

DOI: 10.20103/j.stxb.202402290418

娄熙源, 孙雪, 刘讯, 李剑峰, 张超, 吴安康, 钱长江, 冉景丞, 张雪, 孙悦. 不同栖息环境对黑叶猴肠道微生物群落结构特征及功能的影响. 生态学报, 2024, 44(24): 11472-11483.

Lou X Y, Sun X, Liu X, Li J F, Zhang C, Wu A K, Qian C J, Ran J C, Zhang X, Sun Y. Effects of different habitats on gut microbial structure and function of *Trachypithecus francoisi*. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(24): 11472-11483.

# 不同栖息环境对黑叶猴肠道微生物群落结构特征及功能的影响

娄熙源<sup>1</sup>, 孙雪<sup>1</sup>, 刘讯<sup>1</sup>, 李剑峰<sup>1,4</sup>, 张超<sup>5</sup>, 吴安康<sup>6</sup>, 钱长江<sup>1</sup>, 冉景丞<sup>2,3,7</sup>, 张雪<sup>1</sup>, 孙悦<sup>1,2,3,4,\*</sup>

1 贵州师范学院生物科学学院, 贵阳 550018

2 贵州梵净山森林生态系统观测研究站, 江口 554400

3 贵州草海湿地生态系统观测研究站, 威宁 553199

4 贵州省高等学校生物资源开发利用重点实验室, 贵阳 550018

5 贵州森林野生动物园, 修文 550200

6 贵州省麻阳河国家级自然保护区, 铜仁 565203

7 贵州省林业科学研究院, 贵阳 550005

**摘要:** 黑叶猴 (*Trachypithecus francoisi*) 属于我国一级重点保护野生动物, 是世界上珍贵稀有灵长类动物之一。肠道微生物是动物体内最重要的“微生物器官”, 参与机体营养吸收、代谢调节及免疫功能, 在维持生物体健康和适应性进化等方面均发挥至关重要的作用。探究不同栖息环境下黑叶猴肠道微生物群落结构特征及其在宿主能量代谢、营养平衡、食物消化等功能作用, 对其种群保育具有重要的意义。但鲜少有研究聚焦于不同栖息环境特别是在圈养条件下黑叶猴由于食物的变化, 从而引起的肠道微生物结构和功能改变及所产生的影响, 这些目前尚不清楚。利用宏基因组测序技术比较分析了分别来自野外环境 (5 只) 和圈养环境 (4 只) 下的黑叶猴个体肠道微生物群落物种组成结构及功能差异。结果表明: 在物种组成上, 黑叶猴肠道内核心微生物群主要为厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 野生黑叶猴独有的微生物群落数量大于圈养组, 不同栖息环境下的黑叶猴肠道微生物群落物种组成结构具有一定的相似性及差异性。Alpha 多样性指数显示野外环境与圈养环境中的黑叶猴肠道微生物群落多样性和均匀度无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。利用独立性检验发现, 野外环境与圈养环境中的黑叶猴肠道微生物中出现极显著差异的为甲烷菌门 (Methanobacteriota) ( $P < 0.01$ )。在功能作用上, 黑叶猴肠道微生物群落大部分基因与新陈代谢及基因与遗传信息处理相关, 且野外环境与圈养环境黑叶猴中在氨基酰基 TRNA 生物合成、嘧啶代谢、丙酸代谢等相关途径中存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、布劳特氏菌属 (*Blautia*) 通过调节 FOX2 基因的表达提升了黑叶猴在圈养环境下生成乙酰辅酶 A 的能力。研究揭示了贵州省野外环境和圈养环境对黑叶猴肠道微生物群落特征及功能的影响, 有助于科学评估野外黑叶猴种群生理健康状况, 并为这一珍稀物种的野外种群保护及圈养种群繁育提供肠道微生物学方面的理论依据。

**关键词:** 黑叶猴; 肠道微生物; 群落特征; 饮食差异性; 宏基因组测序技术

## Effects of different habitats on gut microbial structure and function of *Trachypithecus francoisi*

LOU Xiyuan<sup>1</sup>, SUN Xue<sup>1</sup>, LIU Xun<sup>1</sup>, LI Jianfeng<sup>1,4</sup>, ZHANG Chao<sup>5</sup>, WU Ankang<sup>6</sup>, QIAN Changjiang<sup>1</sup>, RAN Jingcheng<sup>2,3,7</sup>, ZHANG Xue<sup>1</sup>, SUN Yue<sup>1,2,3,4,\*</sup>

1 School of Biological Sciences, Guizhou Education University, Guiyang 550018, China

**基金项目:** 贵州省林业局科研项目 (黔林科合 [2023] 11); 贵州省教育厅高等学校科学研究青年项目 (黔教技 [2022] 254 号); 贵州师范学院大学生自主科研项目 (2022DXS110); 贵州省科技支撑计划项目 ([20123] Y223)

**收稿日期:** 2024-02-29; **网络出版日期:** 2024-09-06

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: sy1028sy@163.com

2 Guizhou Fanjingshan Observation and Research Station for Forest Ecosystem, Jiangkou 554400, China

3 Guizhou Caohai Observation and Research Station for Wet Ecosystem, Weining 553199, China

4 Key Laboratory of Biological Resources Exploitation and Utilization in Colleges and Universities of Guizhou Province, Guiyang 550018, China

5 Guizhou Forest Wildlife Park, Xiuwen 550200, China

6 Mayanghe National Nature Reserve Administration, Tongren 565203, China

7 Guizhou Academy of Forestry Sciences, Guiyang 550005, China

**Abstract:** *Trachypithecus francoisi* belongs to the wild animals under the first level of protection in China and is one of the most precious and rare primates in the world. Intestinal microorganisms are the most important "microbial organs" in animal body, which participate in nutrient absorption, metabolic regulation and immune function, and play a significant role in maintaining organism health and adaptive evolution. Studying the gut microbial community structure of *T. francoisi* in different habitats and their functions on host energy metabolism, nutritional balance and food digestion is significant for the conservation of endangered species. However, few studies have focused on the changes of intestinal microbial structure and function in different habitats, especially in captivity, resulting in unclear that due to changes in the diet of *T. francoisi*, and the effects. Metagenomic sequencing technology was used to compare and analyze the gut microbial community composition and function differences of wild (five individuals) and captive (four individuals) black langur monkeys in this study. The results showed that in terms of species composition, the gut core microbiota of *T. francoisi* was mainly Firmicutes and Bacteroidetes. The number of unique microbial communities of wild black langur monkeys was larger than that of captive group, and the species composition structure of intestinal microflora of langurs in different habitats had certain similarities and differences. The Alpha diversity index showed that there was no significant difference in gut microbial diversity and uniformity between wild and captive *T. francoisi* ( $P>0.05$ ). By independence test, it was found that Methanobacteriota had the most significant difference between the intestinal microbes of *T. francoisi* in wild environment and captive environment ( $P<0.01$ ). Functionally, most of the genes in the intestinal microbial community of *T. francoisi* was related to metabolism and genetic information, and there were significant differences between wild and captive *T. francoisi* in amino acyl TRNA biosynthesis, pyrimidine metabolism, propionic acid metabolism pathways ( $P<0.05$ ). *Ruminococcus* and *Blautia* increased the ability of *T. francoisi* to produce Acetyl-CoA in captivity by regulating FOX2 gene expression. This study initially revealed the effects of the wild environment and captive environment on the characteristics and functions of the gut microbial community of *T. francoisi* in Guizhou Province, which is helpful for scientific assessment of the physiological health status of the wild population of black langur monkeys. This study also provides theoretical basis for the gut microbiology of this rare species in the wild population protection and captive population breeding.

