

不同地区成体大熊猫肠道微生物结构差异性及其与纤维素消化能力的相关性*

詹明晔¹ 付小花¹ 张姝² 张鑫³ 杨海迪³ 俞锦华⁴ 王爱善² 王磊^{1**}

¹同济大学环境科学与工程学院, 上海市污染控制与生态安全研究院 上海 200092

²上海动物园 上海 200335

³中国大熊猫保护研究中心 成都 611830

⁴上海野生动物园发展有限公司 上海 201399

摘要 肠道微生物对大熊猫的消化吸收和代谢免疫具有重要的意义。为了解上海、四川两地成体大熊猫肠道微生物结构的差异及其与消化纤维素能力的关系, 对两地大熊猫肠道微生物多样性、纤维素酶活性以及两地环境差异、食物性质等进行分析, 并对成体大熊猫肠道微生物性质与纤维素酶活性进行相关性分析。结果表明, 上海成体大熊猫肠道菌群结构较四川成体大熊猫更加丰富, 两地成体大熊猫肠道优势菌和特异性菌有较大差异。上海成体大熊猫具有更高的纤维素消化能力, 这可能得益于其肠道中具有更丰富的细菌多样性和较丰富的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 及山野壳菌科未知菌属 (Unclassified_f_Montagnulaceae)。两地成体大熊猫肠道微生物多样性及消化纤维素能力的差异, 可能是由食物性质、海拔等外在环境因素导致的。总体而言, 不同地区成体大熊猫肠道微生物结构差异明显, 且对大熊猫肠道的消化能力具有一定的影响。(图3 表7 参37)

关键词 大熊猫; 竹成分; 肠道微生物; 纤维素酶; 相关性

CLC Q959.838.05: Q938.1

Differences of the intestinal microbial structure of adult giant panda in different regions and its correlation with the digestibility of cellulose*

ZHAN Mingye¹, FU Xiaohua¹, ZHANG Shu², ZHANG Xin³, YANG Haidi³, YU Jinhua⁴, WANG Aishan² & WANG Lei^{1**}

¹ College of Environmental Science and Engineering in Tongji University, Institute of Pollution Control and Ecological Safety in Shanghai, Shanghai 200092, China

² Shanghai Zoo, Shanghai 200335, China

³ Chinese Giant Panda Protection Research Center, Chengdu 611830, China

⁴ Shanghai Wild Zoo Development Co., Ltd., Shanghai 201399, China

Abstract The giant panda is one of the rarest species in our country. People focus on raising, breeding, and conservation of giant pandas. The intestinal microorganisms are very important for giant pandas' digestion, absorption, metabolism, and immunity. The purpose of this study was to investigate the differences in the intestinal microbial structure of adult giant pandas between Shanghai and Sichuan and the relationship with their ability to digest cellulose. The gut microbial diversity and cellulase activity of giant pandas, as well as the environmental differences and food properties in two places were analyzed. The correlation of the microbial properties and cellulase activities of adult giant pandas were analyzed. The microbial diversity was greater in the gut of adult giant pandas in Shanghai, and the dominant bacteria and unique genus of giant pandas in Shanghai were vastly different than that in Sichuan pandas. Moreover, the cellulose digestibility was higher in Shanghai because of its richer bacterial diversity and more abundant *Bacillus* and Unclassified_f_Montagnulaceae. The differences in the intestinal microbial structure and cellulose digestive abilities of adult giant pandas might be affected by some external environmental factors, such as food and attitude. Overall, the difference in the intestine microbial diversity of adult giant pandas in different regions could partly affect cellulolytic capacity.

Keywords giant panda; bamboo ingredient; intestinal organism; cellulose; correlation

收稿日期 Received: 2018-08-11 接受日期 Accepted: 2018-10-23

*上海市科学技术委员会重大科技攻关课题 (16dz1205903, 16dz1205904) 资助 Supported by the Key Scientific and Technological Research Project of Shanghai Science and Technology Commission (16dz1205903, 16dz1205904)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: celwang@tongji.edu.cn)

肠道是动物体内的微生态系统,随着基因组测序技术的发展,肠道菌群被科学家们发现并逐渐成了生物医学界、生态学界的研究焦点,人们对肠道微生物的认知越来越深刻^[1].肠道微生物能够调节宿主的生理健康^[2-4],且肠道微生物结构的变化对宿主生长发育、代谢免疫等具有极大的影响^[5-6].肠道微生物主要来源于环境,还可通过母婴传播^[7-8].食物也会对宿主肠道菌群的结构、丰度、代谢等多个方面造成影响^[9],进而调控宿主的生命活动^[10].

