

于泳鑫, 吴钰楠, 齐富磊, 等. 苏北地区奶牛乳房炎乳汁中微生物菌群结构及多样性调查分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 64-72.

YU Y X, WU Y N, QI F L, et al. Investigation and analysis of microflora structure and diversity in milk of dairy cows with mastitis in northern Jiangsu Province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 64-72.

## 苏北地区奶牛乳房炎乳汁中微生物菌群结构及多样性调查分析

于泳鑫<sup>1#</sup>, 吴钰楠<sup>1#</sup>, 齐富磊<sup>1</sup>, 温晨<sup>1</sup>, 张毅豪<sup>1</sup>, 左佳坤<sup>2</sup>, 韩先干<sup>2</sup>, 苗晋锋<sup>1</sup>, 贾逸敏<sup>1,3\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241;

3. 农业农村部生理生化重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 旨在通过比较苏北地区健康奶牛和乳房炎奶牛乳汁中的微生物菌群结构和多样性, 分析不同养殖场奶牛乳腺中的主要常驻菌, 为防控奶牛乳房炎的发生提供基础数据和科学依据。针对苏北地区 3 个规模化奶牛养殖场随机采集 137 份乳样, 采用加州乳房炎检测法筛选健康奶牛和乳房炎奶牛, 通过对奶样中细菌的 16S rRNA 测序分析, 揭示该地区奶牛乳房炎的流行趋势。结果表明: 该地区 3 个规模化奶牛养殖场乳房炎的平均阳性率为 42.0%, 其中, 养殖场 A 的主要乳房炎致病菌是木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*)、松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 养殖场 B 的致病菌主要是肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 和木糖葡萄球菌, 而养殖场 C 奶牛乳房炎阳性比例少, 仅有少量的木糖葡萄球菌。此外, 伯克霍尔德菌 (*Burkholderia*)、克雷伯菌 (*Klebsiella*)、链球菌 (*Streptococcus*) 和草螺菌 (*Herbaspirillum*) 是奶牛乳腺中优势常驻菌。研究表明, 16S rRNA 测序分析技术能够很好地筛选出乳样中的主要菌属, 进而分析优势常驻菌, 为防控奶牛乳房炎提供参考。

**关键词:** 奶牛; 乳房炎; 菌群结构; 16S rRNA 测序

中图分类号: S858.23

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)05-0064-09

## Investigation and analysis of microflora structure and diversity in milk of dairy cows with mastitis in northern Jiangsu Province

YU Yongxin<sup>1#</sup>, WU Yunan<sup>1#</sup>, QI Fulei<sup>1</sup>, WEN Chen<sup>1</sup>, ZHANG Yihao<sup>1</sup>, ZUO Jiakun<sup>2</sup>,

HAN Xiangnan<sup>2</sup>, MIAO Jinfeng<sup>1</sup>, JIA Yimin<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China;

3. Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The aim of this study was to compare the microbial community structure and diversity in the milk of healthy cows and mastitis-inflicted cows in northern Jiangsu Province, to analyze the main resident bacteria in the mammary glands of cows in different breeding farms, and to provide basic data and scientific basis for the prevention and control of mastitis in cows. Here, 137 milk samples were randomly collected from three large-scale dairy farms in the studied area, and healthy dairy cows and dairy cows with mastitis were screened using the California mastitis detection method. In order to reveal the epidemic trend of dairy cow mastitis in this area, bacterial 16S rRNA sequencing was applied to analyze milk samples. The results showed that the positive rate of recessive mastitis in three large-scale dairy farms in northern Jiangsu was 42.0%. Among them, the main mastitis pathogens in Farm A were *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*; and in Farm B, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus xylosus*. However, the positive rate of mastitis of dairy cows in Farm C was low, with only a small amount of *Staphylococcus xylosus*. In addition, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Streptococcus* and *Herbaspirillum* are the dominant resident bacteria in the healthy mammary glands. To conclude, the 16S rRNA sequencing analysis technology effectively screened out the main bacteria genera in the samples, and analyzed the dominant resident bacteria in a certain area, providing a reliable scientific basis for revealing the epidemic trend of pathogenic bacteria in the area.

**Keywords:** dairy cows; mastitis; microflora structure; 16S rRNA sequencing

收稿日期: 2023-07-26; 修回日期: 2024-03-06

基金项目: 国家重点研发计划-政府间国际科技创新合作重点专项 (2018YFE0102200)

第一作者: 于泳鑫, 女, 硕士; 吴钰楠, 女, 硕士。<sup>#</sup>共同第一作者

\* 通信作者: 贾逸敏, 副教授, 研究方向为应激生物学与病原感染, E-mail: jymrobin@hotmail.com。

奶牛乳房炎 (bovine mastitis) 是发生在奶牛乳腺组织的炎症, 是奶牛业生产的重要疾病之一, 它的发生与病原微生物的侵袭、环境因素、遗传因素以及饲养管理方式之间存在密切联系, 其中导致奶牛乳房炎发生的病原微生物以细菌最为常见<sup>[1-2]</sup>。近年来随着研究的不断深入, 人们认识到健康奶牛乳腺内存在复杂的微生物群落<sup>[3]</sup>。定植于奶牛乳头顶端、空口和乳头的微生物群落组成和功能与乳房炎的发生发展具有较高的相关性<sup>[4]</sup>。国内多个研究团队比较了内蒙古、新疆、四川和北京等地奶牛养殖场健康奶牛和乳房炎奶牛乳汁中微生物的多样性, 结果表明, 不同地区导致奶牛乳房炎的病原菌存在地域差异性<sup>[5-11]</sup>。江苏作为华东地区重要的奶牛养殖省份, 近年已有不少研究集中于奶牛乳房炎病原菌的分离和耐药分析<sup>[12-15]</sup>。然而, 江苏奶牛养殖场乳房炎奶牛乳汁微生物群落结构特征调查研究较少。因此, 本研究从苏北地区 3 个不同规模化程度的奶牛养殖场中收集奶样, 通过细菌 16S rRNA 测序技术, 比较分析健康奶牛和乳房炎奶牛乳汁中微生物的菌群结构和多样性差异, 了解该地区的主要优势致病菌, 为预防和控制乳房炎的发生提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样品采集与保存