**Key Words:** *Trachypithecus francoisi*; gut microbiota; community characteristics; dietary difference; metagenomic sequencing technology

肠道微生物是动物机体内最重要的“微生物器官”,参与机体营养吸收、代谢调节及免疫功能,在维持生物体健康和适应性进化等方面均发挥至关重要的作用<sup>[1-3]</sup>。动物的肠道菌群结构的形成受到食物构成<sup>[4-5]</sup>、栖息环境、季节变化<sup>[6-7]</sup>、种群遗传<sup>[8]</sup>、年龄、性别等因素影响。高多样性的微生物群能促进肠道微生物群生态系统的稳定性,并提高宿主的饮食发酵率<sup>[9]</sup>。多样化的肠道微生物可以促进宿主的整体健康和营养代谢功能,调节免疫功能和繁殖行为等<sup>[10-11]</sup>。研究表明,在人工辅助投食的条件下,滇金丝猴的肠道菌群丰富度、均匀度及谱系多样性均高于野外环境<sup>[12]</sup>。圈养环境下的白臀叶猴肠道微生物中的普氏菌属(*Prevotella*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)相对丰度亦高于野外种群<sup>[13]</sup>。饮食不仅导致动物肠道微生物结构组成变化,同时也会影响动物肠道微生物代谢物及肠道中的化学反应,如短链脂肪酸主要是通过厌氧微生物发酵不可消化的碳水化合物(如纤维素)而产生的,大量摄入特定宏量营养素(如纤维)的减少,或持续较长时间的减少,可能导致关键微生物类群的丧失<sup>[14-16]</sup>。然而,不同栖息环境特别是在圈养条件下黑叶猴由于食物的变化所引起的肠道微生物结构和功能改变及所产生的影响等目前尚不清楚。

黑叶猴(*Trachypithecus francoisi*),属于灵长目(Primates),猴科(Cercopithecidae),疣猴亚科(Colobinae),乌叶猴属(*Trachypithecus*),主要分布于越南北部和中国的广西、贵州、重庆等地的山地岩溶地区,属于我国一

级重点保护野生动物,是世界上珍贵稀有灵长类动物之一<sup>[17]</sup>。为了探究野外环境和圈养环境下黑叶猴肠道微生物群落特征的差异及其功能变化,本研究在贵州麻阳河国家级自然保护区和贵州森林野生动物园,采用宏基因组测序手段探究野生和圈养黑叶猴的肠道微生物群组成结构、微生物群落多样性及功能差异,从而为野外黑叶猴的种群保护及圈养种群的繁育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象来源及粪便样品采集

野生黑叶猴粪便样品来自贵州麻阳河国家级自然保护区,该保护区位于贵州省沿河土家族自治县与务川仡佬族苗族自治县交界处(108°3'58"—108°19'45"E,28°37'30"—28°54'20"E),总面积311.13 km<sup>2</sup><sup>[18]</sup>。2022年5—7月,在120 d采样期内,共设置了19条野外调查样带,收集来自不同的社会群体的野生黑叶猴粪便样品,并将收集到的新鲜粪样保存于-80℃,待实验室分析。本次研究共采集追踪到的5只野生黑叶猴(W1, W2, W3, W4, W5)个体粪便。

圈养黑叶猴粪便样品来自于贵州森林野生动物园。该野生动物园位于贵州省修文县境内。粪样采集过程中,黑叶猴晚上被关在不同的笼子里,每天早上排便后立即收集粪便并保存在-80℃,待实验室分析。本次研究共收集了4只圈养黑叶猴(C1, C2, C3, C4)个体的粪便。

### 1.2 肠道微生物宏基因组测序

使用OMEGA Mag Bind 土壤DNA试剂盒(M5635-02)(OMEGA Bio-Tek, Norcross, GA, USA)提取粪便中总微生物基因组DNA样本,使用Qubit™ 4 荧光计(Invitrogen, USA)和1%琼脂糖凝胶电泳测量提取的DNA的数量和质量。合格DNA样品用Covaris 超声波破碎仪随机打断成长度约为350 bp的片段,使用NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina(NEB, USA)构建文库。使用Agilent 2100对文库的insert size进行检测,并使用实时PCR对文库浓度进行定量分析。利用Illumina-Miseq PE300高通量测序平台对DNA文库进行测序。使用Kneaddata软件对Raw测序数据进行预处理。去除原始数据中接头序列和低质量的序列,去除最终长度小于50bp的序列,过滤来自宿主的序列,获取用于后续分析的有效序列。最后通过FastQC检测质量控制的合理性和效果。物种注释使用Kraken2和自建的微生物核酸数据库比对来计算样本中所含有物种的序列数,再用Bracken来对样本中物种的实际相对丰度进行预测。基于reads功能注释使用HUMAN2软件,将质控和去宿主之后的序列与蛋白质数据库(UniRef90)进行比对(基于DIAMOND),根据UniRef90 ID和各个数据库的对应关系。得到各个功能数据库的注释信息和相对丰度表。

### 1.3 数据分析

获取各样本在门、属、物种分类水平上的组成和丰度分布表,对各样本中的优势物种在不同分类水平下进行统计。使用韦恩图来进行群落分析表征野生及圈养黑叶猴独有及共有的物种的个数。使用Alpha多样性表征野生及圈养黑叶猴肠道微生物群多样性指数。使用了metagenomeSeq方法对样本组的门、属、种水平分类单元进行两两比较获得具有显著丰度差异的物种。使用热图(Heatmap)聚类并依据聚类结果对野生及圈养黑叶猴肠道微生物群差异物种分别排序。通过随机森林(Random Forests)分析挑取丰度分布在不同组间存在显著差异的功能。使用LEfSe(LDA Effect Size)分析对黑叶猴基因功能进行差异分析,同时使用LDA值分布柱状图找出组间之间差异物种,即标志物种(biomarker)。使用相关性分析探究肠道微生物与差异功能基因之间的互作关系,并运用交互桑基图可视化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑叶猴肠道微生物物种组成

黑叶猴宏基因组测序共获得206845793条原始reads。质量控制并剔除宿主序列后经过基因预测和去冗余,共获得6664054个微生物群非冗余基因数据。在门水平上(图1),野生黑叶猴肠道微生物中厚壁菌门A

(Firmicutes A, (62.74±11.87)%) 和拟杆菌门 (Bacteroidota, (24.03±16.24)%) 为肠道优势菌门,其次为放线菌门 (Actinobacteriota, (4.51±8.06)%)、厚壁菌门 (Firmicutes, (3.25±3.96)%) 和变形菌门 (Proteobacteriota, (2.51±3.23)%) ;圈养黑叶猴肠道微生物中厚壁菌门 A (Firmicutes A, (63.58±19.39)%) 和拟杆菌门 (Bacteroidota, (23.13±17.78)%) 为优势菌门,其次为厚壁菌门 (Firmicutes, (6.40±3.75)%)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota, (2.08±3.73)%) 和螺旋体门 (Spirochaetota, (1.19±0.56)%)。在属水平上(图 1),野生黑

