

不同地理纬度笼养狼肠道菌群多样性比较研究

张宇硕^① 姚红玉^① 吴楠^① 武芳婷^① 张生^② 王媛^②
赵玲玲^③ 贾天赐^③ 吴弘^{①*} 赵大鹏^{①*}

① 天津师范大学生命科学学院 天津 300387; ② 天津市动物园 天津 300381; ③ 南京市红山森林动物园 南京 210028

摘要: 动物肠道菌群关系其健康状态, 而菌群组成受到生活环境等因素的影响, 探究其中关系有利于更好地进行物种保护。本研究基于非损伤性取样, 利用 16S rDNA 高通量测序技术, 开展不同地理纬度笼养国家二级重点保护野生动物狼 (*Canis lupus*) 的肠道菌群结构比较和初步功能预测。针对取自天津市动物园 (38°88' N) 和南京市红山森林动物园 (31°14' N) 两地饲养的狼粪便样本 (分别简称为天津样本和南京样本) 进行高通量测序, 利用生物信息学比较分析两组样本的微生物组成和多样性差异。结果表明: Student's *t* 和 Welch's *t* 检验显示南京样本的 α 多样性显著高于天津样本。在门水平上, 厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 是两组样本中的优势菌门, 天津样本中弯曲杆菌门 (Campilobacterota) 的丰度显著高于南京样本。在属水平上, 两组样本的肠道菌群中优势菌属均包括艰难梭菌属 (*Peptoclostridium*)、柯林斯菌属 (*Collinsella*) 和狭义梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*)。基于 Unweighted UniFrac 距离进行 PCoA 分析, 发现天津样本和南京样本的菌群结构存在明显差异。最后, 通过 PICRUSt 分析预测可能的代谢通路, 并与两地狼的肠道菌群进行相关性分析。期望本研究结果为该物种饲养种群的异地保护和野生种群的综合管理提供科学参考。

关键词: 食肉目; 肠道菌群; 环境差异

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2023) 02-250-13

Comparative Study on Intestinal Flora Diversity of Captive *Canis lupus* Living at Different Geographical Latitudes

ZHANG Yu-Shuo^① YAO Hong-Yu^① WU Nan^① WU Fang-Ting^① ZHANG Sheng^②
WANG Yuan^② ZHAO Ling-Ling^③ JIA Tian-Ci^③ WU Hong^{①*} ZHAO Da-Peng^{①*}

① College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387; ② Tianjin Zoo, Tianjin 300381;

③ Nanjing Hongshan Forest Zoo, Nanjing 210028, China

Abstract: [Objectives] Intestinal flora of animals is related to their health, and the composition of flora is affected by many factors including living environment. Exploring the relationship between intestinal flora

基金项目 中央财政林业补助资金项目-野生动物监测专项, 生态环境部生物多样性调查、观测与评估项目, 国家自然科学基金项目 (No. 31772468);

* 通讯作者, E-mail: skywuhong@tjnu.edu.cn, skyzdp@tjnu.edu.cn;

第一作者介绍 张宇硕, 男, 硕士研究生; 研究方向: 野生动物资源保护; E-mail: 1298623935@qq.com。

收稿日期: 2022-05-24, 修回日期: 2022-11-16 DOI: 10.13859/j.cjz.202302009

diversity and living condition is conducive to promoting animal conservation. Based on non-injury sampling and 16S rDNA high-throughput sequencing, this study compared the intestinal flora structures of captive *Canis lupus* at two different geographical latitudes. **[Methods]** High-throughput sequencing by the Illumina Miseq platform was performed on 19 fecal samples of *C. lupus* collected from Tianjin Zoo (38°88' N) and Nanjing Hongshan Forest Zoo (31°14' N) (Tianjin group and Nanjing group, respectively). Bioinformatics was used to analyze the sequencing and to compare the differences in microbial composition and diversity between two groups. Student's *t* test and Welch's *t* test were used to detect the difference in the Alpha diversity, while the Beta diversity was analyzed by principal coordinates analysis (PCoA) based on weighted and unweighted UniFrac distances. Functional prediction analysis was used to predict the metabolic pathways and explore the correlation with the intestinal microbiota of *C. lupus* of both groups. **[Results]** After OTU clustering according to 97% similarity (Fig. 1), the microbial composition was analyzed between two groups. At the phyla level, Firmicutes and Actinobacteria were the dominant phyla in two groups, and the abundance of Campilobacterota in Tianjin group was higher than that in Nanjing group (Fig. 2). At the genus level, the relative abundance of *Peptostreptococcus* in Nanjing group was significantly higher than that in Tianjin group (Fig. 3). *Peptoclostridium*, *Collinsella* and *Clostridium _sensu_stricto_1* were the dominant genus for both groups (Fig. 4). Both the Alpha diversity indices (Shannon index) (Fig. 5, 6) and PCoA analysis based on unweighted UniFrac distance revealed significant group differences in intestinal flora structure (Fig. 7). The main functions of intestinal microbiota of two groups were basically the same (Fig. 8). **[Conclusion]** The intestinal flora diversity of Nanjing group was significantly higher than that of Tianjin group. Different feeding environment directly affects the diversity and relative abundance of intestinal flora. The findings in this study provide basic scientific reference for both the conservation of captive population and the comprehensive management of wild population in this species.

Key words: Carnivora; Intestinal microbiota; Environmental differences

肠道菌群是由种类繁多的微生物以相对稳定的关系存在于宿主机体的消化部位，这些微生物共同组建成为宿主体内庞大且复杂的共生生态系统 (Ley et al. 2006)。动物肠道菌群与其宿主之间的关系密切 (Ley et al. 2006, 2008, 孙玉姣 2018)，后者为前者提供适宜的生存环境，前者影响着后者的营养吸收、免疫应答、健康状态及行为表达等 (Ley et al. 2006, 刘威等 2006, 陈磊 2010)。

食性特点和生存环境是影响动物肠道菌群结构特征的重要因素 (陈秀 2017)。在食性特点方面，当前研究发现，食肉目物种肠道菌群的结构特征与奇蹄目、偶蹄目等食草动物肠道菌群的结构特征存在明显差异 (赵晗旭 2015, 陈秀 2017, 孙玉姣 2018, 王志永等 2018, 袁

耀华等 2020)，食肉目动物肠道菌群中的优势菌门主要为厚壁菌门 (Firmicutes)、梭杆菌门 (Fusobacteriota)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidota) 和放线菌门 (Actinobacteriota)，优势菌属主要包括梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、梭菌属 (*Clostridium*) 和柯林斯菌属 (*Collinsella*)；而食草动物肠道中的优势菌门主要为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 和螺旋体门 (Spirochaetes)，优势菌属主要包括链球菌属 (*Streptococcus*)、孢子杆菌属 (*Sporobacter*) 和罗氏菌属 (*Roseburia*)。田银平等 (2013) 发现，人工饲养环境下虎 (*Panthera tigris*) 的肠道菌群中，优势菌门为厚壁菌门、梭杆菌门和拟杆菌门，优势菌属为梭杆菌属、拟杆菌属