2020 年 8 月 26、27 日分别于宿迁和新沂 3 个规模化奶牛场随机采集 146 份乳样。3 个奶牛场分别记为 A 场、B 场、C 场, 其中 A、B 场位于宿迁, A 为规模化老场, B 为规模化新场, C 场位于新沂, 是传统简易老场。为了排除抗生素对牛奶中微生物菌群的影响, 选取至少 1 个月无抗生素治疗的荷斯坦奶牛进行乳样收集。采样前, 先用温水冲洗乳房, 然后依次用 0.2% 的新洁尔灭、75% 酒精擦拭消毒乳头, 在每次清洗或消毒乳头后均用消毒纱布擦干。弃去头 3 把乳汁, 按无菌操作规程将乳样装入高压灭菌的 50 mL 离心管中, 每个样品采集 2 份, 并进行牛号、乳区等标记, 冷藏保存、尽快带回实验室进行乳样分析。

### 1.2 加州乳房炎检测 (CMT) 法检测奶牛乳房炎

采用 CMT 法对采集的乳样进行乳房炎筛查。试剂配制方法: 称取 30 g 十二烷基磺酸钠 (阿拉丁, 货号: S108349), 溶解于 1 000 mL 蒸馏水, 用 2 mol · L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠调节至 pH = 6.4, 再加入 0.1 g 溴甲酚紫 (阿拉丁, 货号: B101194), 完全溶解后即成 CMT 检验液。

取 2 mL 待检乳样置于诊断盘中, 滴加等体积的 CMT 检验液, 缓慢混匀, 50 s 后进行判读。CMT 法判断标准如表 1 所示。

表 1 CMT 法判定标准

判定	符号	乳汁反应	体细胞数/ (×10 <sup>4</sup> · mL <sup>-1</sup> )
阴性	-	混合物呈液体, 无凝集反应, 倾斜检验盘时, 液体流动正常, 无沉淀物	0 ~ <20
可疑	±	混合物呈液体, 倾斜检验盘时, 杯底出现微量极细颗粒, 不久便消失	20 ~ <50
弱阳性	+	杯底出现少量沉淀物, 有明显凝集反应, 倾斜检验盘时, 沉淀物散布杯底, 有一定黏附性	50 ~ <150
阳性	++	杯底沉淀物较多且大量凝集, 呈胶状物, 倾斜检验盘时, 沉淀物明显黏附杯底难以流动, 旋转摇动时, 沉淀物有聚中倾向	150 ~ <500
强阳性	+++	杯内混合物聚集, 完全形成明显胶状凝集物, 倾斜摇动检验盘时, 凝集物聚集呈团块, 难以散去	≥500

### 1.3 乳样中细菌总 DNA 的提取

参考 Collado 等<sup>[16]</sup>方法提取乳样中细菌的总 DNA。从无菌的离心管中吸取乳样, 2 000 r/min 离心 20 min 后弃掉上层液体, 收集细菌沉淀, 用 5 mL Tris-EDTA 缓冲液重悬后以上述转速离心, 弃掉上层液体, 对细菌洗涤 3 次。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生物科技公司 (货号: DP302-02), 按照提取试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。随后, 采用 NanoDrop (ND-1000, USA) 检测样品 DNA 的浓度和纯度, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

### 1.4 乳汁中细菌 DNA 的 16S rRNA 测序

样品 DNA 送上海美吉生物科技有限公司进行 16S rRNA 测序。针对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区设计引物, 以乳样提取的 DNA 为模板, 进行预扩增。随后, 采用 Illumina Miseq 对扩增子序列进行测序。引物序列为: 515F: 5' - GTGCCAGCMGC-CGCGGTAA - 3', 806R: 5' - GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3'。

### 1.5 生物信息学分析

MiSeq 测序后得到双端序列数据, 经质控过滤后得到的优化序列进行比对、拼接。使用 UPARSE 软

件, 根据 97% 的相似度对序列进行操作分类单元 (OTU) 聚类 and 物种分类学分析。基于 OTU 聚类分析结果, 可以对 OTU 进行  $\alpha$  和  $\beta$  多样性指数分析, 包括 Simpson 指数、Shannon 指数、样本覆盖率 (Ace) 指数和个体丰度分布的多样性估计 (Chao) 指数; 基于分类学信息, 可以在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。在上述分析的基础上, 可以对健康组和乳房炎组的样本进行主坐标分析 (PCoA) 以及差异显著性检验, 并进行可视化图形处理。另外, 采用分层聚类热图进行聚类分组: 组 1: 健康奶牛 (H) 组和乳房炎奶牛 (M) 组聚类; 组 2: A 场、B 场、C 场样品聚类; 组 3: A 场健康奶牛 (AH) 组和乳房炎奶牛 (AM) 组, B 场健康奶牛 (BH) 组和乳房炎奶牛 (BM) 组, C 场健康奶牛 (CH) 组和乳房炎奶牛 (CM) 组分别进行聚类。比较农场间健康奶牛和乳房炎奶牛乳样的微生物群落。为了确定奶牛场的健康奶牛和乳房炎奶牛乳样细菌组成之间的生物标

记物, 使用 LEfSe 法在种水平上进行线性判别分析 (LDA)。

## 1.6 数据统计与分析

使用 Flash 进行 pair-end 双端序列拼接, Qiime 生成各分类学水平丰度表,  $\beta$  多样性距离计算, Uparse 进行 OTU 聚类, RDP Classifier 进行序列分类注释, Mothur 进行  $\alpha$  多样性分析。数据分析软件为 SPSS 22.0 和 Vegan R package 软件 (version 3.3.1)。 $P < 0.05$  表示差异显著。各指数数据以“平均值  $\pm$  标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 CMT 法筛查奶牛乳房炎的检测