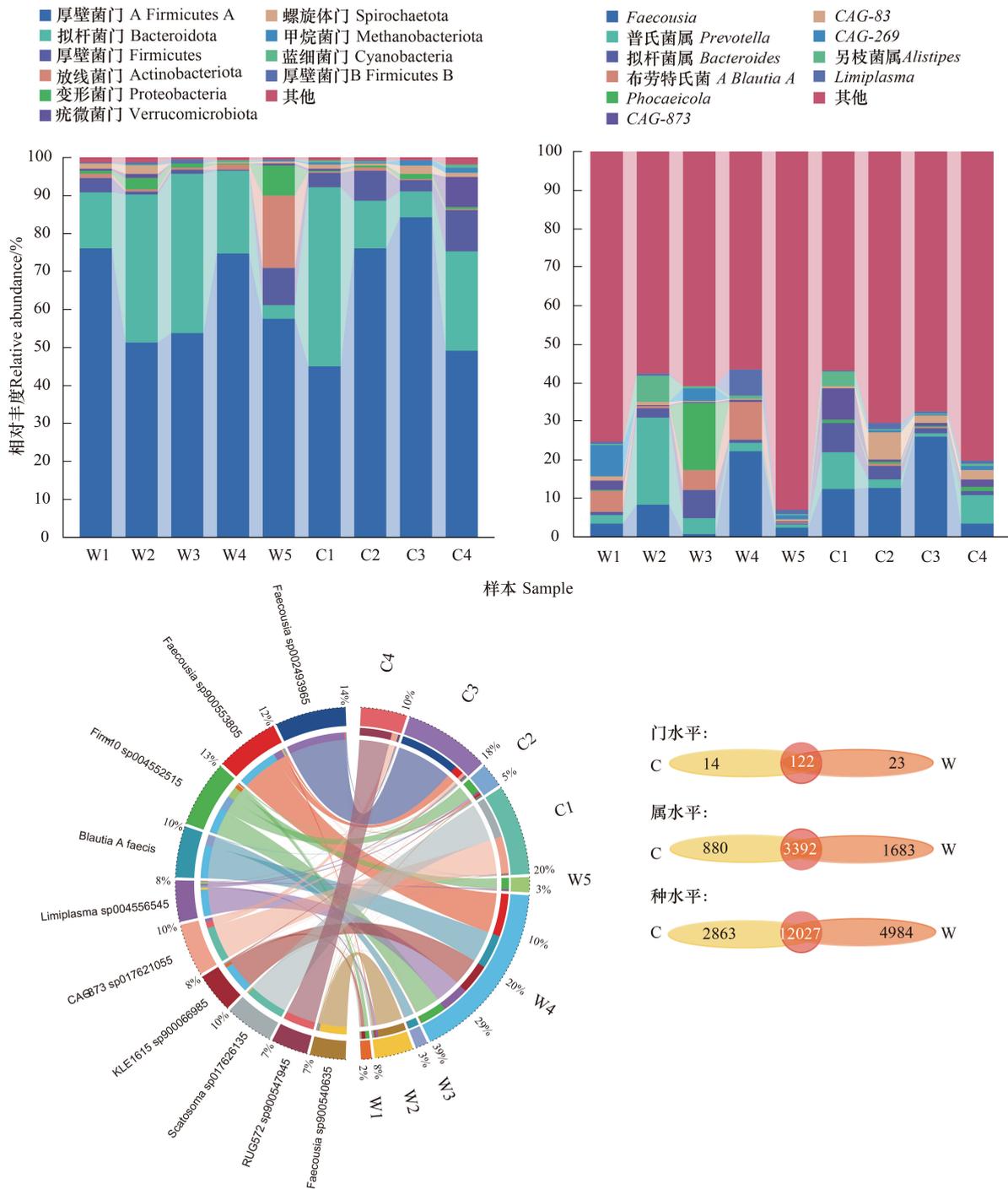


图 1 黑叶猴肠道微生物群不同分类水平的物种组成

Fig.1 Taxonomic composition of the gut microbiota of *Trachypithecus Francoisi* at different taxonomic levels

W1—W5 分别代表 5 只野生个体;C1—C4 分别代表 4 只圈养个体;W:野生组;C:圈养组

叶猴肠道微生物平均相对丰度前 5 的分别为 *Faecousia*、普氏菌属 (*Prevotella*)、布劳特氏菌属 A (*Blautia A*) 和 *Phocaeicola*; 圈养黑叶猴肠道微生物平均相对丰度前 5 的分别为 *Faecousia*、普氏菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、CAG-83 和 CAG-873。在种水平上(图 1), 野生黑叶猴肠道微生物平均相对丰度前 5 的分别是 *Blautia A faecis*、*Faecousia sp900553805*、*Firm-10 sp004552515*、*KLE1615 sp900066985* 和 *Limiplasma sp004556545*; 圈养黑叶猴肠道微生物平均相对丰度前 5 的分别为 *Faecousia sp002493965*、CAG-873 *sp017621055*、*Scatosoma sp017626135*、*RUG572 sp900547945* 和 *Faecousia sp900544945*。通过绘制韦恩图(图 1) 分析野生组和圈养组间独有和共有物种的组成情况。研究结果表明野生黑叶猴独有的微生物群落数量大于圈养组, 野生和圈养黑叶猴肠道微生物群落组成结构具有一定的相似性及差异性。

## 2.2 黑叶猴肠道微生物物种多样性差异分析

选取 Chao1、Goods-coverage、Simpson、Pielou-e、Shannon 和观测物种数 6 个指数来分析野生和圈养黑叶猴肠道微生物的多样性和均匀度(图 2)。每组样品的 Goods-coverage 指数均达 0.99 以上, 表明检测结果可靠。对比野生和圈养黑叶猴肠道微生物群的多样性指数发现, 黑叶猴肠道菌群物种丰富度指数(Chao1)野生组大于圈养组( $P=0.81$ ); 微生物覆盖指数(Goods-coverage)野生组大于圈养组( $P=0.46$ ); Simpson 指数圈养组大于野生组, ( $P=0.46$ ); 物种均匀度指数(Pielou-e)圈养组大于野生组( $P=0.33$ ); 物种多样性指数(Shannon)圈养组大于野生组( $P=0.33$ )。野生黑叶猴肠道微生物 Chao1 和 Goods-coverage 均高于圈养黑叶猴, 以上结果说明野生黑叶猴肠道微生物群落丰富度高于圈养黑叶猴, Pielou 指数表明圈养黑叶猴肠道微生物均匀度高于