(*Bacteroides*) 和梭菌属, 该物种肠道中具有较高含量的与纤维消化相关的菌种, 其含量显著高于植食性的大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*); 贾小营等 (2017) 研究发现, 圈养环境下非洲狮 (*Panthera leo*) 的肠道菌群中, 优势菌门为厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、梭杆菌门, 优势菌属为柯林斯菌属、埃希氏志贺氏菌属 (*Escherichia-shigella*) 及毛螺菌属 (*Lachnospiraceae incertae sedis*)。屈瑞等 (2021) 研究发现, 繁殖基地内的马 (*Equus caballus*) 的肠道菌群优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门, 优势菌属为链球菌属、埃希氏志贺氏菌属和 *norank_f_F082* 属。李俊乐等 (2020) 研究发现, 野生阿拉善马鹿 (*Cervus elaphus alashanicus*) 的肠道菌群优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门, 优势菌属为孢子杆菌属、拟杆菌属和罗氏菌属。

在生存环境方面, 当前研究发现, 即使同一物种, 如果生存环境不同, 其肠道菌群也存在较大的差异 (李杨 2018, 董学兴等 2019, Gao et al. 2019, Shinohara et al. 2019, 黄翔 2021)。例如, 曹乐天等 (2020) 研究发现, 河南农业大学饲养的黑天鹅 (*Cygnus atratus*) 和郑州市动物园饲养的黑天鹅肠道菌群存在较大差异, 校园内黑天鹅肠道菌群的优势菌门为变形菌门、蓝藻门 (*Cyanobacteria*)、厚壁菌门和拟杆菌门, 优势菌属为氢噬胞菌属 (*Hydrogenophaga*)、假鱼腥藻属 (*Pseudanabaena*) 和普雷沃菌属 (*Prevotella*), 而郑州市动物园黑天鹅肠道菌群优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门和变形菌门, 优势菌属为拟杆菌属、梭杆菌属和梭菌属。王鑫等 (2021) 研究发现, 中国大熊猫保护研究中心核桃坪基地饲养的大熊猫的第一优势菌门为厚壁菌门, 而在上海野生动物园饲养的大熊猫肠道菌群的第一优势菌门为拟杆菌门。这充分说明即使是同一物种, 不同的生存环境对其肠道微生物的组成影响显著。

狼 (*Canis lupus*) 隶属于哺乳纲食肉目 (*Carnivora*) 犬科 (*Canidae*) 犬属 (蒋志刚等 2017), 为国家二级重点保护野生动物, 在世界自然保护联盟 IUCN 红色名录中的生存级别为无危级 (least concern, LC) (Boitani et al. 2018), 其野生种群主要分布在中国、美国、法国、加拿大、阿富汗、俄罗斯等国家和地区 (Boitani et al. 2018), 在我国主要分布在内蒙古、西藏、新疆、天津、山东等省份和自治区 (王应祥 2003, 蒋志刚等 2015, 2016)。根据世界自然保护联盟的最新信息, 全球野生狼的种群数量呈稳定趋势 (Boitani et al. 2018), 目前其主要的生存威胁包括人为狩猎、栖息地碎片化等 (Boitani et al. 2018)。

本研究基于非损伤取样和 16S rDNA 高通量测序技术, 针对来自南京市红山森林动物园和天津市动物园这两个不同地理纬度人工饲养环境下的狼肠道菌群开展研究, 并进行初步的功能预测分析, 为该物种饲养种群的异地保护和野生种群的综合管理提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 研究地点和对象

研究对象为来自天津市动物园和南京市红山森林动物园饲养的狼, 均为人工圈养环境。天津市动物园位于我国华北地区 (117°16' E, 38°88' N), 气候为温带季风气候, 四季分明, 冬季寒冷干燥。天津市动物园饲养狼的主要食谱包括牛肉、鸡架和兔肉, 不提供果蔬, 每日食谱种类一致。南京市红山森林动物园位于我国东部地区 (118°22' E, 31°14' N), 气候为北亚热带湿润气候, 四季分明, 雨水充沛, 雨热同季, 春秋季短, 冬夏季长, 冬夏温差显著。南京市红山森林动物园饲养狼的主要食谱包括牛肉、鸡肉、猪肉、兔肉等, 同时还配有苹果、梨、胡萝卜、西红柿、黄瓜等果蔬; 每日食谱种类不重复, 每周投喂猪肝一次。

1.2 样本采集

本研究基于非损伤取样技术, 采集狼的新

鲜粪样，样本装入无菌的 5 ml EP 管内并做好标记，放入冰盒中及时带回实验室后置于超低温冰箱 - 80 °C 下冷冻保存。本研究于 2021 年 5 月和 6 月采集了来自天津市动物园 10 只狼的共计 10 个粪便样本，编号为 CTJ1 ~ CTJ10，同时，采集来自南京市红山森林动物园 10 只狼的共计 9 个粪便样本，编号为 CNJ1 ~ CNJ9。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取 采用 TIANamp Stool DNA Kit 试剂盒（天根生化科技，北京）提取粪便样本中的总基因组 DNA。DNA 样本的浓度及质量由 Nano Drop 2000 分光光度计（Thermo Fisher Scientific，美国）测定。

1.3.2 PCR 扩增 针对样本细菌 16S rDNA 基因的 V3-V4 区域（Wu et al. 2016），选用上游引物 338F（5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'）和下游引物 806R（5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3'，引物中含简并碱基，H 为 A/C/T，V 为 A/C/G，W 为 A/T）进行扩增（Caporaso et al. 2012）。本研究选择的 PCR 反应体系为 20 μ l，包含 5 \times FastPfu Buffer 4.0 μ l，2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ l，正反向引物（1 μ mol/L）各 0.8 μ l，FastPfu 聚合酶 0.4 μ l，BSA 0.2 μ l，模板 DNA 10 ng，补充 ddH₂O 至 20 μ l；反应的条件为，95 °C 3 min；95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 45 s，一共扩增 27 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。纯化后的 PCR 扩增产物由上海美吉生物医药科技有限公司在 Illumina MiSeq 平台完成高通量测序。

1.4 数据分析

本研究应用 16S rDNA 高通量测序技术，以狼粪便中的微生物群落为研究对象，通过高通量测序平台完成序列测定，并利用生物信息学的分析软件研究微生物群落的多样性及其群落结构差异，测定物种丰度、分类及系统发育情况等。本研究采用 RDP classifier（version 2.11）贝叶斯算法对 97%相似水平的操作分类单元（operational taxonomic units, OTU）代表序列进行分类学分析（Edgar 2013），使用 Qiime

（version 1.9.1）生成各分类学水平丰度表，数据分析在上海美吉生物医药科技有限公司的美吉生信云分析平台（<https://cloud.majorbio.com>）上完成。