大熊猫是我国特有的珍稀濒危物种.一直以来,关于大熊猫繁育和保护的研究倍受各界关注.肠道微生物对大熊猫的消化吸收、代谢发育等都具有重要的意义^[11].有关大熊猫肠道微生物的研究主要集中在细菌和真菌的分类鉴定及基因组分析揭示大熊猫肠道微生物群落多样性,并发现细菌主要由变形菌门和厚壁菌门组成,真菌主要由子囊菌门和担子菌门组成;或体外分离培养筛选大熊猫源纤维素分解菌株^[12-15].

大熊猫基因组序列发现,其中不存在可以编码纤维素酶的基因,纤维素作为竹子的主要成分,主要是被大熊猫的肠道微生物消化^[16-17].但是大熊猫肠道微生物群落结构的形成,包括肠道中降解纤维素的优势菌群及消化纤维素的能力是否受地区环境差异影响,目前尚未见有详细报道.

由于大熊猫肠道微生物的多样性与熊猫年龄具有较明显的响应关系^[11],我们选取主食竹子的成体大熊猫为研究对象,探究上海和四川两地大熊猫肠道微生物结构差异,以及纤维素分解优势菌群形成及与大熊猫消化纤维素能力的相关性,并初步探讨导致两地大熊猫肠道微生物差异的可能原因,以期为大熊猫的饲养和保护提供一定的科学依据.

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

四川省中国大熊猫保护研究中心卧龙基地地理位置为102°52'-103°25'E、30°45'-31°25'N,海拔1 800-2 000 m,该区域冬半年(11月至次年4月)晴朗干燥,夏半年温暖湿润,年均温8.5℃,11月平均最高温度15℃,最低温度5℃,极端高温21℃,年降雨量890 mm,降雨主要发生在夏半年.上海野生动物园位于上海浦东新区,地理位置121°42'-121°44'E、31°01'-31°05'N,海拔平均6 m左右,该区域属于亚热带季风气候,四季分明,日照充分,雨量充沛,年降雨量1 173.4 mm,降雨集中在5-9月.年均温17.6℃,11月平均最高温度18℃,最低温度10℃,极端高温23℃.上海的大熊猫以多种竹子混合饲养,主要有毛竹和慈孝竹,四川大熊猫以刺竹、苦竹为主,此外还辅食少量的窝头、胡萝卜、苹果等.上海的窝头配方参照四

川,胡萝卜和苹果都是统一精选的品种.两地大熊猫主食竹与窝头的喂食比例分别为10:15:1.

1.2 研究对象与样品采集

熊猫分别来自于四川省大熊猫保护研究中心卧龙基地和上海野生动物园(表1),采样期间熊猫个体均体况稳定,精神良好,未有生病或排黏等异常.共采集4只人工圈养成年大熊猫的新鲜粪便(编号P1-P4).粪便为隔天早上采集的圈内便,受外界环境干扰较小.采样时间为2017年11月,连续5 d,最后一天采集新鲜的竹子(包括竹叶和竹竿),并带回实验室.采集后的样品部分冷藏保存备用,部分-20℃保存备用.在实验室处理粪便样时取粪便中部无污染区并将5 d样品等量混合处理.

1.3 分析方法

1.3.1 食物成分分析 采集到的竹子用蒸馏水冲洗后,烘干,将干竹叶和干竹竿按照质量1:1的比例加入干净的搅碎机中磨碎;采集到的窝头,烘干后磨碎.磨好的样品过100目筛,采用元素分析仪(Vario EL III)测定总碳、总氮含量.样品过60目筛后称取0.2 g,加入60%硫酸溶液冷水浴中消化30 min后,用60%硫酸溶液定容到100 mL并过滤,将滤液再用蒸馏水稀释20倍后取出2 mL于比色管中,通过蒽酮比色法,加入0.5 mL 2%蒽酮,再缓慢加入5 mL浓硫酸,摇匀后在620 nm处比色测定纤维素含量^[18].竹子样品过60目筛,采用氧化还原滴定法测定木质素含量^[19],稍作改动.