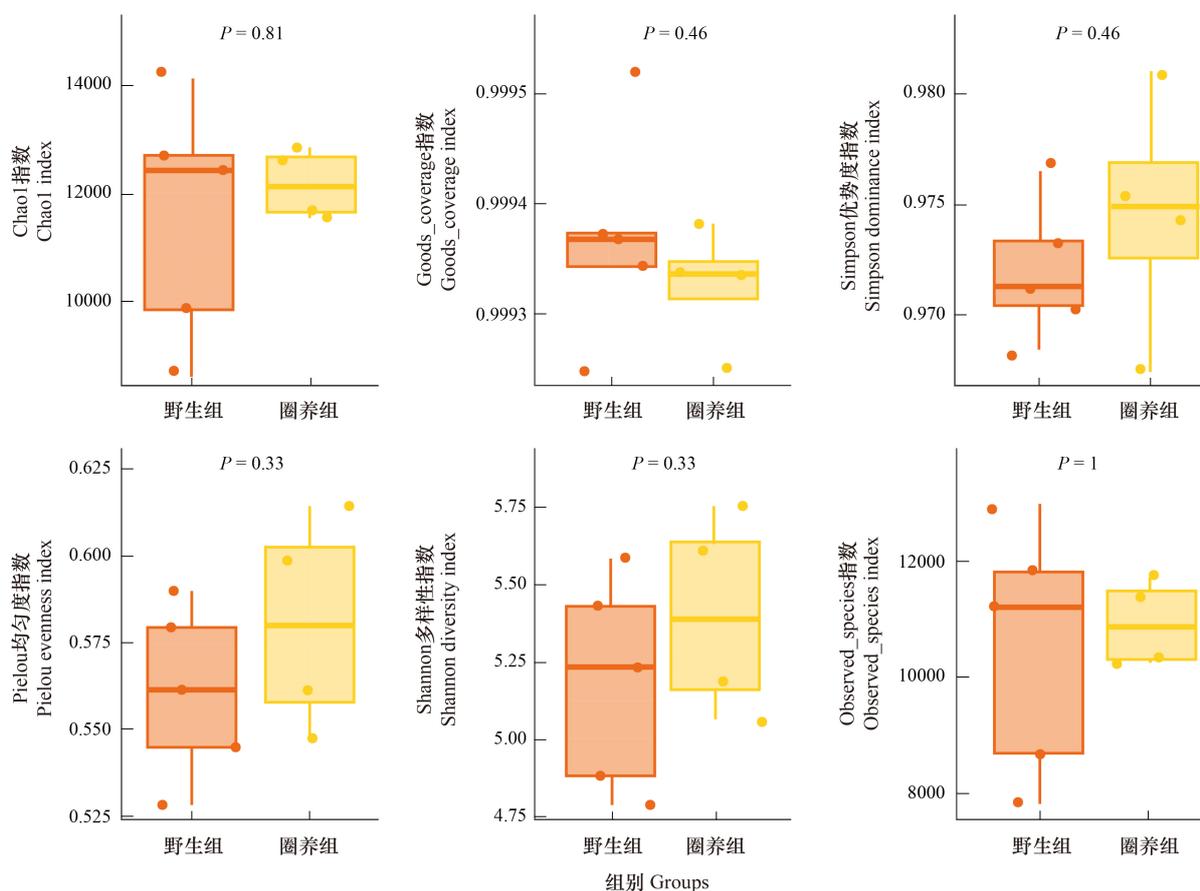


图 2 黑叶猴野生组和圈养组间肠道微生物 Alpha 多样性指数箱线图

Fig.2 Boxplot of Alpha diversity index of gut microbiota between wild and captive groups of *Trachypithecus francoisi*

箱的上下端线: 上下四分位数 (IQR), 最上端为 Q3 (位于 75% 的数据点), 最下端为 Q1 (位于 25% 的数据点); 中位线: 中位数; 上下边缘: 最大值 ( $Q3+1.5IQR$ ) 和最小值 ( $Q1-1.5IQR$ ); 上下边缘的外部的点: 异常值, 超出正常范围的数据点

野生黑叶猴。Alpha 多样性指数显示野生及圈养黑叶猴肠道微生物群落多样性和均匀度没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 黑叶猴肠道微生物聚类差异比较分析

通过 PCoA 分析(图 3)发现野生和圈养黑叶猴肠道微生物组间形成分离(主成分的贡献值分别为 20.6% 和 18.7%)。利用独立性检验可知,在门水平上(图 3),圈养与野生黑叶猴丰度排名前十的肠道微生物群落组成中甲烷菌门(Methanobacteriota)在野生和圈养组间具有极显著差异( $P < 0.01$ )。在属水平上(图 3),圈养与野生黑叶猴丰度排名前十的肠道微生物群落组成中 CAG-83 具有显著差异( $P < 0.05$ )。在物种水平上,圈养与