如表 2 所示, A 场的阳性率最高, 为 61.8%。3 个奶牛场的平均乳房炎阳性率为 42.0%, 其中以弱阳性为主, 强阳性乳样占比较少。

表 2 CMT 法检测奶牛乳房炎情况分析

场别	乳样数量/份				总数/份	阳性率/%
	阴性 (-)	弱阳性 (+)	阳性 (++)	强阳性 (+++)		
A	13	11	8	2	34	61.8
B	37	10	4	5	56	33.9
C	36	13	4	3	56	35.7
合计	86	34	16	10	146	42.0

### 2.2 乳房炎对牛乳中微生物组成丰富度和多样性的影响

对 3 个农场包括 A 场健康乳样 7 份和乳房炎乳样 11 份, B 场健康乳样 6 份和乳房炎乳样 10 份, C 场健康乳样 13 份和乳房炎乳样 10 份, 共 57 份乳样进行 16S rRNA 测序, 总共得到 5 796 277 条高质量序列。按照序列 97% 的相似性进行 OTU 分类, 共获得 24 个门, 47 个纲, 123 个目, 252 个科, 613 个属, 1 026 个种和 1 836 个 OTU; A 场乳样中微生物包含 14 个门, 26 个纲, 77 个目, 156 个科, 379 个属, 589 个种和 971 个 OTU; B 场乳样中微生物包含 20 个

门, 36 个纲, 89 个目, 177 个科, 399 个属, 596 个种和 926 个 OTU; C 场乳样中微生物包含 21 个门, 31 个纲, 82 个目, 170 个科, 378 个属, 572 个种和 860 个 OTU。分别对 3 个农场的健康奶牛和乳房炎奶牛乳样中微生物进行  $\alpha$  多样性分析, 结果显示 (表 3), 与健康乳样相比, A 场和 B 场乳房炎乳样中微生物群落 Shannon 指数显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 Simpson 指数显著下降 ( $P < 0.05$ ); C 场组间在 Shannon 指数和 Simpson 指数上均无显著性差异。结果提示, A 场和 B 场乳房炎奶牛乳样较健康奶牛乳样细菌群落多样性增加, 但细菌群落中种数减少。

表 3 乳房炎对牛乳中微生物组成丰富度和多样性的影响

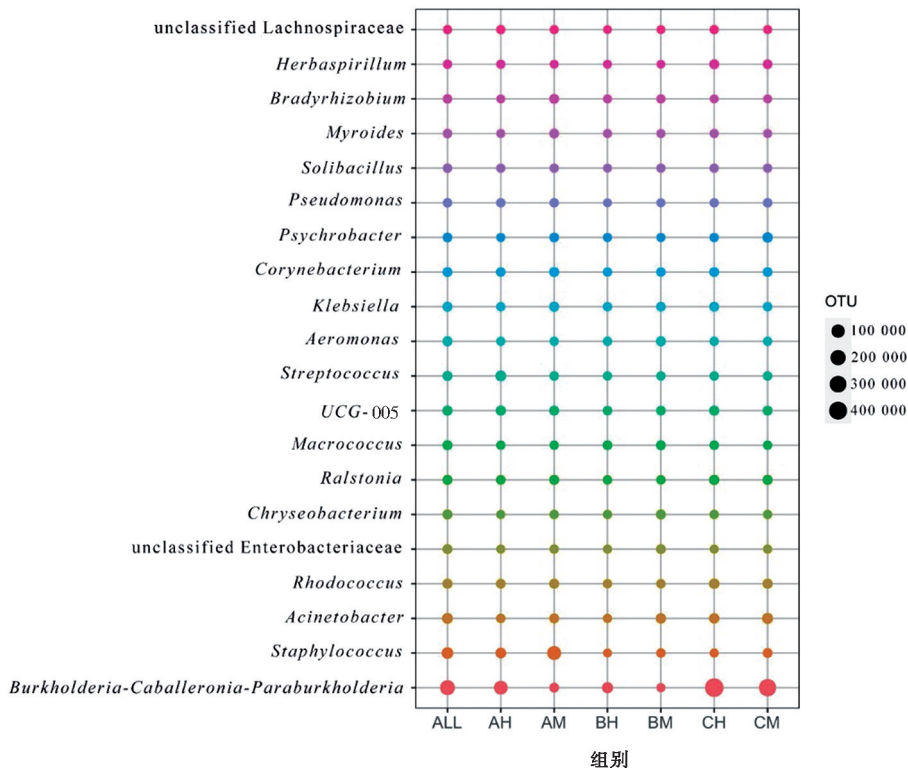
组别	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao 指数
AH	2.34 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	899.02 $\pm$ 54.14	916.04 $\pm$ 54.51
AM	3.70 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	820.26 $\pm$ 60.86	830.12 $\pm$ 63.12
BH	2.29 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	616.15 $\pm$ 161.06	626.80 $\pm$ 165.36
BM	4.16 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	906.10 $\pm$ 107.97	909.56 $\pm$ 110.91
CH	1.53 $\pm$ 0.18	0.62 $\pm$ 0.04	640.41 $\pm$ 70.25	651.18 $\pm$ 71.73
CM	1.65 $\pm$ 0.13	0.55 $\pm$ 0.04	689.37 $\pm$ 53.03	696.45 $\pm$ 52.67

注: 同一奶牛场不同组间, 数据肩标小写字母不同表示显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 健康奶牛和乳房炎奶牛乳中微生物的组成丰度分析