1.4.1 物种组成 该分析是对各组中每个样本在不同分类水平上进行数量统计，从而根据分析结果获得不同水平上群落结构的组成情况。本研究通过群落柱形图展现出在门水平与属水平上两组样本的肠道菌群组成情况。基于样本中群落丰度数据，选择 Student's *t* 检验检测两个动物园样本在门、属水平上存在显著差异的菌群， $P \leq 0.05$ 为差异显著。

利用 R 语言（version 3.3.1）绘制 Venn 图，用于统计两组样本中共有和独有的物种（如 OTU）数目，可以直观表现出两组样本的物种（如 OTU）组成相似性及重叠情况。利用 R 语言（version 3.3.1）vegan 包绘制热图，图上颜色的变化反映出不同样本在各分类水平上群落组成的相似性与差异性。

1.4.2 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性能够反映样本群落内的物种丰度和多样性（Wang et al. 2017，袁源等 2021）。本研究应用上海美吉生信云平台上的 Mothur（version 1.30.2）虚拟软件，采用 Student's *t* 检验和 Welch's *t* 检验来比较两组样本的 Alpha 多样性指数值， $P \leq 0.05$ 为差异显著。其中，Shannon 值越大，说明群落多样性越高，Coverage 指数反映本次测序的结果是否能够代表样本中所含微生物实际的情况。利用 R 语言（version 3.3.1）绘制稀释曲线，衡量所测样本数据量是否充足，以此反映样本中的物种多样性。

1.4.3 Beta 多样性分析 Beta 多样性能够反映不同样本组群落之间的物种差异性 or 相似性（Whittaker 1960，Jandhyala et al. 2015）。在本研究中，通过 Qiime（version 1.9.1）计算 Beta 多样性距离矩阵，该矩阵包含任意两个样本间的距离（Lozupone et al. 2005），应用上海美吉生信云平台上的 R 语言虚拟软件（version 3.3.1）开展主坐标分析（principal coordinates

analysis, PCoA)来完成 Beta 多样性分析。PCoA 是一种研究数据差异性的可视化方法,是通过观察样本点与点之间距离的远近,来判断样本中菌群的差异性大小,本研究选择 unweighted UniFrac 距离算法和 weighted UniFrac 距离算法。

1.4.4 功能预测分析 功能预测是对操作分类单元 (OTU) 丰度表进行标准化,对比直系同源群 (clusters of orthologous groups, COG) 以及京都基因和基因组百科全书数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG), 获得 OTU 对应的信息,并根据 OTU 丰度计算对应各功能类别的丰度。本研究通过上海美吉生信云平台上 PICRUSt (version 1.1.0) 软件对 OTU 丰度表标准化处理,进行 16S rDNA 序列的直系同源群 (COG) 功能预测;选择京都基因和基因组百科全书数据库 (KEGG),对测得的狼肠道菌群 OTU 数据进行功能预测分析。

2 结果

2.1 所有样本的微生物菌群组成

本研究通过对天津和南京各 10 只狼的共 19 份粪便样本处理后,进行 Illumina MiSeq 测序去噪,共获得优化序列 3 788 646 条,平均序列长度 407 bp,按照 97%的相似性进行 OTU 聚类后得到的物种注释结果,共统计得到 13 门 19 纲 52 目 99 科 237 属 355 种,其中,天津样本的粪便菌群共获得 12 门 16 纲 48 目 87 科 189 属 271 种,南京样本的粪便菌群共获得 11 门 17 纲 45 目 79 科 162 属 232 种。

2.2 物种组成

本研究分析时选用相似水平为 97%的 OTU 进行统计,通过分析发现,天津样本与南京样本肠道菌群中共有 OTU 数 361 种,天津样本独有 OTU 数 78 种,南京样本独有 OTU 数 38 种,南京样本的 OTU 数目少于天津样本的 OTU 数目 (图 1)。

在门水平上,天津样本的优势菌门为厚壁菌门 (58.16%)、放线菌门 (20.44%)、变形菌门 (18.78%),此外还包括梭杆菌门 (0.76%)、

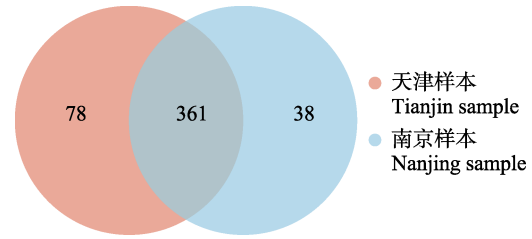


图 1 天津样本与南京样本在 OTU 水平上的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of Tianjin sample and Nanjing sample at OTU level

拟杆菌门 (1.39%)、蓝藻门 (0.30%) 等;南京样本的优势菌门主要包括厚壁菌门 (74.84%)、放线菌门 (18.72%)、梭杆菌门 (4.91%),此外还包括变形菌门 (0.72%)、拟杆菌门 (0.67%)、蓝藻门 (0.06%) 等 (图 2a)。因此,天津市动物园和南京市红山森林动物园两组样本的粪便中,占比最多的优势菌门均为厚壁菌门和放线菌门。

通过 Student's *t* 检验分析两组丰度前 13 的菌门,在天津样本中弯曲杆菌门 (Campilobacterota) ($P=0.0445$) 和脱硫菌门 (Desulfobacterota) ($P=0.0133$) 的相对丰度显著高于南京样本 (图 2b)。

在属水平上,天津样本中丰度最高的菌属是艰难梭菌属 (*Peptoclostridium*) (17.76%),其余依次是柯林斯菌属 (15.03%)、狭义梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto_1*) (11.91%)、埃希氏志贺氏菌属 (8.17%)、*norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014* 属 (5.89%)、布劳特氏菌属 (*Blautia*) (5.73%)、*Paeniclostridium* 属 (5.05%)、斯莱克氏菌属 (*Slackia*) (4.43%)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus_torques_group*) (3.19%) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) (4.98%) 等;南京样本中丰度最高的菌属是艰难梭菌属 (14.03%),其余依次是柯林斯菌属 (11.17%)、狭义梭菌属 (12.21%)、布劳特氏菌属 (10.34%)、消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*) (8.13%)、斯莱克氏菌