1.3.2 粪便微生物多样性分析 冷冻保存的粪便样品首先从冰箱取出,加冰袋化冻一段时间.粪便样品将5 d的粪便样用无菌药勺各取核心无污染部分10 g,混匀备用.

处理好的样品用PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)试剂盒处理,提取并纯化总DNA,并使用Nanodrop™ 2000 Spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE, USA)仪器检测DNA浓度,-20℃保存备用.细菌使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGAGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行扩增;反应体系20 μL:5×Fastpfu Buffer 4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、FastPfu Polymerase 0.4 μL、引物各0.8 μL、BSA 0.2 μL、模板10 ng,并用ddH₂O补齐;真菌使用ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2(2043R)(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')进行扩增;反应体系:10×Buffer 2 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、rTaq Polymerase 0.2 μL、引物各0.8 μL、BSA 0.2 μL、模板10 ng,用ddH₂O补齐.反应条件:95℃ 3 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s(细菌27个循环、真菌35个循环),72℃ 10 min,10℃结束反应.扩增产物使用2%琼脂糖凝胶进一步纯化、分离.采用Illumina

表1 试验大熊猫基本信息表

Table 1 Basic information of the experimental giant panda

呼名 Name	谱系 Lineage	年龄 Age	性别 Sex	体重 Weight (m/kg)	圈养地 Location	健康状况 Health condition	样品编号 Sample number
彤彤 Tongtong	586	12	雄性 Male	118	四川卧龙基地 Wolong, Sichuan	健康 Health	P1
妃妃 Feifei	476	20	雌性 Female	121	四川卧龙基地 Wolong, Sichuan	健康 Health	P2
雅奥 Yaao	583	12	雄性 Male	134	上海野生动物园 Shanghai Animal Park	健康 Health	P3
优优 Youyou	474	20	雌性 Female	96	上海野生动物园 Shanghai Animal Park	健康 Health	P4

Miseq测序仪测序. 本研究测序和生物信息服务由美吉生物公司完成.

1.3.3 粪便纤维素酶活测定 大熊猫粪便首先进行混合预处理, 将5 d的粪便, 用干净药勺各取出核心无污染部分25 g, 混匀4 ℃保存, 用时取出 (不可超过两周). 取5 g大熊猫粪便, 加入5 mL 1%羧甲基纤维素溶液和5 mL pH 5.5的醋酸盐缓冲液, 滴加甲苯, 37 ℃条件下, 培养72 h并用DNS法显色测定酶活性, 要做无基质对照. 1 h水解释放1μg葡萄糖定义为1个酶活单位U, 参考文献并对测定条件进行适当优化^[20-22].

1.4 数据分析

本文数据分析采用RStudio-1.1442软件分析完成. 分别对大熊猫主食竹子的成分及粪便中纤维素酶活在上海和四川的差异作单因素方差分析, 所有数据均用平均值±标准误差表示 ($N = 3$), 显著差异表示为 $P < 0.05$. 通过SPSS 20.0软件对两地大熊猫肠道微生物多样性及其纤维素酶活性进行通路分析和相关性分析. 竹的碳、氮含量原始数据可通过Vario EL软件获得. 竹子和大熊猫粪便中微生物多样性分析数据由美吉生物公司提供, 原始reads去重过滤使用QIIME (Version 1.17) 完成, OTUs分类 (相似度≥ 97%) 使用Usearch (Vsesion 7.1, <http://drive5.com/uparse/>) 完成, 并采用RDP classifier (version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 对OTU代表序列进行分类学分析, 分别在各分

类学水平统计菌落组成, 利用R语言Vegan包绘制OTU群落Heatmap图.

2 结果与讨论

2.1 两地成体大熊猫肠道微生物结构与丰度的差异性

上海和四川成体大熊猫粪便中细菌、真菌的物种多样性分析结果如表2所示. 文库的覆盖率均在99%, 覆盖度较好, 结果可靠. 根据Shannon指数、Simpson指数预测大熊猫肠道微生物OTU水平, 可知大熊猫肠道中的真菌多样性和丰度总体高于细菌, 且上海大熊猫肠道微生物丰富度比四川大熊猫更高.