如图1所示, 3个奶牛场间微生物的优势细菌和丰度都有明显不同。A场乳房炎乳样中优势细菌以葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 为主, 其中木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*)、松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*) 分别占 24.1%、23.2%; B场细菌丰度分布较为均匀, 但B场健康奶牛牛乳中优势细菌以伯克霍尔德氏菌-卡巴拉氏菌-拟伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) 为主; C场中细菌伯克霍尔德氏菌-卡巴拉氏菌-拟伯克霍尔德氏菌属占比最大, 高达 85.2%。

如图2所示, 比较3个不同奶牛场健康奶牛和乳房炎奶牛乳样中微生物菌群种水平 OTU 总数排名前20的丰度发现, 在A场中, 乳房炎组乳样的木糖葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、慢生型大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 以及肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 含量显著高于健康组乳样 ( $P < 0.05$ ); 在B场中, 乳房炎组乳样的约翰逊不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*)、产吡啶金杆菌 (*Chryseobacterium indologenes*) 以及木糖葡萄球菌含量显著高于健康组乳样 ( $P < 0.05$ ); 在C场中, 乳房炎组乳样的木糖葡萄球菌和约翰逊不动杆菌含量显著高于健康组乳样 ( $P < 0.05$ )。



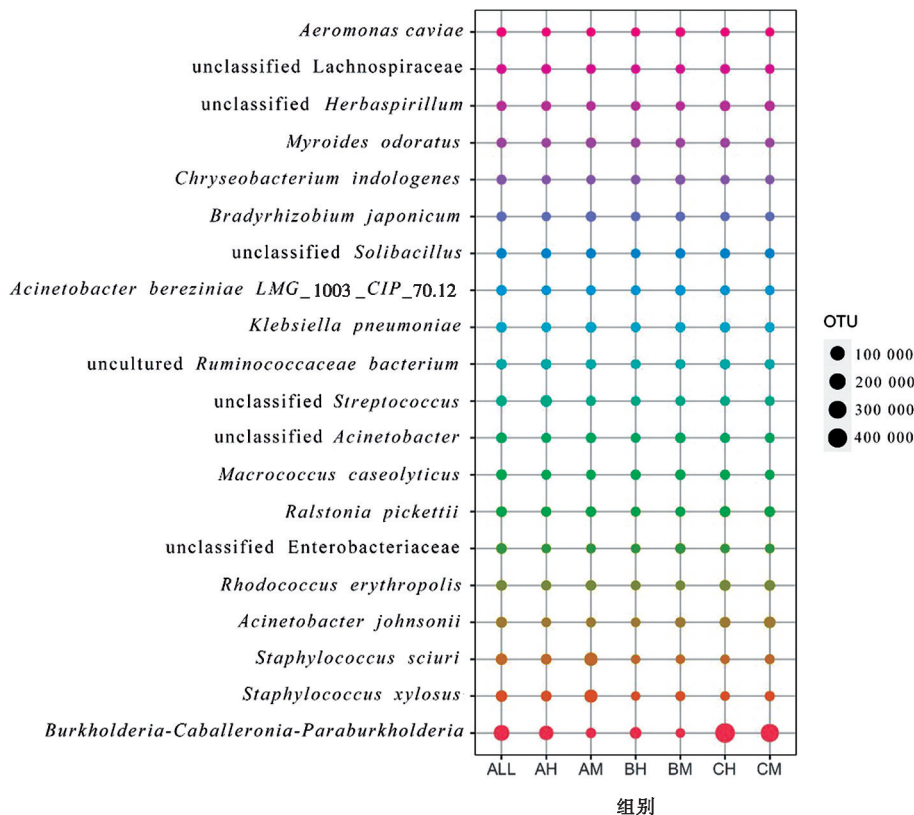
unclassified Lachnospiraceae, 未分类的毛螺科; Herbaspirillum, 草螺菌属; Bradyrhizobium, 慢生根瘤菌属; Myroides, 类香味菌属; Solibacillus, 土壤芽胞杆菌属; Pseudomonas, 假单胞菌属; Psychrobacter, 嗜冷菌属; Corynebacterium, 棒状杆菌属; Klebsiella, 克雷伯菌属; Aeromonas, 气单胞菌属; Streptococcus, 链球菌属; UCG-005, 瘤胃球菌属; Macroccoccus, 巨大球菌属; Ralstonia, 罗尔斯顿菌属; Chryseobacterium, 金黄杆菌属; unclassified Enterobacteriaceae, 未分类的肠杆菌科; Rhodococcus, 红球菌属; Acinetobacter, 不动杆菌属。圆圈的大小表示每个组中种的相对丰度, ALL表示3个农场乳样合并组, 下同。

图1 属水平健康奶牛和乳房炎奶牛牛乳中微生物组成的丰度分析

### 2.4 健康奶牛和乳房炎奶牛乳样中微生物组成的主坐标分析

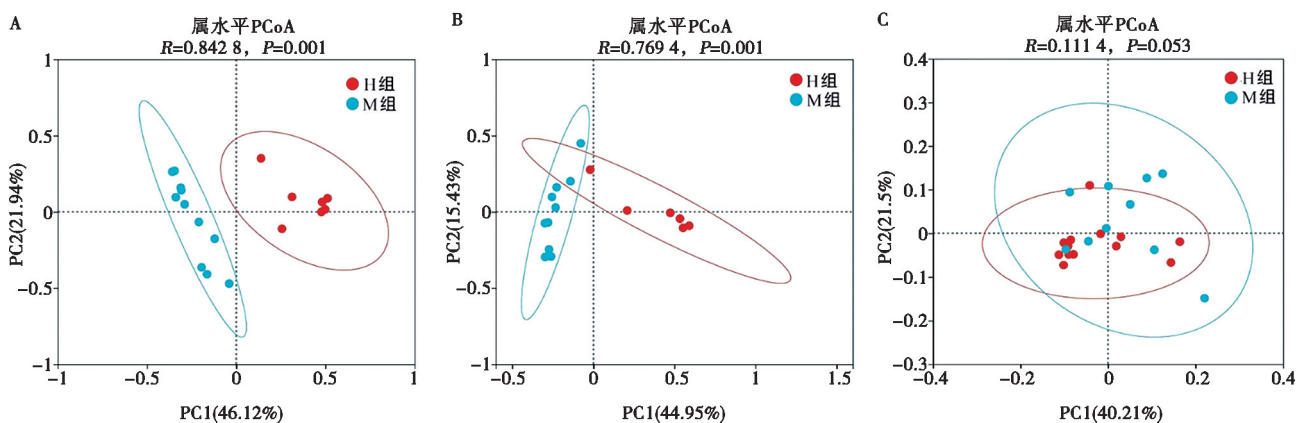
对3个农场的乳样微生物分别进行β多样性分析, 结果如图3所示, 基于Bray-Curtis距离算法, A场和B场的乳样微生物在健康组和乳房炎组中存在