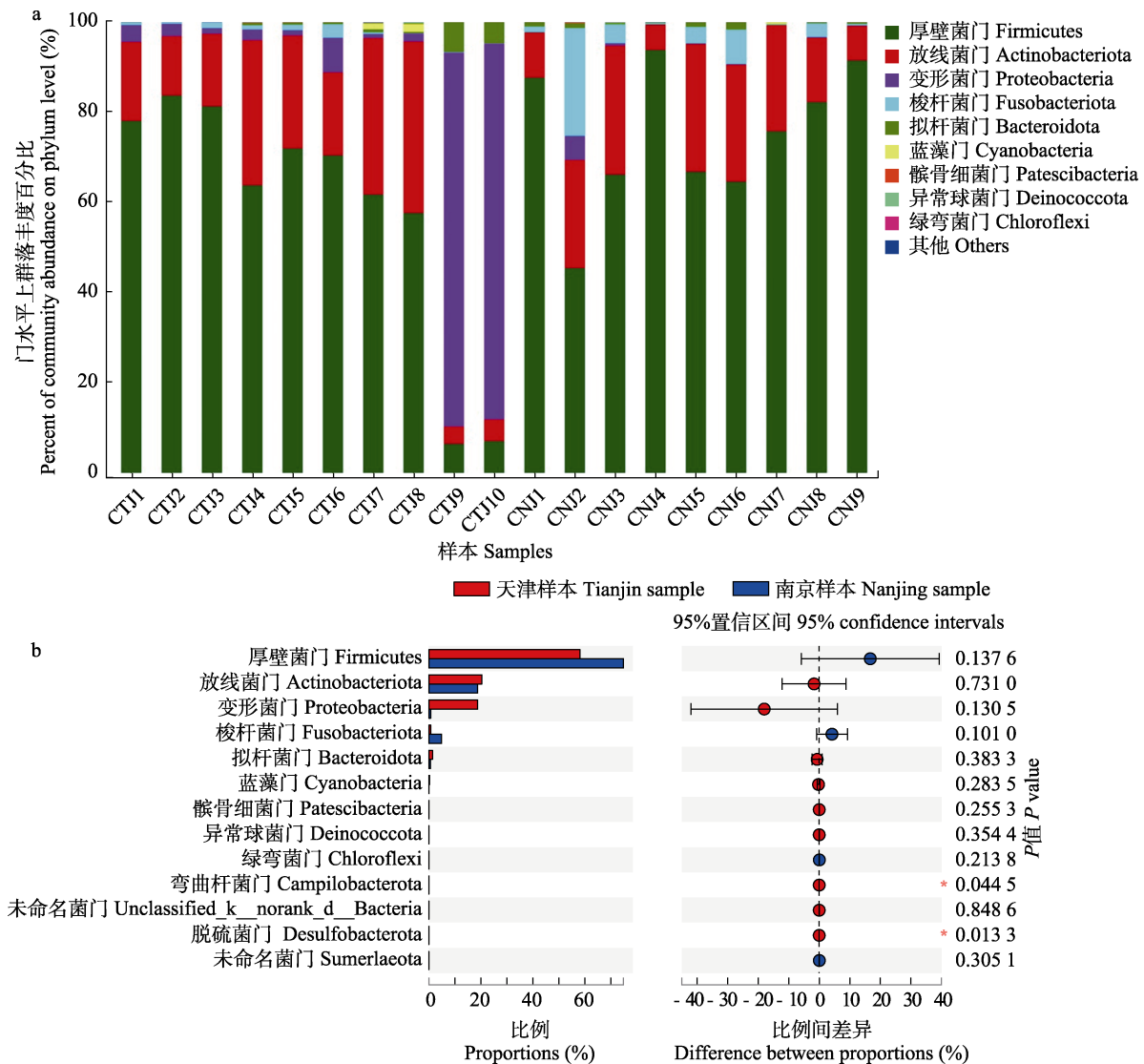


图 2 天津样本和南京样本在门水平上菌群相对丰度的比较

Fig. 2 Comparison of relative abundance of microflora of Tianjin sample and Nanjing sample at phylum level

a. 在门水平上的菌群组成，天津样本编号 CTJ1~CTJ10，南京样本编号 CNJ1~CNJ9；b. 基于 Student's *t* 检验的门水平上菌群差异比较，比例间差异代表天津样本与南京样本间平均相对丰度的差值，负数则代表南京样本与天津样本间的差值。* $P \leq 0.05$ 。

a. Microflora composition at phylum level. The Tianjin samples were numbered CTJ1-CTJ10, and Nanjing samples were numbered CNJ1-CNJ9; b. Comparison of microflora abundance at phylum level based on Student's *t* test, the difference between proportions represents the difference in average relative abundance between Tianjin and Nanjing groups, while the negative value represents the difference between two groups. * $P \leq 0.05$.

属 (6.96%)、*norank_f_norank_o_Clostridia_UCG-014* 属 (5.02%)、瘤胃球菌属 (4.95%)、梭杆菌属 (4.90%)、*Paeniclostridium* 属 (2.69%) 等 (图 3a)。