在门的分类水平上, 大熊猫粪便中的真菌主要为子囊菌门和担子菌门, 细菌主要为厚壁菌门和变形菌门, 两地微生物种类差异不大, 但同种细菌和真菌的占比差异较大. 分析图1得到结果 (表3). 四川成体大熊猫P1中子囊菌门占比97%, 而上海成体大熊猫P3中仅占52%; 四川成体大熊猫P2中变形菌门占比14%, 而上海成体大熊猫P4中高达26%.

在属的水平两地成体大熊猫肠道真菌的结构 (图2) 和丰度都有显著差异 ($P < 0.05$), 而其肠道细菌的结构相似 (图3), 但丰度差异显著 ($P < 0.05$). 上海大熊猫肠道中的优势真菌主要有山野壳菌科的未知菌 (Unclassified_f_Montagnulaceae) (11%-17%)、竹黄菌 (7%-11%), 上海

表2 大熊猫肠道真菌和细菌Alpha多样性分析结果

Table 2 Results of the alpha diversity analysis on intestinal fungi and bacteria of giant panda

样品 Sample	真菌 Fungi				细菌 Bacteria			
	OTU个数 OTUs	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	覆盖率 Coverage (r/%)	OTU个数 OTUs	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	覆盖率 Coverage (r/%)
P1	712	3.05	0.15	99.75	123	1.58	0.38	99.91
P2	522	1.65	0.37	99.69	406	1.91	0.35	99.83
P3	454	3.07	0.14	99.88	139	2.06	0.21	99.93
P4	575	3.48	0.07	99.84	471	2.98	0.14	99.73

表3 大熊猫肠道真菌和细菌门分类水平物种多样性结果

Table 3 Results of the intestinal fungal and bacterial diversity of giant panda at phylum level

样品名称 Sample	真菌 Fungi			细菌 Bacteria		
	子囊菌门 Ascomycota	担子菌门 Basidiomycota	其他 Others	厚壁菌门 Firmicutes	变形菌门 Proteobacteria	其他 Others
P1	97%	2%	1%	79%	4%	17%
P2	99%	1%	0	83%	14%	3%
P3	52%	46%	2%	57%	42%	1%
P4	85%	11%	4%	65%	26%	9%

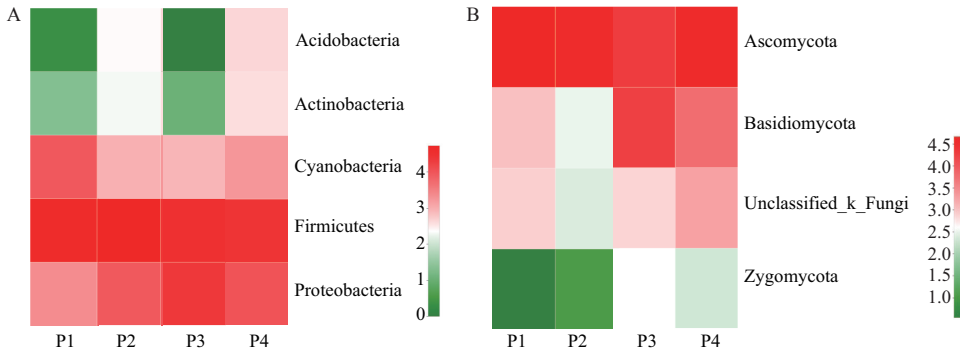


图1 四川大熊猫 (P1, P2) 和上海大熊猫 (P3, P4) 粪便门水平真菌 (A) 和细菌 (B) 多样性Heatmap图.

Fig. 1 Heatmap of the fungal (A) and bacterial (B) diversity at phylum level in Sichuan giant panda (P1,P2) and Shanghai giant panda (P3, P4).