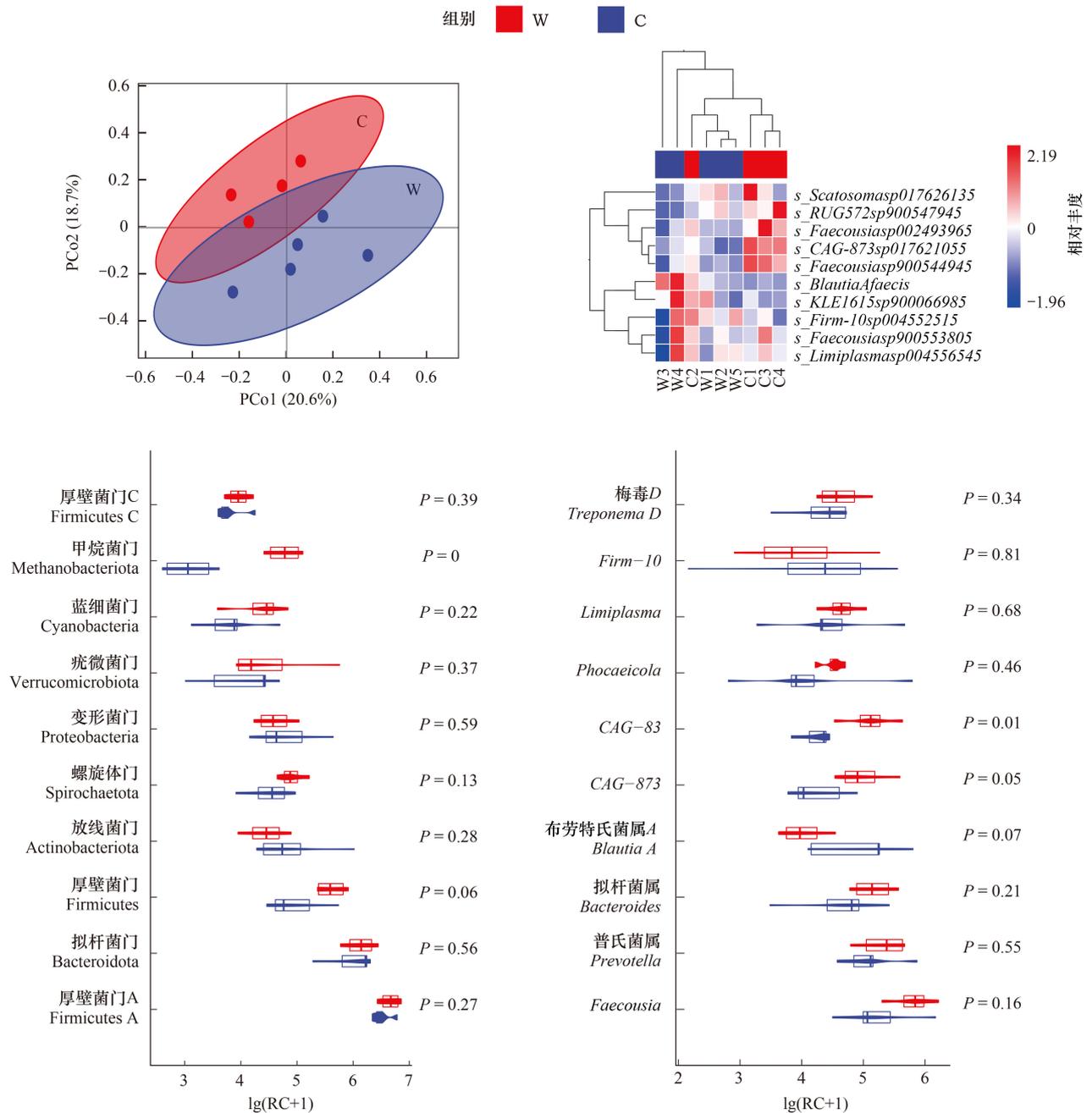


图 3 野生及圈养黑叶猴肠道微生物物种及组间差异

Fig.3 Difference analysis of gut microbiota in species and group differences between wild and captive groups of *Trachypithecus francoisi*

$\lg(RC+1)$ : 丰度单位转换对数值

野生黑叶猴丰度排名前十的肠道微生物群落组成中 *CAG-873 sp017621055* 和 *Faecousia sp900544945* 在两组中均有极显著统计学差异 ( $P < 0.01$ ); *Faecousia sp002493965* 在两组中均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。黑叶猴肠道微生物物种差异热图显示了在种水平上差异最显著的排名前 10 的物种及聚类(图 3)。

### 2.4 黑叶猴肠道微生物群功能组成分析

KEGG 功能注释分析显示黑叶猴肠道微生物功能基因富集到的一级代谢途径划分为 6 类,包括新陈代谢 (Metabolism, 72%)、遗传信息处理 (Genetic Information, 14%)、细胞过程 (Cellular Processes, 6%)、人类疾病 (Human Diseases, 4%)、环境信息处理 (Environmental Information, 3%)、生物体系统 (Organismal System, 1%)。黑叶猴肠道微生物注释到的大部分基因与新陈代谢相关,其次是与基因与遗传信息处理和基因与细胞过程相

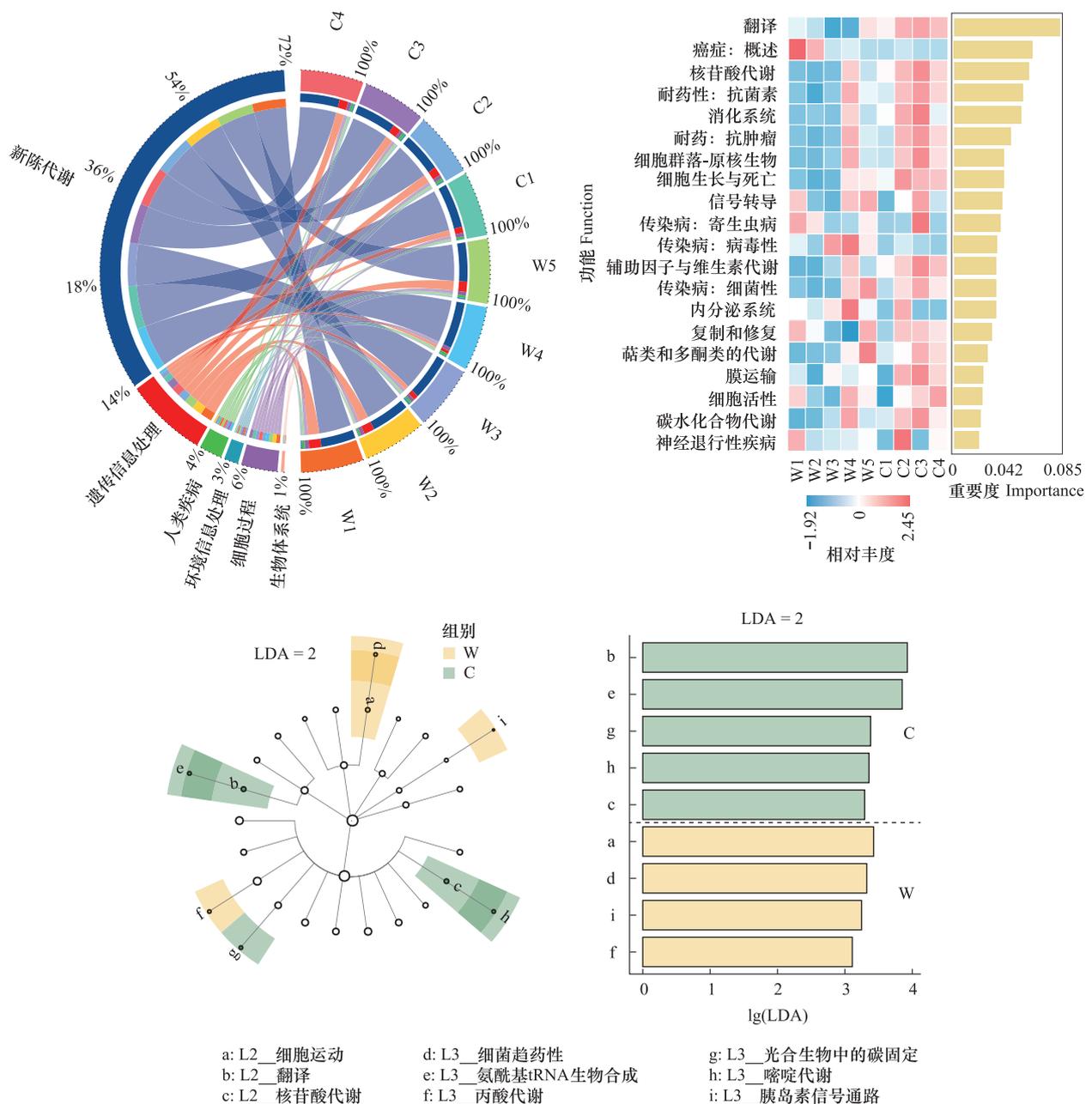


图 4 黑叶猴肠道微生物功能及组间差异

Fig. 4 Gut microbiota function and inter-group differences in *Trachypithecus francoisi*

LDA: 线性判别分析; lg(LDA): LDA 分析对数得分值; L2: 功能水平 2; L3: 功能水平 3

关(图4)。随机森林分析显示野生与圈养黑叶猴排名前5的存在显著差异的KEGG二级代谢途径为翻译(Translation)、癌症(Cancer)、核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)、耐药性(Drug resistance)与消化系统(Digestive system)(图4)。基于LEfSe(LDA effect size)分析发现野生与圈养黑叶猴组间功能基因差异显著(图4),从LDA值分布柱状图来看,圈养黑叶猴的标志代谢通路为翻译(Translation)、氨基酰基TRNA生物合成(Aminoacyl TRNA biosynthesis)、光合生物中的碳固定(Carbon fixation in photosynthetic organisms)、嘧啶代谢(Pyrimidine metabolism)和核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)。野生黑叶猴在细胞运动(Cell motility)、细菌趋化性(Bacterial chemotaxis)、胰岛素信号通路(Insulin signaling pathway)、丙酸代谢(Propanoate metabolism)代谢途径中显著富集,为野生黑叶猴的标志代谢通路(图4)。有多条代谢通路与黑叶猴能量代谢相关,其中野生黑叶猴在短链脂肪酸丙酸合成的途径中功能基因显著富集,表明由于圈养黑叶猴食物组成的改变影响了其肠道微生物功能的变化。