通过 Student's *t* 检验分析两组丰度排在

15 的菌属，南京样本中的消化链球菌属相对丰度显著高于天津样本，其余菌属均无显著组间差异 (图 3b)。

根据两组样本丰度的相似性进行聚类，通过颜色来体现不同的丰度，并将结果呈现在群

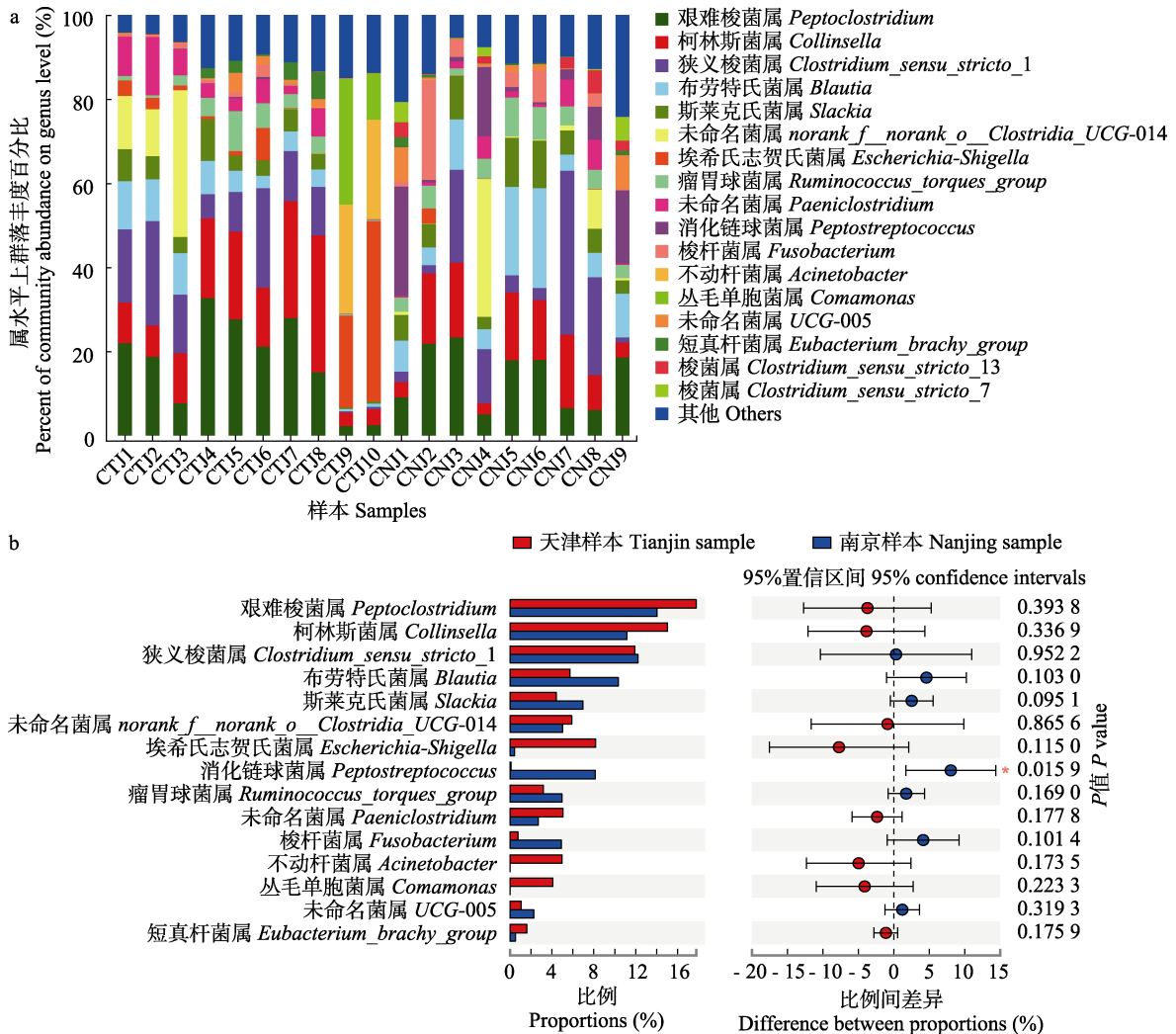


图 3 天津样本和南京样本在属水平上菌群相对丰度的比较

Fig. 3 Comparison of relative abundance of microflora of Tianjin sample and Nanjing sample at genus level

a. 在属水平上的菌群组成, 天津样本编号 CTJ1 ~ CTJ10, 南京样本编号 CNJ1 ~ CNJ9; b. 基于 Student's *t* 检验的属水平上菌群差异比较, 比例间差异代表天津样本与南京样本间平均相对丰度的差值, 负数则代表南京样本与天津样本间的差值。* $P \leq 0.05$

a. Microflora composition at genus level. The Tianjin samples were numbered CTJ1-CTJ10, and Nanjing samples were numbered CNJ1-CNJ9; b. Comparison of microflora abundance at genus level based on Student's *t* test, the difference between proportions represents the difference in average relative abundance between Tianjin and Nanjing groups, while the negative value represents the difference between two groups. * $P \leq 0.05$.

落 heatmap 图上。在属水平上, 天津样本和南京样本相互交错, 聚集在一起, 表明两组样本的菌群结构组成具有一定的相似性(图 4)。其中, 天津样本 CTJ9 和 CTJ10 形成单独的分支, 这两个样本的菌群组成与其余样本差异较大, 这与上述属水平的群落组成结果一致。除 CTJ9

和 CTJ10 外, 所有样本肠道菌群排列前 5 的菌属包括艰难梭菌属、柯林斯菌属、狭义梭菌属、布劳特氏菌属和斯莱克氏菌属。

2.3 Alpha 多样性分析

从 Sobs 指数稀释性曲线(图 5a)和 Shannon 指数稀释性曲线(图 5b)可以看出, 天津样本

与南京样本的曲线整体趋于平缓，这表明本研究的样本测序数据量足够大，能够很好地反映出样本中绝大多数微生物的物种信息，测序深

度基本覆盖了两组样本中所有的微生物物种。所有样本的 Coverage 指数均在 99.9%以上，表明样本中未被检测到的微生物物种的可能性较低。

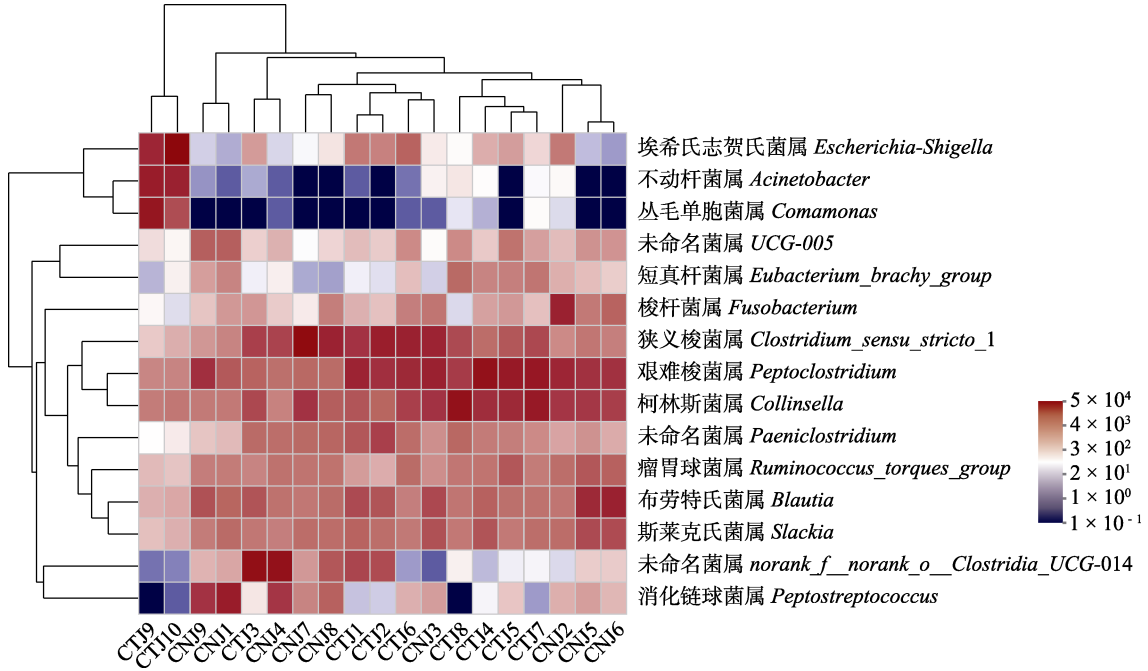


图 4 天津样本与南京样本菌群在属水平上的热图

Fig. 4 Heatmap of microflora in Tianjin sample and Nanjing sample at genus level

图中横坐标为样本名，纵坐标为物种名，色块颜色梯度表示不同物种的丰度变化，右侧为颜色梯度代表的数值。

The abscissa is the name of different sample and the ordinate is the species name. The color gradient of the color block represents the change of the abundance of different species, and the value represented by the color gradient is on the right.