大熊猫P4肠道中的丝孢酵母 (*Trichosporon*) 高达39%; 而四川大熊猫肠道中的优势真菌主要有格孢菌目未知菌 (Unclassified_o_Plesporales), 高达63%-90%, 子囊菌门的未知菌 (Unclassified_P_Ascomycota) 1%-7%, 梭链孢菌 (*Fusidium*) 1%-6%。

两地成体大熊猫肠道优势细菌均是梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*)、大肠杆菌志贺菌 (*Escherichia-Shigella*) 和链球菌 (*Streptococcus*) 等。上海大熊猫肠道中梭状芽孢杆菌占比19%-37%, 大肠杆菌志贺菌20%-37%, 链球菌20%-29%;

四川大熊猫肠道中梭状芽孢杆菌21%-61%, 大肠杆菌志贺菌4%-12%, 四川大熊猫P2肠道中链球菌占比高达60%, 可见两地大熊猫肠道中优势细菌占比差异较大。

两地成体大熊猫肠道微生物结构的差异可能是由两地食物性质和环境条件差异导致的。骆伦伦等的研究表明食源差异会对动物的肠道微生物结构产生显著影响, 包括食物的营养成分和本身负载的微生物等^[23-24]。上海竹子的氮含量和碳氮比差异显著 ($P < 0.05$), 上海竹子的氮含量显著高于四川 (表4)。

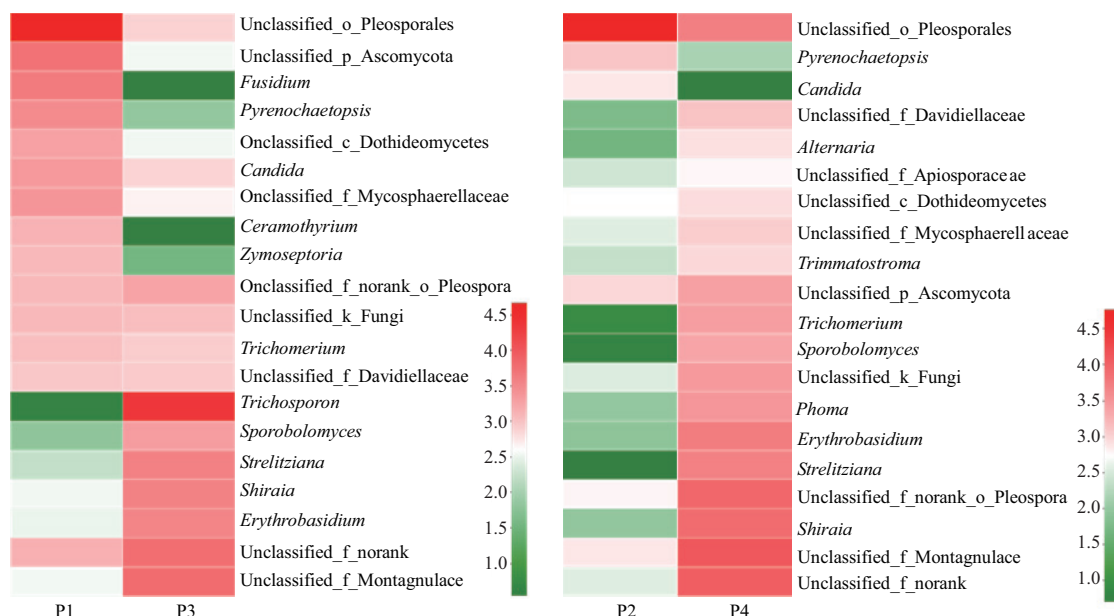


图2 四川大熊猫 (P1, P2) 和上海大熊猫 (P3, P4) 粪便属水平真菌多样性Heatmap图。

Fig. 2 Heatmap of the fungal diversity at genus level in Sichuan giant panda (P1, P2) and Shanghai giant panda (P3, P4).