距离显著性 ( $P < 0.01$ ), 提示A场和B场健康奶牛和乳房炎奶牛的乳样微生物的组成结构存在差异性; 而C场健康奶牛和乳房炎奶牛的乳样中不存在距离显著性, 提示C场健康奶牛和乳房炎奶牛的乳样微生物组成结构无空间差异性。



*Aeromonas caviae*, 气单胞菌; unclassified *Herbaspirillum*, 未分类的草螺菌属; *Myroides odoratus*, 类香味类香味菌; unclassified *Solibacillus*, 未分类的土壤芽胞杆菌属; *Acinetobacter bereziniae* LMG\_1003\_CIP\_70.12, 不动杆菌的一种; uncultured *Ruminococcaceae bacterium*, 非可培养的瘤胃球菌细菌; unclassified *Streptococcus*, 未分类的链球菌属; unclassified *Acinetobacter*, 未分类的不动杆菌属; *Macroccoccus caseolyticus*, 巨大球菌; *Ralstonia pickettii*, 皮氏罗尔斯顿氏菌; *Rhodococcus erythropolis*, 嗜吡啉红球菌。

图 2 种水平健康奶牛和乳房炎奶牛乳中微生物组成的丰度分析



A. A 场; B. B 场; C. C 场。

图 3 健康奶牛和乳房炎奶牛乳样中微生物组成的 PCoA 分析

### 2.5 分层聚类热图比较农场间健康奶牛和乳房炎奶牛乳样的微生物群落

对 57 份乳样的测序结果在属水平上进行分层聚类热图分析, 结果显示, 不同乳汁样品中微生物种水

平的分布是不同的 (图 4)。从乳样的来源来看, C 场微生物图谱具有较好的相似度, 几乎都聚类在健康奶牛组, A 场和 B 场的乳样微生物图谱明显的分为健康奶牛和乳房炎奶牛组。从乳样的性质来看, 伯克霍