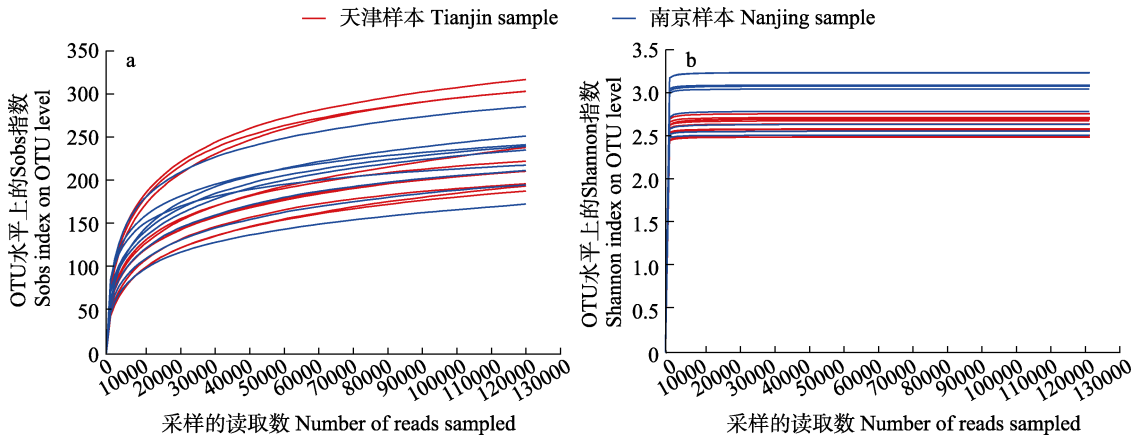


图 5 天津样本与南京样本的稀释曲线图

Fig. 5 Rarefaction curve of Tianjin sample and Nanjing sample

a. Sobs 指数稀释性曲线；b. Shannon 指数稀释性曲线。a. Sobs index rarefaction curve; b. Shannon index rarefaction curve.

经 Student's *t* 检验与 Welch's *t* 检验，南京样本 Shannon 指数(2.93)大于天津样本(2.63)，且两样本的肠道菌群多样性存在显著性差异。分析结果表明，南京样本的肠道菌群多样性显著性高于天津样本（图 6）。

2.4 Beta 多样性分析

采用 unweighted UniFrac 和 weighted

UniFrac 这两种距离算法统计分析两动物园样本的差异。天津样本分布较为分散，南京样本分布较为集中，两组样本个体间具有重叠分布的区域（图 7）。根据 unweighted UniFrac 计算结果，天津和南京狼肠道菌群结构存在显著差异 ($R = 0.1687, P = 0.0480$)；而根据 weighted UniFrac 的结果，两地狼肠道菌群

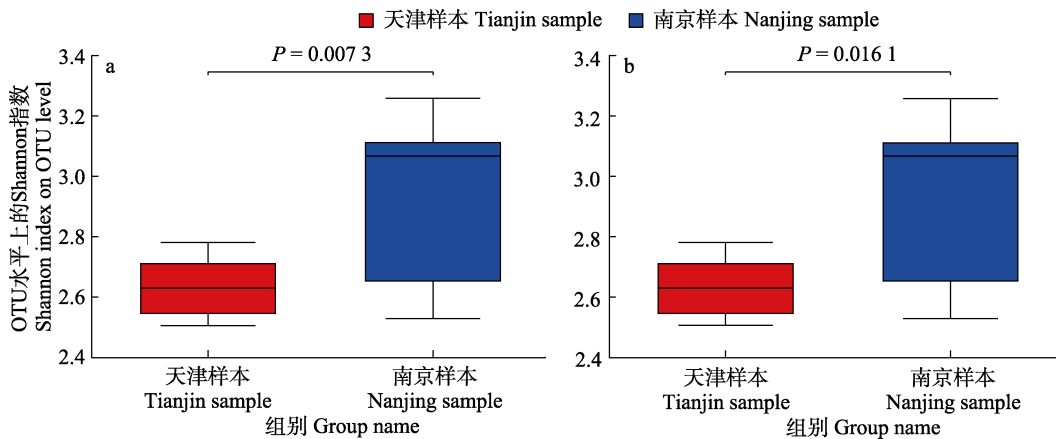


图 6 天津样本和南京样本 Alpha 多样性指数比较分析

Fig. 6 Comparative analysis of Alpha diversity index between Tianjin sample and Nanjing sample

a. Student's *t* 检验 Shannon 指数; b. Welch's *t* 检验 Shannon 指数。
a. Student's *t* test of Shannon index; b. Welch's *t* test of Shannon index.

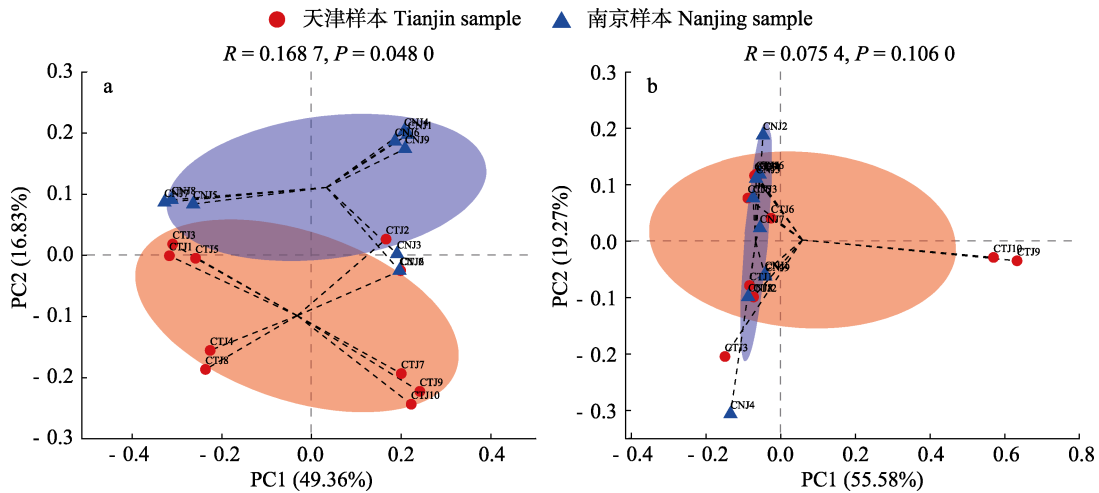


图 7 天津样本和南京样本的 Beta 多样性分析

Fig. 7 Beta diversity analysis of Tianjin sample and Nanjing sample

a. Unweighted UniFrac 距离算法; b. Weighted UniFrac 距离算法。a. Unweighted UniFrac analysis; b. Weighted UniFrac analysis.

结构无显著组间差异 ($R = 0.0754$, $P = 0.1060$)。

2.5 功能预测

根据测序结果进行功能预测分析。KEGG 分析表明, 天津样本与南京样本肠道菌群的主要功能基本一致, 这些肠道菌群在代谢途径、次级代谢产物的生物合成、不同环境中的微生物

代谢、氨基酸生物合成、碳代谢等方面具有重要的作用及影响(图 8a)。COG 功能分类(图 8b)展示了狼肠道菌群群落发挥不同功能的丰度大小。由此看出, 狼肠道中的菌群所发挥的主要功能集中在遗传信息的处理以及各种生命活动相关的代谢通路上, 包括转录、翻译、复制以及物质的转运和代谢等。