### 2.5 黑叶猴肠道微生物功能基因的差异分析

野生与圈养黑叶猴肠道微生物功能中与能量代谢相关的丙酸代谢途径(Path:map00640)属于新陈代谢中碳水化合物代谢途径。包含丙二酸半醛途径(M00013),由丙酰基辅酶A生成乙酰基辅酶A(Acetyl-CoA);以及丙酰基辅酶A代谢(M00741),由丙酰基辅酶A生成琥珀酰辅酶A(Succinyl-CoA)(图5)。丙酸代谢途径属于短链脂肪酸代谢途径,与相关的代谢通路如糖酵解糖异生、柠檬酸循环(TCA循环)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、泛酸和辅酶A生物合成等密切相关行使重要生物学功能。对丙酸代谢途径的KO基因进行模块筛选后发现相关功能基因在野生和圈养黑叶猴中显著富集。在M00013模块中K00248(ACADS)、K00232(ACOX1)、K14729(FOX2)、K00140(mmsA)基因显著富集,其中FOX2基因在野生及圈养的黑叶猴中差异显著( $P < 0.05$ ),在圈养黑叶猴中FOX2基因显著上调。在M00741模块中K01965(PCCA)、K01966(PCCB)、K11263(bccA)、K18472(accD6)、K19312(pccB)、K01964、K15036、K15037、K05606(MCEE)、K01847(MUT)、K01848(mcmA1)、K01849(mcmA2)基因显著富集。其中mcmA1、pccB基因在野生及圈养的黑叶猴中差异显著( $P < 0.05$ )(图5),mcmA1基因在圈养黑叶猴中显著上调,pccB基因在野生黑叶猴中显著上调。交互桑基图表明属水平上丰度最高的微生物与差异基因之间的相关性(图5)。其中瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)与FOX2相关性较强,布劳特氏菌属(*Blautia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)通过调节FOX2基因的表达来增加黑叶猴在圈养环境下生成乙酰基辅酶A(Acetyl-CoA)的能力。罗氏菌属(*Roseburia*)与pccB相关性较强。另枝菌属(*Alistipes*)、罗氏菌属(*Roseburia*)与mcmA1相关性较强,肠道微生物通过调节pccB、mcmA1基因的表达来影响黑叶猴生成琥珀酰辅酶A(Succinyl-CoA)的能力。经生物学和统计相关分析验证,网络图揭示了肠道微生物群和功能基因之间的许多密切联系。

## 3 讨论

通过粪便宏基因组数据揭示野外与圈养环境和饮食条件下黑叶猴肠道微生物群组成结构和功能的差异。结果表明,黑叶猴肠道微生物的结构组成、多样性和功能随着野外环境和圈养环境,以及饮食的不同而发生变化。动物的饮食结构是影响其肠道微生物群组成的关键因素<sup>[19-20]</sup>,相似的饮食会驱动动物的肠道微生物群组成的趋同<sup>[21]</sup>。通过本研究发现,野生组和圈养组的主要优势菌群都是厚壁菌门和拟杆菌门,这与段春慧等<sup>[22]</sup>对黑叶猴肠道微生物的多样性的研究结果相似,说明在不同环境下黑叶猴肠道中的优势菌群主要为厚壁菌门和拟杆菌门。厚壁菌门可以分解食物中的纤维素,并将纤维素降解为宿主的挥发性脂肪酸,还能调节体内的免疫反应,抑制机会性病原体入侵,并预防肠道炎症<sup>[23]</sup>。拟杆菌门的主要功能是帮助宿主降解碳水化合物、蛋白质和其他物质,从而提高宿主的营养利用率<sup>[24]</sup>。研究发现,腾冲红花油茶、茶树及普通油茶可以造成茶籽象幼虫发育及肠道微生物结构差异,植物中营养物质变化引起变形菌门(Proteobacteria)相对丰度减少,厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度增加<sup>[25]</sup>。因此,不同食物中的营养物质主成分及丰度的变化会引起动物肠道微生物群结构的差异。野生黑叶猴肠道微生物中的普氏菌属(*Prevotella*)的