尔德菌-卡巴拉氏菌-拟伯克霍尔德氏菌属、草螺菌属、红球菌属和皮氏罗尔斯顿菌在健康奶牛乳样中丰度较高，并且当奶牛患乳房炎后，前两者的丰度显

著降低 ( $P < 0.01$ )。此外，约翰逊不动杆菌在 C 场乳房炎奶样中丰度较高。

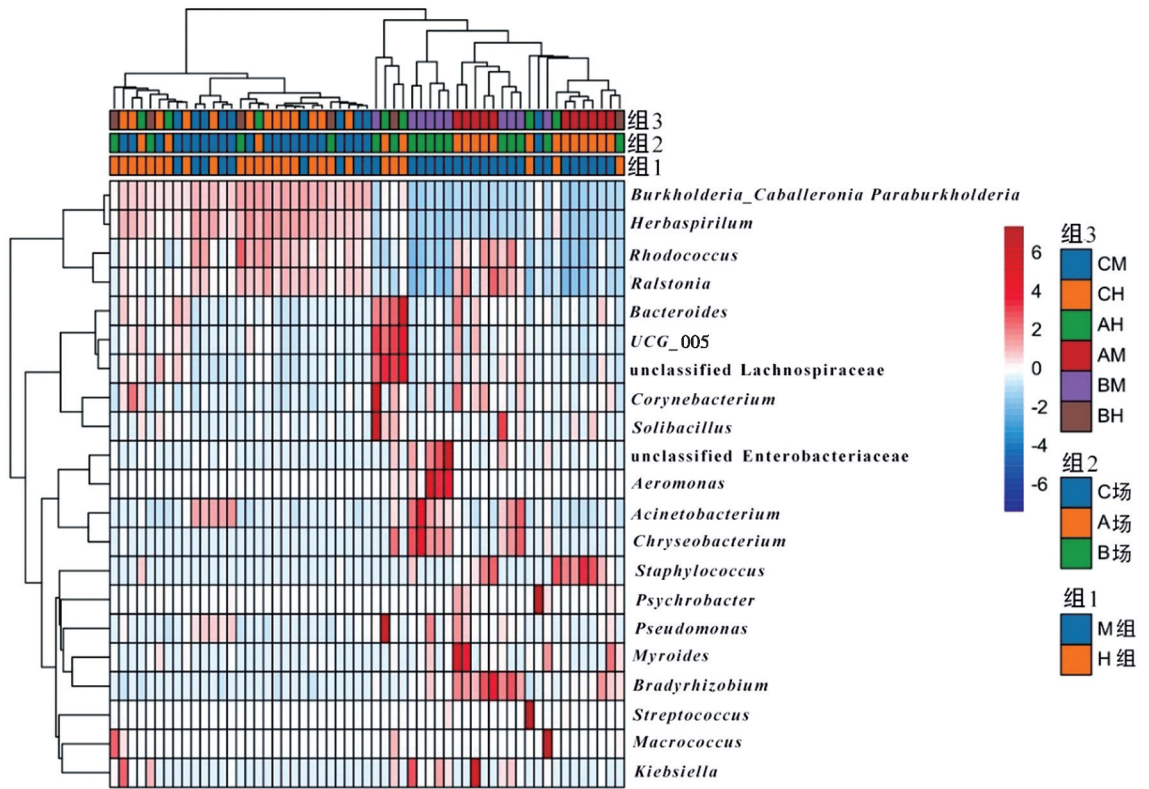


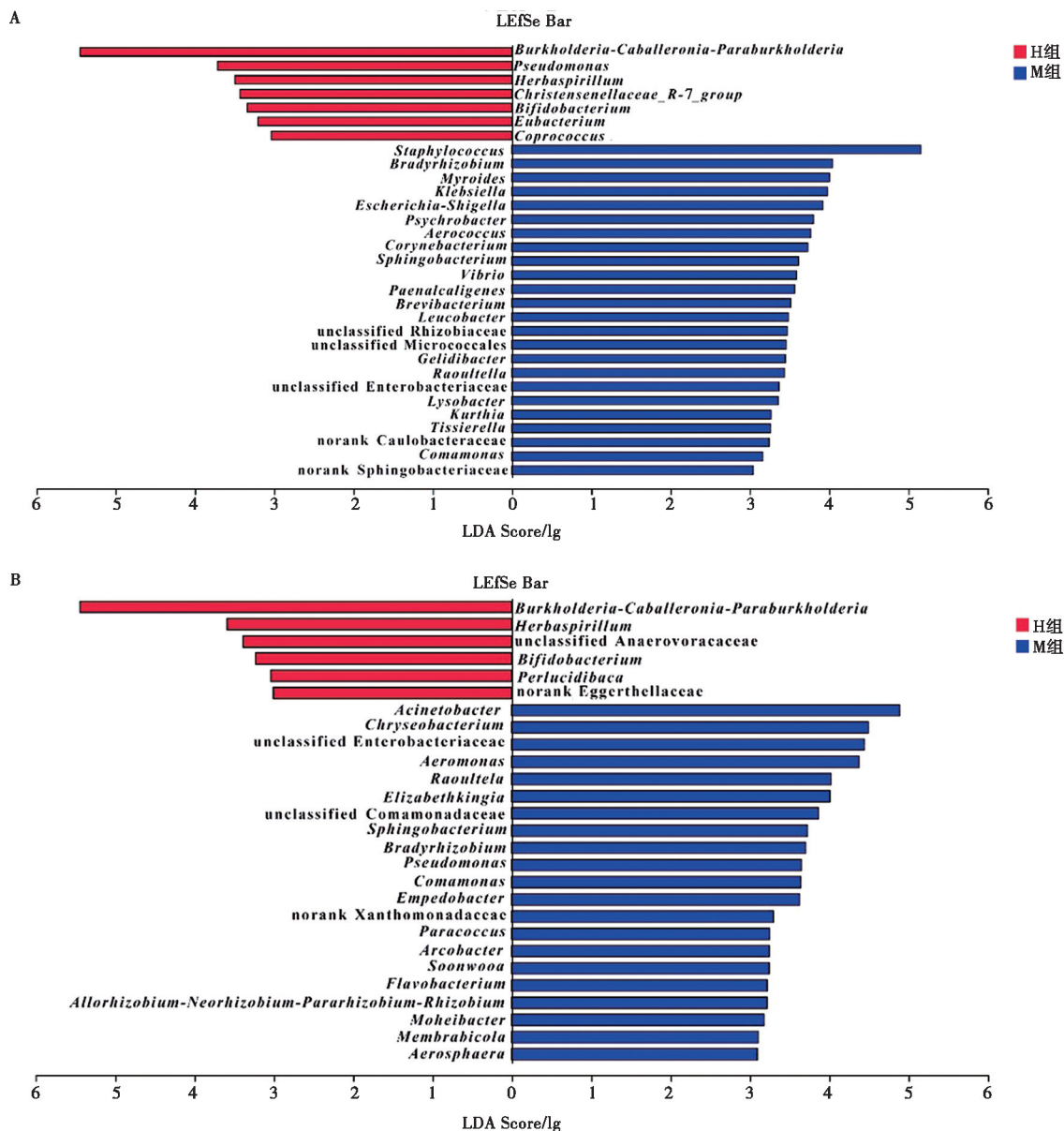
图 4 属水平健康奶牛和乳房炎奶牛乳样微生物图谱的分层聚类热图

图 4 属水平健康奶牛和乳房炎奶牛乳样微生物图谱的分层聚类热图

## 2.6 LEfSe 分析健康奶牛和乳房炎奶牛乳样的微生物标志物

如图 5 所示，在差异物种的贡献度 (LDA Score) 大于设定值 3 的条件下，A 场乳房炎组和健康组之间共存在 31 个显著差异的物种，其中健康奶牛组 7 个显著差异物种，以假单胞菌属、草螺菌属、克里斯滕森菌属、双歧杆菌属、真杆菌属、粪球菌属为主要标志菌属；乳房炎奶牛组 24 个显著差异物种，以葡萄

球菌属贡献度最大；B 场乳房炎组和健康组之间共存在 27 个显著差异物种，其中健康奶牛组 6 个显著差异物种，以草螺菌属、双歧杆菌属、透明菌属为标志菌属；乳房炎奶牛组 21 个显著差异物种，以不动杆菌属贡献度最大；C 场只有乳房炎奶牛组存在微生物标志物且为假单胞菌属。这一结果表明，乳房炎奶牛和健康奶牛乳汁间有较多优势细菌在属水平上存在差异。



