间的变化可能主导着肠道微

生物与代谢产物的昼夜震荡^[3]。有研究证实褪黑素能够影响肠道微生物的节律性,昼夜更替会引起激素和肠道上皮细胞的变化,这也会导致肠道微生物发生振荡^[28]。昼夜节律会影响免疫系统节律,这也可能引起肠道微生物节律的变化^[29]。本研究中生长猪结肠乳酸菌*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus* sp. KC45a和*Lactobacillus reuteri*显现出节律性变化,这与昼夜环境变化和动物的摄食等生理行为均有一定关联。*Lactobacillus johnsonii*不仅是丰度最高的菌种,还是振幅最大、节律性最为显著的菌种。*Lactobacillus reuteri*是丰度第二的菌属,它具有抗炎能力,能够抑制PGE1、PGE2和COXs蛋白的产生,增加*IL-11*、*BMP4*、*LEFTY2*等抗炎因子的表达^[30]。*Lactobacillus reuteri*的节律性振荡可能有助于生长猪机体免疫,它能抑制沙门氏菌^[30]和大肠杆菌^[31]等有害菌的定殖,在宿主免疫中发挥着重要的作用。*Lactobacillus gasseri*同样有助于宿主免疫调节^[32],它能够减轻脂多糖诱导的炎症反应,通过Toll样受体和NOD2介导的PI3K/Akt信号通路发挥免疫调节作用^[33]。Hu等^[34]研究发现*Lactobacillus gasseri*可以显著增加猪肠道上皮细胞中UQCRC2和TCIRG1的表达,增加肠道上皮细胞能量的产生。本研究中显现出节律性的肠道乳酸菌均属于*Lactobacillus*,它们共同调节生长猪肠道稳态,促进免疫,抑制炎症发生。本研究表明了生长猪结肠乳酸菌具有节律性,昼夜活动能够调节结肠乳酸菌丰度和多样性的变化,但是对于结肠乳酸菌节律的作用机制尚不了解,还有许多节律问题需进一步地探索。对猪结肠乳酸菌节律性的研究可以为饮食的调节与免疫治疗提供依据,为进一步探究肠道微生物节律性变化的原理以及节律性的生产应用做出铺垫。

4 结论

生长猪结肠乳酸菌在 24 h 内发生昼夜振荡, 多样性发生显著性变化, 在种水平上 *Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus* sp. KC45a 和 *Lactobacillus reuteri* 的丰度显现出节律性。

参考文献

- [1] Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, Engen PA, Keshavarzian A. Circadian rhythm and the gut microbiome. *International Review of Neurobiology*, 2016, 131: 193–205.
- [2] Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*, 2016, 535(7610): 65–74.
- [3] Leone V, Gibbons SM, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM, Pierre JF, Pierre JF, Heneghan AF, Nadimpalli A, Hubert N, Zale E, Wang Y, Huang Y, Theriault B, Dinner AR, Musch MW, Kudsk KA, Prendergast BJ, Gilbert JA, Chang EB. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 681–689.
- [4] Liang X, Fitzgerald GA. Timing the microbes: the circadian rhythm of the gut microbiome. *Journal of Biological Rhythms*, 2017, 32(6): 505–515.
- [5] Zarrinpar A, Chaix A, Yooseph S, Panda S. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell Metabolism*, 2014, 20(6): 1006–1017.
- [6] Engert LC, Weiler U, Pfaffinger B, Stefanski V, Schmucker SS. Diurnal rhythms in peripheral blood immune cell numbers of domestic pigs. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 79: 11–20.
- [7] Zhang YM, Zhou XH, Zhang B, Wu X, Yin YL. Diurnal rhythm in mRNA expression of genes encoding amino acid transporter and circadian gene cry in intestinal mucosa of piglets. *Biological Rhythm Research*, 2017, 48(4): 663–671.
- [8] Yin J, Li Y, Han H, Ma J, Liu G, Wu X, Huang X, Fang R, Baba K, Bin P, Zhu G, Ren W, Tan B, Tosini G, He X, Li T, Yin Y. Administration of exogenous melatonin improves the diurnal rhythms of the gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *mSystems*, 2020, 5(3): e00002–e00020.
- [9] Shi CW, Cheng MY, Yang X, Lu YY, Yin HD, Zeng Y, Wang RY, Jiang YL, Yang WT, Wang JZ, Zhao DD, Huang HB, Ye LP, Cao X, Yang GL, Wang CF. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes mouse gut microbiota diversity and T cell differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 607735.
- [10] Ren D, Gong S, Shu J, Zhu J, Liu H, Chen P. Effects of mixed lactic acid bacteria on intestinal microbiota of mice infected with *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, 2018, 18(1): 109.
- [11] 邓墨曦, 音建华, 汪海峰. 乳酸菌群体感应与其肠道生物膜形成的研究进展. *微生物学报*, 2018, 58(11): 1970–1978.
Deng ZX, Yin JH, Wang HF. Progress in research on quorum sensing and intestinal biofilm formation of *Lactobacillus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(11): 1970–1978. (in Chinese)
- [12] Chen LH, Wang MF, Chang CC, Huang SY, Pan CH, Yeh YT, Huang CH, Chan CH, Huang HY. *Lacticaseibacillus paracasei* PS23 effectively modulates gut microbiota composition and improves gastrointestinal function in aged SAMP8 mice. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1116.
- [13] Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, Abramson L, Katz MN, Korem T, Zmora N, Kuperman Y, Biton I, Gilad S, Harmelin A, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 2014, 159(3): 514–529.
- [14] Wang L, Ren B, Hui Y, Chu C, Zhao Z, Zhang Y, Zhao B, Shi R, Ren J, Dai X, Liu Z, Liu X. Methionine restriction regulates cognitive function in high-fat diet-fed mice: roles of diurnal rhythms of SCFAs producing- and inflammation-related microbes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(17): e2000190.
- [15] Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854–3859.
- [16] Feng L, Zhu C, Xia P, Wang H, Su Y, Zhu W. The development of intestinal lactic acid bacteria in piglets as determined by high-throughput sequencing. *Animal Biotechnology*, 2021. DOI: 10.1080/10495398.2021.2002883.