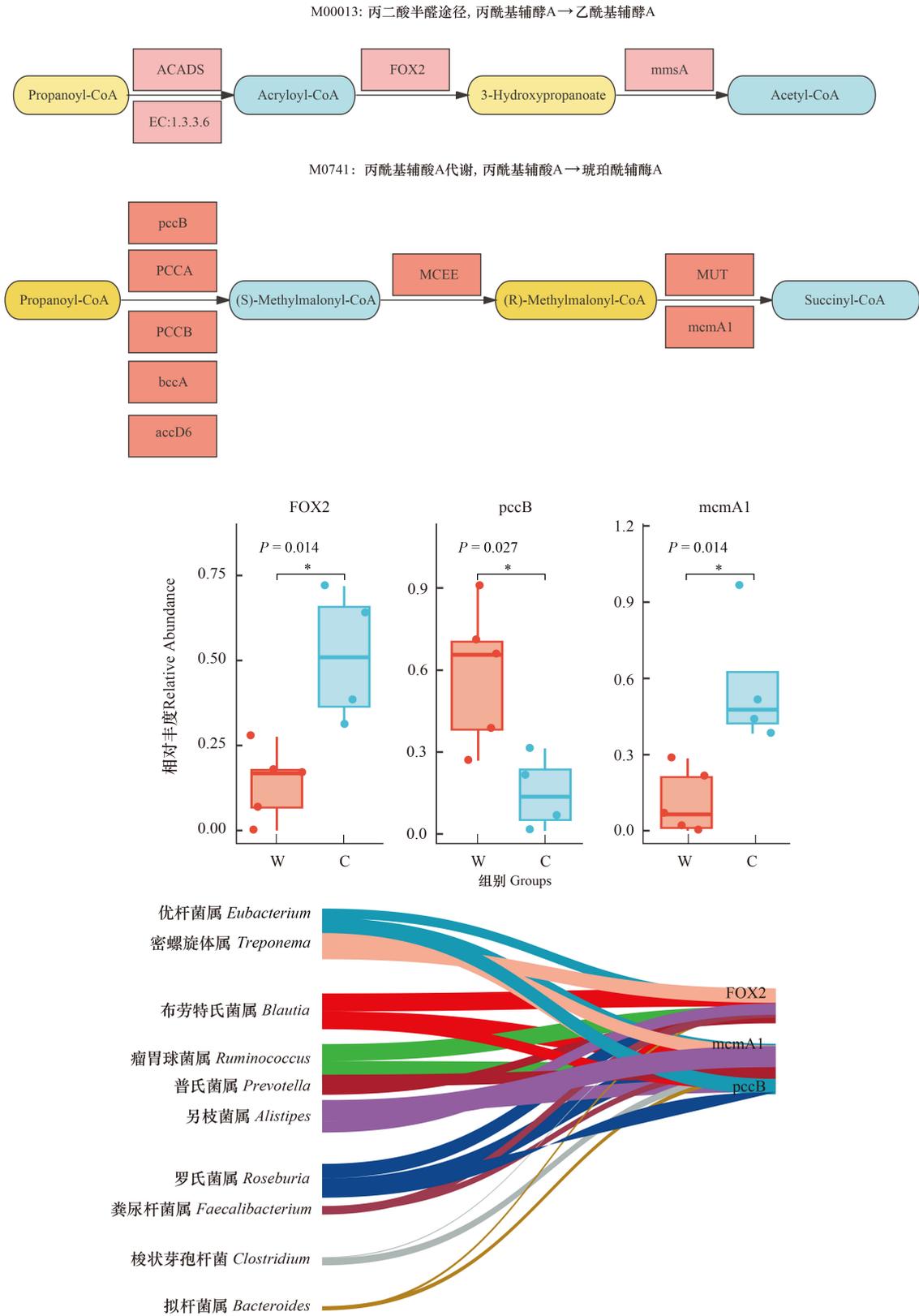


图 5 野生及圈养黑叶猴肠道微生物功能基因差异

Fig.5 Genetic differences of gut microbiota function between wild and captive groups of *Trachypithecus francoisi*

\* :  $P < 0.05$

平均相对丰度高于圈养黑叶猴。普氏菌属可以降解食物中的半纤维素、果胶和更简单的碳水化合物,例如水果和低复杂性纤维资源中的碳水化合物<sup>[26-27]</sup>。食物资源中营养成分的变化会影响宿主肠道微生物物种结构的组成<sup>[28]</sup>,例如,在以嫩叶为主要食物的春季里,与碳水化合物和单糖消化相关的普氏菌属的丰度会增加,这种转变有助于宿主应对能量和营养摄入的季节性波动<sup>[7]</sup>,表明肠道菌群在黑叶猴的营养消化吸收方面起到重要作用。布劳特氏菌属(*Blautia*)是一种广泛存在于哺乳动物肠道和粪便内的厌氧微生物,*Blautia* 的相关研究表明其相对丰度变化与炎症及代谢性疾病的改善密切相关<sup>[29]</sup>,本研究中圈养黑叶猴的 *Blautia* 丰度大于野生黑叶猴,圈养环境的变化可能会对动物相关疾病及健康状况产生影响。野外环境和圈养环境的黑叶猴肠道微生物中甲烷菌门丰度的差异极其显著( $P < 0.01$ ),甲烷菌可以将纤维素消化成能被动物吸收的物质,这与灵长类动物适应食物种类及其摄取营养有关,说明了动物进化过程中,肠道微生物组成结构与动物食性和生活环境密切相关。

Alpha 多样性指数显示野外环境和圈养环境的黑叶猴肠道微生物群落多样性和均匀度没有显著性差异,野生黑叶猴的肠道微生物丰富度指数大于圈养黑叶猴,野生黑叶猴的肠道微生物多样性指数小于圈养黑叶猴。有研究发现,野生动物由于自然捕食而有较高的食物多样性,因而比圈养动物具有更高的肠道菌群多样性<sup>[30-33]</sup>。野生黑叶猴的肠道微生物群落丰富度略高于圈养组,圈养组肠道微生物均匀度略高于野生组,与李扬的研究结果相似<sup>[34]</sup>。这可能是由于雨季期间,野生黑叶猴采食更多的嫩叶和水果,且圈养黑叶猴的食物充足,除饲喂黑叶猴常见的野生环境中取食植物外,还添加了蛋白质及果糖含量丰富的食物。

黑叶猴肠道微生物群落功能在 KEGG 中注释到的大部分基因与新陈代谢及基因与遗传信息处理相关。除此之外,野生与圈养黑叶猴肠道微生物群落在功能上存在一定的差异性,野生黑叶猴功能基因在丙酸代谢途径中显著富集并与圈养黑叶猴形成显著差异。肠道微生物群的结构组成是宿主与其环境之间强烈选择和共同进化的结果。饮食不仅导致动物肠道微生物组成、代谢物和短链脂肪酸的变化,同时也会影响动物肠道微生物代谢物及肠道中的化学反应<sup>[14-16]</sup>。肠道微生物产生许多代谢产物短链脂肪酸(SCFAs),对维持肠道微环境的动态平衡至关重要<sup>[35]</sup>。短链脂肪酸主要是微生物发酵纤维素类物种而产生的,圈养的饮食与环境可能导致关键微生物类群的丧失及肠道微生物功能的改变。梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)在圈养及野生黑叶猴中形成显著差异,*Clostridium* 可帮助黑叶猴分解树叶中的纤维素及降解树叶中的结构性碳水化合物,瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等也与动物的食性和代谢存在一定的关系<sup>[36]</sup>。表明肠道菌群在黑叶猴的营养消化吸收方面起到重要作用,与段春慧等研究结果一致<sup>[22]</sup>。说明圈养环境会影响短链脂肪酸形成,从而影响宿主能量代谢的方式。本研究通过宏基因组测序对不同环境下黑叶猴肠道微生物进行了比较分析,发现其肠道微生物群与环境存在密切联系,对于了解灵长类动物肠道微生物群的组成及其功能具有重要意义。

#### 4 结论

本研究探究不同栖息环境和饮食条件下黑叶猴肠道微生物群落特征,发现野生及圈养黑叶猴肠道微生物群落在物种水平上优势微生物群组成相似,均为厚壁菌门和拟杆菌门,出现极显著差异的为甲烷菌门(Methanobacteriota)。野生及圈养黑叶猴肠道微生物群落多样性无显著性差异,瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)通过调节 FOX2 基因的表达来增加黑叶猴在圈养环境下丙酸代谢的能力。体现了肠道微生物群在适应饮食和环境变化中,其对于宿主的生理生化过程中发挥的重要作用。研究成果将为野生黑叶猴的野外种群的科学保护提供理论基础,为探索濒危非人类灵长类动物对环境变化的生理适应性机制等问题提供了新方法,推动濒危非人类灵长类动物保护生理学和保护生态学理论的发展。