*Christensenellaceae\_R-7\_group*, 克里斯滕森菌科成员; *Bifidobacterium*, 双歧杆菌; *Eubacterium*, 真杆菌; *Coprococcus*, 粪球菌属; *Escherichia-Shigella*, 埃希菌-志贺菌属; *Corynebacterium*, 棒状杆菌; *Sphingobacterium*, 鞘氨醇杆菌属; *Vibrio*, 弧菌属; *Paenalcigenes*, 人类产碱菌; *Brevibacterium*, 短杆菌属; *Leucobacter*, 亮杆菌属; unclassified Micrococcales, 未分类的微球菌目; *Gelidibacter*, 冷冰杆菌属; *Kurthia*, 库尔特氏杆菌; *Tissierella*, 泰氏菌属; norank Caulobacteraceae, 根杆菌科的一种; *Comamonas*, 丛毛单胞菌属; norank Sphingobacteriaceae, 鞘菌科的一个分支; *Perlucidibaca*, 透明球菌属; *Raoultella*, 拉乌尔菌属; unclassified Comamonadaceae, 未分类的的菊科菌属; *Empedobacter*, 短杆菌属; norank Xanthomonadaceae, 植物根茎中的优势菌属中一种; *Paracoccus*, 副球菌属; *Arcobacter*, 弓形菌属; *Flavobacterium*, 黄杆菌属; *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, 异根菌-新根菌-副根菌-根瘤菌属; *Moheibacter*, 漠河杆菌属; *Aerosphaera*, 尖球虫属。

图5 LEfSe分析健康奶牛和乳房炎奶牛乳样的微生物标志物

### 3 讨论

长期以来,人们一直认为乳腺组织中没有细菌定植,健康奶牛分泌的乳汁是无菌的。但随着新测序技术的应用,这种认识受到了越来越多的挑战<sup>[17]</sup>。健康女性的母乳中分离出多种细菌,包括表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、螳螂链球菌、唾液链球菌、唾

液乳杆菌、发酵乳杆菌、加氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和双歧杆菌等<sup>[18]</sup>。Rainard<sup>[17]</sup>通过焦磷酸盐测序发现健康奶牛乳样中也有多个种属的细菌。大量的研究表明<sup>[1, 19-23]</sup>:厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)和放线菌门(Actinobacteriota)是形成乳汁微生物群结构的主要细菌门;在属水平,葡萄球菌、瘤胃球菌科、毛杆菌

科、丙酸杆菌、窄养单胞菌、棒状杆菌、假单胞菌、链球菌、丛毛单胞菌属、肠球菌属、乳杆菌属和梭杆菌属是健康奶牛乳样微生物群中最常检测到的细菌。本试验研究表明,假单胞菌属、草螺菌属、克里斯滕森菌属、双歧杆菌属、真杆菌属、粪球菌属和透明菌属是健康乳样中的标志性菌,它们也都归属于变形菌门、放线菌门和厚壁菌门。本试验结果与上述报道存在一定的差异,推测可能与养殖场地理位置、饲养管理水平、气候、遗传因素等有关<sup>[24]</sup>。

$\alpha$ 多样性分析表明,相较于健康奶牛,乳房炎奶牛乳汁中的 Shannon 指数显著升高,表明乳房炎乳汁中微生物群落多样性显著增加,该结果与肖璐等<sup>[5]</sup>的研究结果一致;从比较指数均值结果来看,乳房炎乳汁中 Ace 指数、Chao 指数较健康奶牛组存在升高趋势,该结果与曾学琴等<sup>[7]</sup>和张皓淳<sup>[25]</sup>的研究结果一致,表明感染奶牛乳房炎后,菌群丰富度可能存在差异。有研究表明,乳房微生物群总体组成存在高度多样化,且个体差异显著,菌群组成结构受季节、产奶批次等原因的影响<sup>[26]</sup>;另外卫生条件已被证实对乳腺炎病原体的传播有重要的影响,从而增加了农场之间乳汁中菌群结构的多样性<sup>[27]</sup>,因此出现该试验结果可能与乳房炎乳汁处于的感染阶段不同、养殖场的自然环境不同、采样量不同等因素有关。本试验结果表明,江苏地区3个奶牛场乳房炎致病菌在门水平上排名前四的是变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门;在属水平上主要以葡萄球菌属为主,并以木糖葡萄球菌、松鼠葡萄球菌等凝固酶阴性葡萄球菌丰度最高,除此之外,肺炎克雷伯菌、约翰逊不动杆菌以及产吡啶金黄色杆菌丰度同样较高。该结果与郭佳禾等<sup>[12]</sup>和周明旭等<sup>[15]</sup>的报道相一致。另外,孙艳等<sup>[24]</sup>也报道;2019—2021年江苏地区奶牛乳房炎致病菌排名前三的致病菌为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌;王强等<sup>[13]</sup>对江苏地区感染葡萄球菌属的乳样进行病原菌分离鉴定,发现凝固酶阴性葡萄球菌占比高达73.4%。本试验结果也进一步证实了凝固酶阴性葡萄球菌可能是当前江苏地区奶牛养殖场乳房炎的主要流行病原菌。

近来,国外的研究报道也显示了凝固酶阴性葡萄球菌的流行率正呈现上升趋势<sup>[28-29]</sup>。经产奶牛通常在哺乳后期感染凝固酶阴性葡萄球菌,而初产奶牛则在产犊前或产犊后不久发生感染,虽然其致病性不如其他主要乳腺炎病原,如金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠菌体,但其感染为亚临床状态,可引起持续感染,从而导致牛奶体细胞计数增加和牛奶质量下降<sup>[30-31]</sup>。目前涉及牛乳腺炎的凝固酶阴性葡萄球菌的了解是有限的,因此对于凝固酶阴性葡萄球菌导致