- [17] Hughes ME, Hogenesch JB, Kornacker K. JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. *eLife*, 2010, 25(5): 372–380.
- [18] Kim J, Nguyen SG, Guevarra RB, Lee I, Unno T. Analysis of swine fecal microbiota at various growth stages. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(6): 753–759.
- [19] Yang JJ, Qian K, Wang CL, Wu YJ. Roles of probiotic lactobacilli inclusion in helping piglets establish healthy intestinal inter-environment for pathogen defense. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(2): 243–250.
- [20] 付祥, 吴钰宸, 苏建青, 褚秀玲. 乳酸菌在畜牧生产中的应用进展. 饲料研究, 2021, 44(16): 137–140.
Fu X, Wu YC, Su JQ, Chu XL. Application progress on application of lactic acid bacteria in animal production. *Feed Research*, 2021, 44(16): 137–140. (in Chinese)
- [21] Thaiss CA, Levy M, Korem T, Dohnalová L, Shapiro H, Jaitin DA, David E, Winter DR, Gury-BenAri M, Tatrovsky E, Tuganbaev T, Federici S, Zmora N, Zeevi D, Dori-Bachash M, Pevsner-Fischer M, Kartvelishvily E, Brandis A, Harmelin A, Shibolet O, Halpern Z, Honda K, Amit I, Segal E, Elinav E. Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. *Cell*, 2016, 167(6): 1495–1510.e12.
- [22] Allaband C, Lingaraju A, Martino C, Russell B, Tripathi A, Poulsen O, Dantas Machado AC, Zhou D, Xue J, Elijah E, Malhotra A, Dorrestein PC, Knight R, Haddad GG, Zarrinpar A. Intermittent hypoxia and hypercapnia alter diurnal rhythms of luminal gut microbiome and metabolome. *mSystems*, 2021, 6(3): e0011621.
- [23] Kling DN, DeBose-Scarlett EM, Teixeira LD, Gezan SA, Lorca GL, Gonzalez CF. Sex modulates *Lactobacillus johnsonii* N6.2 and phytochemical effectiveness in reducing high fat diet induced mTOR activation in sprague-dawley rats. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2649.
- [24] 倪学勤, 曹希亮, 曾东, 周小秋. 猪源约氏乳酸杆菌 JJB3 和枯草芽孢杆菌 JS01 对仔猪肠道分泌型免疫球蛋白 A 和菌群的影响. 动物营养学报, 2008, 20(3): 275–280.
Ni XQ, Cao XL, Zeng D, Zhou XQ. Effects of porcine *Lactobacillus johnsonii* JJB3 and *Bacillus subtilis* JS01 on development of faecal SIgA and intestinal microflora of piglets. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(3): 275–280. (in Chinese)
- [25] Schmalte V, Lorentz A. Role of the microbiota in circadian rhythms of the host. *Chronobiology International*, 2020, 37(3): 301–310.
- [26] Martin AM, Sun EW, Rogers GB, Keating DJ. The influence of the gut microbiome on host metabolism through the regulation of gut hormone release. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 428.
- [27] David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, 505(7484): 559–563.
- [28] Ouyang J, Wang M, Bu D, Ma L, Liu F, Xue C, Du C, Aboragah A, Looor JJ. Ruminal microbes exhibit a robust circadian rhythm and are sensitive to melatonin. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 760578.
- [29] Engert LC, Weiler U, Pfaffinger B, Stefanski V, Schmucker SS. Photoperiodic effects on diurnal rhythms in cell numbers of peripheral leukocytes in domestic pigs. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 393.
- [30] Jang AY, Rod-in W, Monmai C, Sohn M, Kim TR, Jeon MG, Park WJ. Anti-inflammatory potential of *Lactobacillus reuteri* LM1071 via eicosanoid regulation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133: 67–75.
- [31] Genís S, Sánchez-Chardi A, Bach À, Fàbregas F, Arís A. A combination of lactic acid bacteria regulates *Escherichia coli* infection and inflammation of the bovine endometrium. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(1): 479–492.
- [32] Harata G, He F, Kawase M, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa S. Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. *Microbiology and Immunology*, 2009, 53(8): 475–480.
- [33] Sun L, Tian W, Guo X, Zhang Y, Liu X, Li X, Tian Y, Man C, Jiang Y. *Lactobacillus gasseri* JM1 with potential probiotic characteristics alleviates inflammatory response by activating the PI3K/Akt signaling pathway *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(9): 7851–7864.
- [34] Hu J, Ma L, Zheng W, Nie Y, Yan X. *Lactobacillus gasseri* LA39 activates the oxidative phosphorylation pathway in porcine intestinal epithelial cells. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3025.