**致谢:**感谢本智仁、文贵东、陈双龙和罗怀英对写作的帮助,感谢贵州省麻阳河国家级自然保护区、贵州森林野生动物园工作人员对采样的帮助,感谢贵州省特色微生物资源开发应用平台、贵州省高等学校林火生态与管理重点实验室的帮助。

## 参考文献 (References):

- [ 1 ] Li Y P, Yang H M, Xu L, Wang Z Y, Zhao Y, Chen X S. Effects of dietary fiber levels on cecal microbiota composition in geese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, 31(8): 1285-1290.
- [ 2 ] Hooper L V, Littman D R, MacPherson A J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, 336(6086): 1268-1273.
- [ 3 ] Gao G L, Zhao X Z, Li Q, He C, Zhao W J, Liu S Y, Ding J M, Ye W X, Wang J, Chen Y, Wang H W, Li J, Luo Y, Su J, Huang Y, Liu Z H, Dai R H, Shi Y X, Meng H, Wang Q G. Genome and metagenome analyses reveal adaptive evolution of the host and interaction with the gut microbiota in the goose. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32961.
- [ 4 ] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel B L, Duncan A, Ley R E, Sogin M L, Jones W J, Roe B A, Affourtit J P, Egholm M, Henrissat B, Heath A C, Knight R, Gordon J I. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [ 5 ] Muegge B D, Kuczynski J, Knights D, Clemente J C, González A, Fontana L, Henrissat B, Knight R, Gordon J I. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 2011, 332(6032): 970-974.
- [ 6 ] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 227-238.
- [ 7 ] Sun B H, Wang X, Bernstein S, Huffman M A, Xia D P, Gu Z Y, Chen R, Sheeran L K, Wagner R S, Li J H. Marked variation between winter and spring gut microbiota in free-ranging Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*). *Scientific Reports*, 2016, 6: 26035.
- [ 8 ] Wasimuddin, Menke S, Melzheimer J, Thalwitzer S, Heinrich S, Wachter B, Sommer S. Gut microbiomes of free-ranging and captive Namibian cheetahs: diversity, putative functions and occurrence of potential pathogens. *Molecular Ecology*, 2017, 26(20): 5515-5527.
- [ 9 ] 马艳, 向信, 樊嘉凯, 张本印. 海拔高度对青藏高原放牧牦牛肠道菌群多样性的影响. *微生物学通报*, 2022, 49(2): 620-634.
- [ 10 ] Phillips C D, Phelan G, Dowd S E, McDonough M M, Ferguson A W, Delton Hanson J, Siles L, Ordóñez-Garza N, San Francisco M, Baker R J. Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history, physiology and geography. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2617-2627.
- [ 11 ] Wei F W, Wang X, Wu Q. The giant panda gut microbiome. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(8): 450-452.
- [ 12 ] 李蕾, 秦明森, 王瑶, 李润, 黎大勇, 唐贇. 人工辅助投食对滇金丝猴肠道微生物群落的影响. *微生物学通报*, 2023, 50(1): 301-312.
- [ 13 ] Clayton J B, Al-Ghalith G A, Long H T, Van Tuan B, Cabana F, Huang H, Vangay P, Ward T, Van Minh V, Tam N A, Dat N T, Travis D A, Murtaugh M P, Covert H, Glander K E, Nadler T, Toddes B, Sha J C M, Singer R, Knights D, Johnson T J. Associations between nutrition, gut microbiome, and health in a novel nonhuman primate model. *Scientific Reports*, 2018, 8: 11159.
- [ 14 ] Wu G D, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y Y, Keilbaugh S A, Bewtra M, Knights D, Walters W A, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H Z, Bushman F D, Lewis J D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 2011, 334(6052): 105-108.
- [ 15 ] David L A, Maurice C F, Carmody R N, Gootenberg D B, Button J E, Wolfe B E, Ling A V, Devlin A S, Varma Y, Fischbach M A, Biddinger S B, Dutton R J, Turnbaugh P J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, 505: 559-563.
- [ 16 ] Uhr G T, Dohnalová L, Thaiss C A. The dimension of time in host-microbiome interactions. *mSystems*, 2019, 4(1): e00216-e00218.
- [ 17 ] 王双玲. 贵州麻阳河自然保护区黑叶猴家域和生境特征研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [ 18 ] Niu K F, Liu W, Xiao Z, Wu A K, Yang T Y, Riondato I, Ellwanger A L, Ang A, Gamba M, Yang Y & Giacoma C. Exploring Local Perceptions of and Attitudes toward Endangered Francois' Langurs (*Trachypithecus francoisi*) in a Human-Modified Habitat. *International Journal of Primatology*, 2019, 40(3): 331-355.
- [ 19 ] De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet J B, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(33): 14691-14696.
- [ 20 ] Huang G P, Wang L, Li J, Hou R, Wang M, Wang Z L, Qu Q Y, Zhou W L, Nie Y G, Hu Y B, Ma Y J, Yan L, Wei H, Wei F W. Seasonal shift of the gut microbiome synchronizes host peripheral circadian rhythm for physiological adaptation to a low-fat diet in the giant panda. *Cell Reports*, 2022, 38(3): 110203.
- [ 21 ] Huang G P, Wang X, Hu Y B, Wu Q, Nie Y G, Dong J H, Ding Y, Yan L, Wei F W. Diet drives convergent evolution of gut microbiomes in bamboo-eating species. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(1): 88-95.
- [ 22 ] 段春慧, 王兴金, 李婉萍, 李超, 蒋丽霞, 李毅峰, 余建国. 基于宏基因组学分析黑叶猴肠道微生物的多样性. *中国兽医杂志*, 2020, 56(7): 1-4, 134-137.
- [ 23 ] 赵贵军, 竭航, 朱吉彬, 郑程莉, 曾德军, 张承露, 戚文华, 封孝兰. 圈养不同性别林麝粪便菌群多样性研究. *西南农业学报*, 2019, 32(7): 1652-1658, 1687.

- [24] 马晨, 张和平, 刘彩虹, 赵洁. 牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展. 动物营养学报, 2014, 26(4): 852-862.
- [25] 张守科. 四种山茶属植物(*Camellia* spp.)抗茶籽象(*Curculio chinensis*)组成型抗性机制研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2020.
- [26] Russell J B, Baldwin R L. Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 37(3): 537-543.
- [27] Salyers A A. Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. The American Journal of Clinical Nutrition, 1979, 32(1): 158-163.
- [28] Orkin J D, Campos F A, Myers M S, Cheves Hernandez S E, Guadamuz A, Melin A D. Seasonality of the gut microbiota of free-ranging white-faced capuchins in a tropical dry forest. The ISME Journal, 2019, 13(1): 183-196.
- [29] 刘雪梅. *Blautia producta* 对脂多糖诱导急性炎症的缓解作用及其安全性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [30] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, Righini N, Carbonero F, Estrada A, Rex Gaskins H, Stumpf R M, Yildirim S, Torralba M, Gillis M, Wilson B A, Nelson K E, White B A, Leigh S R. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1344-1353.
- [31] Nelson T M, Rogers T L, Carlini A R, Brown M V. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. Environmental Microbiology, 2013, 15(4): 1132-1145.
- [32] McKenzie V J, Song S J, Delsuc F, Prest T L, Oliverio A M, Korpita T M, Alexiev A, Amato K R, Metcalf J L, Kowalewski M, Avenant N L, Link A, Di Fiore A, Seguin-Orlando A, Feh C, Orlando L, Mendelson J R, Sanders J, Knight R. The effects of captivity on the mammalian gut microbiome. Integrative and Comparative Biology, 2017, 57(4): 690-704.
- [33] Uenishi G, Fujita S, Ohashi G, Kato A, Yamauchi S, Matsuzawa T, Ushida K. Molecular analyses of the intestinal microbiota of chimpanzees in the wild and in captivity. American Journal of Primatology, 2007, 69(4): 367-376.
- [34] 李杨. 野生和圈养川金丝猴肠道菌群调查分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- [35] Louis P, Hold G L, Flint H J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(10): 661-672.
- [36] 赵俊松, 张梅, 桑正林, 吴银梅. 两种猕猴属动物肠道微生物多样性比较研究. 昭通学院学报, 2019, 41(5): 39-45.