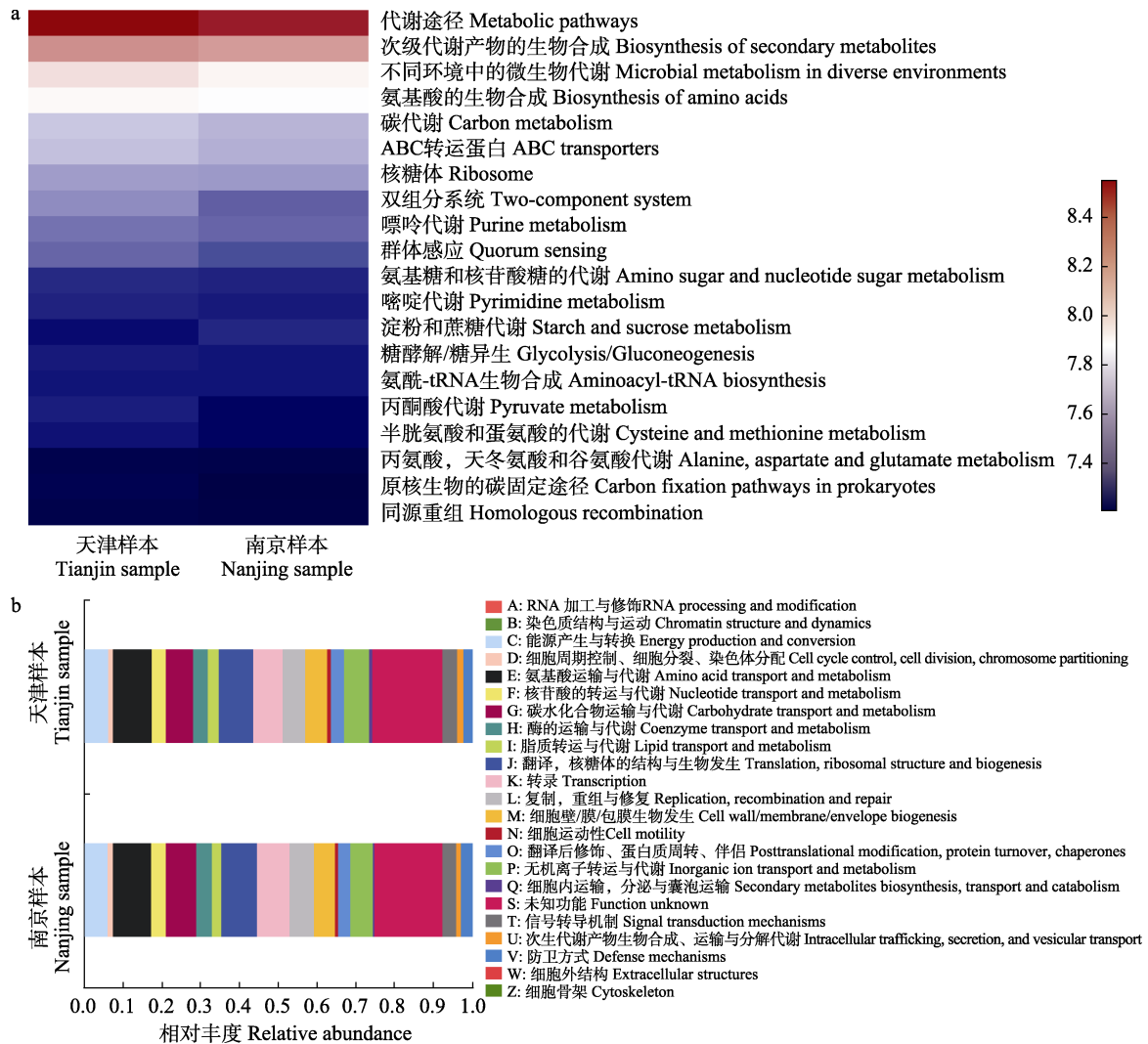


图 8 功能预测分析

Fig. 8 Functional prediction analysis

a. 三级功能水平下的天津样本和南京样本 KEGG 功能丰度热图, 色块颜色梯度表示不同功能的丰度变化, 左侧为颜色梯度代表的数值;
b. COG 功能分类柱形图。

a. Heatmap of function abundance at the KEGG Pathway Level 3 of Tianjin sample and Nanjing sample. The gradient of the color block represents the change of the abundance of different functions, and the value represented by the color gradient is on the right; b. Bar chart of COG functional classification.

3 讨论

本研究通过 16S rDNA 高通量测序技术, 分析来自天津市动物园和南京市红山森林动物园共计 19 份狼的粪便样本。Alpha 多样性分析发现, 南京市红山森林动物园狼的肠道菌群多样性显著高于天津市动物园的狼。考虑到南京市红山森林动物园狼摄入的食物来源较天津市动物园更为广泛, 除了摄入肉类外, 还经常会补充蔬菜等, 所以南京样本的微生物多样性更为丰富。

在门水平上, 天津样本与南京样本的肠道菌群均以厚壁菌门和放线菌门为优势菌群, 此结果与陈磊 (2010) 关于野生狼肠道菌群的结果一致。该发现与其他有关在人、哺乳动物肠道内厚壁菌门为主要优势菌群的结果一致, 说明狼的粪便微生物组成也符合这个结论 (Wang et al. 2005, 吴晓阳 2016, Shinohara et al. 2019, 祝招玲 2020, 付丽等 2022)。据报道, 厚壁菌门能够消化蛋白质、分解糖类并参与到机体的新陈代谢过程中, 哺乳动物常常摄入大量富含蛋白质的食物, 可能是导致该菌群具有优势的重要影响因素之一 (郑青 2017, 张佰莲等 2021)。放线菌门相对丰度仅次于厚壁菌门, 此结果与赵晗旭 (2015) 对动物园内非洲狮、豹 (*Panthera pardus*)、豺 (*Cuon alpinus*) 和非洲野犬 (*Lycan pictus*) 等食肉目动物肠道菌群的研究以及陈磊等 (2019) 对动物园养殖狞猫 (*Caracal caracal*) 的研究结论一致。在动物园环境中, 很多圈养动物的粪便微生物中放线菌门相对丰度位于第二位, 这与动物摄入食物富含高脂肪和蛋白质, 以及肠道自身的免疫有关 (陈磊等 2019)。此外, 在狼粪便中发现的变形菌门, 其相对丰度异常提高, 可能由于该个体患有肠道疾病或肠道具有慢性炎症, 变形菌门的增加是肠道生态失调的一种标志 (Shin et al. 2015, 孙艳发等 2020)。通过分析发现, 天津样本与南京样本肠道菌群在门水平上, 仅弯曲杆菌门的相对丰度存在显著性差异,

天津样本显著高于南京样本, 其余菌门无显著性差异。弯曲杆菌门细菌是广泛流行的人畜共患病的病原菌, 能够引起腹泻等肠胃疾病 (胡哲等 2005), 建议动物园在今后的饲养工作中重视这些狼的胃肠道相关疾病。