的奶牛乳房炎流行病学研究及菌种的可靠鉴定,对于早期发现亚临床型奶牛乳房炎,提升乳制品的质量具有重要意义。

随着16S rRNA测序技术的日趋成熟,其相较于传统的病原菌分离法表现出更明显的优势,被越来越多地运用于土壤、海洋、疾病等方面的研究<sup>[30]</sup>。本试验研究与肖璐等<sup>[5]</sup>、刘肖利等<sup>[6]</sup>、孟佳<sup>[32]</sup>的报道均提示了16S rRNA测序技术可以运用于奶牛乳房炎的临床诊断,同时也为奶牛乳房炎的流行病学分析提供关键的技术支撑。

## 4 结论

16S rRNA测序技术能很好地区分出苏北地区健康奶牛和乳房炎奶牛乳样的微生物区系,并且数据的分析提示凝固酶阴性葡萄球菌属可能是该地区当前重要的奶牛乳房炎致病菌。

## 参考文献:

- [1] BHATT V D, AHIR V B, KORINGA P G, et al. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing [J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 112 (4): 639-650.
- [2] METZGER S A, HEMANDEZ L L, SUEN G, et al. Understanding the milk microbiota [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2018, 34 (3): 427-438.
- [3] DERAKHSHANI H, FEHR K B, SEPEHRI S, et al. Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101 (12): 10605-10625.
- [4] 童津津, 张华, 熊本海, 等. 奶牛乳腺内微生物区系与乳房健康的关系研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2021, 33 (2): 651-657.
- [5] 肖璐, 谢晶, 于吉锋, 等. 基于16S rDNA扩增子测序技术分析四川省奶牛乳房炎乳汁中微生物菌落多样性 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (5): 77-82.
- [6] 刘肖利, 程彪, 刘璐瑶, 等. 基于高通量测序技术分析奶牛乳房炎关联微生物群落结构及多样性 [J]. *新疆农业科学*, 2022, 59 (4): 1025-1033.
- [7] 曾学琴, 柳陈坚, 杨雪, 等. 高通量测序法检测奶牛乳房炎关联微生物群落结构及多样性 [J]. *浙江农业学报*, 2019, 31 (9): 1437-1445.
- [8] 席晓敏, 马晨, 黄卫强, 等. 健康牛与乳房炎患牛乳中微生物多样性的比较研究 [J]. *中国奶牛*, 2014 (17): 14-20.
- [9] 吕倩, 马莉, 骆巧, 等. 基于高通量测序技术分析四川两个奶牛场乳汁的菌群差异 [J]. *微生物学报*, 2021, 61 (10): 3087-3102.
- [10] WANG Y, NAN X, ZHAO Y, et al. Discrepancies among healthy, subclinical mastitic, and clinical mastitic cows in fecal microbiome and metabolome and serum metabolome [J]. *J Dairy Sci*, 2022, 105 (9): 7668-7688.
- [11] 赵洁, 马晨, 席晓敏, 等. PCR-DGGE法分析健康奶牛和乳房

- 炎患牛肠道微生物菌群的多样性 [J]. 中国奶牛, 2014 (17): 1-5.
- [12] 郭佳禾, 唐程, 王梦琦, 等. 江苏某奶牛场乳房炎致病菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55 (9): 67-70.
- [13] 王强, 黄攀, 王倩倩, 等. 江苏地区奶牛源葡萄球菌耐药性分析与红霉素诱导的克林霉素耐药药检 [J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29 (2): 77-81.
- [14] 葛东红, 周明旭, 朱纯, 等. 江苏某牛场生牛乳中肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌的分离鉴定、耐药性和毒力分析 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (6): 1140-1144.
- [15] 周明旭, 左晓昕, 徐悦, 等. 江苏某牛场奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定、耐药性及保守抗原分析 [J]. 扬州大学学报, 2019, 40 (6): 54-60.
- [16] COLLADO M C, DELGADO S, MALDONADO A, et al. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR [J]. Lett Appl Microbiol, 2009, 48 (5): 523-528.
- [17] RAINARD P. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? [J]. Vet Res, 2017, 48 (1): 25.
- [18] JEURINK P V, VAN B J, JIMENEZ E, et al. Human milk: a source of more life than we imagine [J]. Benef Microbes, 2013, 4 (1): 17-30.
- [19] BONSAGLIA E, GOMES M S, CANISSO I F, et al. Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 8067.
- [20] GANDA E K, BISINOTTO R S, LIMA S F, et al. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37565
- [21] GANDA E K, GAETA N, SIPKA A, et al. Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines [J]. Microbiome, 2017, 5 (1): 74.
- [22] KUEHN J S, GORDEN P J, MUNRO D, et al. Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e61959.
- [23] OIKONOMOU G, BICALHO M L, MEIRA E, et al. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters [J]. PLoS One, 2014, 9 (1): e85904.
- [24] 孙艳, 周国燕, 伍天碧, 等. 我国奶牛乳房炎近期研究进展 [J]. 中国乳业, 2022 (4): 43-51.
- [25] 张皓淳. 奶牛乳房炎关联微生物群落结构及多样性检测 [J]. 现代农业, 2021 (3): 66-67.
- [26] PORCELLATO D, MEISAL R, BOMBELLI A, et al. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 21608.
- [27] RUEGG P L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention [J]. J Dairy Sci, 2017, 100 (12): 10381-10397.
- [28] 何文娟, 刘云祥. 国内外奶牛临床型乳房炎发生现状及其危害 [J]. 中国牛业科学, 2022, 48 (5): 71-75.
- [29] KIM S J, MOON D C, PARK S C, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea [J]. J Dairy Sci, 2019, 102 (12): 11439-11448.
- [30] PYÖRÄLÄ S, TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens [J]. Vet Microbiol, 2009, 134: 3-8.
- [31] ADDIS M F, MAFFIOLI E M, CECILIANI F, et al. Influence of subclinical mastitis and intramammary infection by coagulase-negative staphylococci on the cow milk peptidome [J]. J Proteomics Vol, 2020, 226: 103885.
- [32] 孟佳. 利用高通量测序技术对奶牛乳腺菌群结构的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.