在属水平上, 天津样本与南京样本以艰难梭菌属、柯林斯菌属、狭义梭菌属为优势菌群, 此结果与陈磊等 (2019) 发现在狞猫中柯林斯菌属、艰难梭菌属、狭义梭菌属为优势菌群的研究结果一致, 但厚壁菌门中的艰难梭菌属相对丰度最高, 与陈磊等 (2019) 的研究中柯林斯菌属相对丰度最高不同, 造成该结果的原因除去物种因素外, 还可能是动物园内饲养的狼与狞猫饲养食物相近, 但狼的食物中蛋白质含量更高。在属水平上, 南京样本中的消化链球菌属相对丰度显著高于天津样本。消化链球菌属中包含众多的益生菌, 其在南京样本中的高丰度可能与南京市红山森林动物园中狼均衡的饮食结构相关。同时, 南京地区气候湿润和较低纬度的环境与天津地区气候干燥和较高纬度的环境差异也可能是造成该差异的主要因素之一, 这与曹乐天等 (2020) 及王鑫等 (2021) 在研究不同的饲养环境对肠道菌群多样性及相对丰度影响的结论是一致的。关于肠道微生物组成的深入研究和潜在益生菌的开发, 将为野生动物在圈养环境中的饮食提供参考。

综上, 天津市动物园和南京市红山森林动物园两种不同饲养环境下狼的肠道菌群在门水平上和属水平上均存在较大差异, 微生物菌落的多样性和结构组成可能受到饮食结构和生存环境的影响。该研究为今后深入分析狼肠道菌群的结构特征奠定了数据基础, 并为相关物种的综合保护提供科学参考。

参 考 文 献

- Boitani L, Phillips M, Jhala Y. 2018. *Canis lupus* (errata version published in 2020). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T3746A163508960. [EB/OL]. [2022-03-27]. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T3746A163508960.en>.

- Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 6(8): 1621–1624.
- Edgar R C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10): 996–998.
- Gao H, Chi X, Qin W, et al. 2019. Comparison of the gut microbiota composition between the wild and captive Tibetan Wild Ass (*Equus kiang*). *Journal of Applied Microbiology*, 126(6): 1869–1878.
- Jandhyala S M, Talukdar R, Subramanyam C, et al. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29): 8787–8803.
- Ley R E, Peterson D A, Gordon J I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4): 837–848.
- Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883): 1647–1651.
- Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 8228–8235.
- Shin N R, Whon T W, Bae J W. 2015. *Proteobacteria*: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33(9): 496–503.
- Shinohara A, Nohara M, Kondo Y, et al. 2019. Comparison of the gut microbiotas of laboratory and wild Asian House Shrews (*Suncus murinus*) based on cloned 16S rRNA sequences. *Experimental Animals*, 68(4): 531–539.
- Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, et al. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2): 219–231.
- Wang X D, Ban S D, Hu B D, et al. 2017. Bacterial diversity of Moutai-flavour Daqu based on high-throughput sequencing method. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1): 138–143.
- Whittaker R H. 1960. Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30(3): 279–338.
- 陈磊. 2010. 狼肠道菌群生态及犬科线粒体基因组比较和系统发育. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文.
- 陈磊, 刘咪, 沙未来, 等. 2019. 基于 16S rRNA 基因高通量测序研究豺猫肠道微生物多样性. *微生物学报*, 59(9): 1685–1694.
- 陈秀. 2017. 几种非人灵长类动物末端肠道细菌多样性及潜在价值初探. 沈阳: 东北大学博士学位论文.
- 曹乐天, 王璐阳, 张艺凡, 等. 2020. 不同生活环境天鵝肠道菌群的多样性分析. *野生动物学报*, 41(4): 989–999.
- 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 2019. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系. *上海海洋大学学报*, 28(4): 501–510.
- 付丽, 董岚, 聂实践, 等. 2022. 两种饲养模式对伴侣猫肠道菌群的影响. *畜牧与兽医*, 54(1): 63–69.
- 黄翔. 2021. 不同栖息环境下海南坡鹿肠道微生物组成差异分析. 海口: 海南大学硕士学位论文.
- 胡哲, 王振国, 刘金华, 等. 2005. 利用 PCR 技术检测鸡肉产品中的空肠弯曲杆菌. *吉林农业大学学报*, 27(6): 671–674.
- 贾小营. 2017. 不同季节圈养非洲狮肠道微生物多样性分析及功能学初步研究. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文.
- 蒋志刚, 江建平, 王跃招, 等. 2016. 中国脊椎动物红色名录. 生物多样性, 24(5): 500–551.
- 蒋志刚, 刘少英, 吴毅, 等. 2017. 中国哺乳动物多样性(第 2 版). 生物多样性, 25(8): 886–895.
- 蒋志刚, 马勇, 吴毅, 等. 2015. 中国哺乳动物多样性及地理分布. 北京: 科学出版社, 153–154.
- 李俊乐, 高惠, 滕丽微, 等. 2020. 阿拉善马鹿冬季肠道菌群的多样性. *野生动物学报*, 41(1): 15–21.
- 刘威, 姚文, 朱伟云. 2006. 人体与肠道微生物间的互惠共生关系. *世界华人消化杂志*, 14(11): 1081–1088.
- 李杨. 2018. 野生和圈养川金丝猴肠道菌群调查分析. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文.
- 屈瑞, 翟少华, 李娜, 等. 2021. 运输对马肠道菌群的影响. *基因组学与应用生物学*, 40(Z2): 2696–2703.
- 孙艳发, 张敏, 陈腾腾, 等. 2020. 福建梅花山圈养华南虎幼虎与成年虎肠道菌群结构的比较研究. *野生动物学报*, 41(4): 912–918.
- 孙玉姣. 2018. 基于高通量测序的野外和圈养马麝冬季肠道菌群比较研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文.
- 田银平. 2013. 人工饲养条件下虎肠道菌群结构研究. 哈尔滨: 东

- 北林业大学硕士学位论文.
- 吴晓阳. 2016. 基于 16S rDNA 的豺、狼、家犬肠道微生态研究. 曲阜: 曲阜师范大学硕士学位论文.
- 王鑫, 李才武, 晋蕾, 等. 2021. 不同地区圈养大熊猫肠道细菌菌群多样性及组成. *应用与环境生物学报*, 27(5): 1218–1225.
- 王应祥. 2003. 中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全. 北京: 中国林业出版社, 70–71.
- 王志永, 吴晓阳, 张永宾. 2018. 基于高通量测序技术的美洲獾肠道微生物多样性分析. *野生动物学报*, 39(4): 938–942.
- 袁源, 李琳, 黄海辰, 等. 2021. 基于 16S rDNA 扩增子测序分析灵芝连作覆土细菌群落的变化. *中国农学通报*, 37(24): 116–123.
- 袁耀华, 张佰莲, 田秀华. 2020. 圈养小熊猫粪便微生物组成及其影响因子初探. *动物学杂志*, 55(5): 614–623.
- 张佰莲, 马珺, 刘群秀. 2021. 笼养鸳鸯肠道微生物组成及其肠道疾病诱因的探讨. *动物学杂志*, 56(6): 908–917.
- 赵晗旭. 2015. 不同野生动物肠道微生物多样性分析及功能初步研究. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文.
- 郑青. 2017. 不同饲养模式对猪肠道菌群结构的影响研究. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文.
- 祝招玲. 2020. 贺兰山岩羊肠道微生物组季节性差异比较分析研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文.