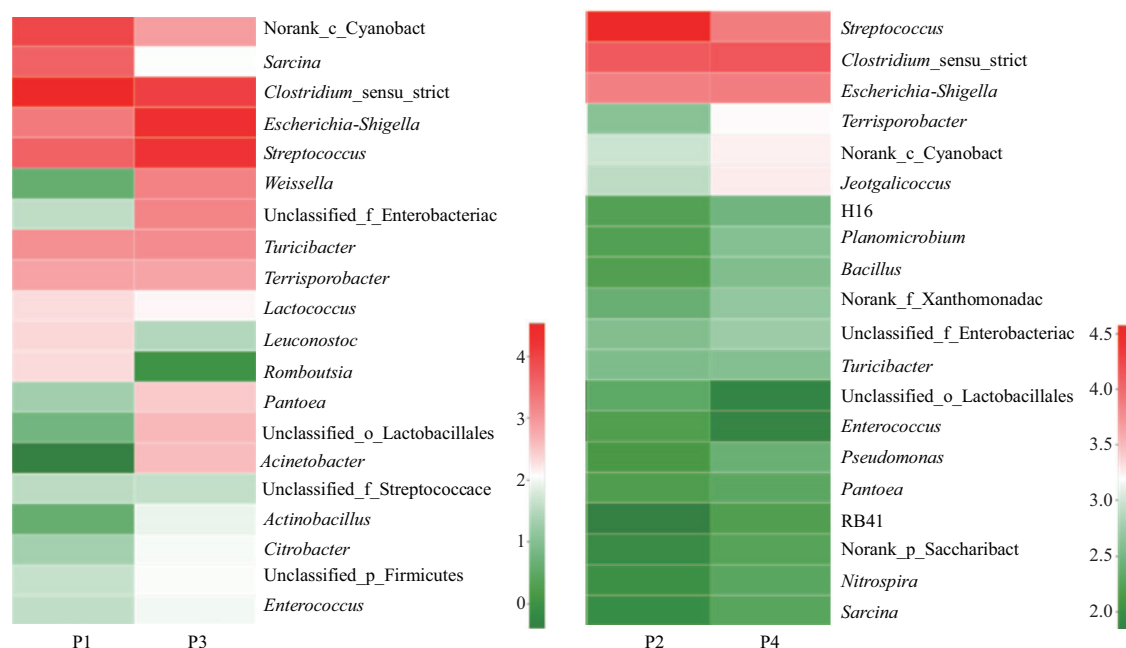


图3 四川大熊猫 (P1, P2) 和上海大熊猫 (P3, P4) 粪便属水平细菌多样性Heatmap图。

Fig. 3 Heatmap of the bacterial diversity at genus level in Sichuan giant panda (P1, P2) and Shanghai giant panda (P3, P4).

表4 11月上海和四川两地竹子、窝头成分测定结果
Table 4 Determination of the bamboo and steamed bread compositions in Shanghai and Sichuan

成分 Composition	C (w/%)	N (w/%)	C/N (R/%)	纤维素 Cellulose (w/%)	木质素 Lignin (w/%)
竹子 (上海) Bamboo in Shanghai	44.18 ± 0.72a	2.325 ± 0.04a	19.26 ± 0.29a	32.51 ± 4.01a	9.89 ± 0.19a
竹子 (四川) Bamboo in Sichuan	42.21 ± 0.53a	0.91 ± 0.05b	47.06 ± 1.79b	34.95 ± 3.04a	9.81 ± 0.18a
窝头 (上海) Steamed bread in Shanghai	42.97 ± 1.308a	3.17 ± 0.074a	13.57 ± 0.098a	24.31 ± 0.903a	3.73 ± 0.165a
窝头 (四川) Steamed bread in Sichuan	43.42 ± 0.368a	3.301 ± 0.047a	13.17 ± 0.053a	18.53 ± 2.728b	5.71 ± 0.141b

字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 等在上海成体大熊猫肠道中的丰度有所增加, 这可能与氮源丰富的环境下可促进这两种菌的代谢和生长发育有关^[25-26]。此外, 上海大熊猫肠道中的丝孢酵母菌、*Dioszegia*等酵母类真菌亦喜好氮源丰富的生长环境^[27]。另外, 我们的研究亦发现成体大熊猫肠道中的大多数微生物在竹子中都能发现 (有关竹子微生物的具体数据未在本文中列出), 如上海竹子中特有的竹黄菌 (*Shiraia*) 亦是上海大熊猫肠道中的优势菌, 四川竹子中特有的梭链孢菌 (*Fusidium*) 只在四川大熊猫粪便中发现。因此竹子的微生物是大熊猫肠道微生物的重要来源之一。由此推测两地大熊猫肠道微生物结构有较大差异可能与主食竹子中氮含量、碳氮比及竹子的微生物组成有关。

另外, 文献报道上海成体大熊猫肠道中的竹黄菌属更适宜在江南湿和湿润的环境下生长^[28]。刘海波等研究发现温度会对海豚中链球菌的生长产生影响^[29], 非洲狮肠道中 *Escherichia-Shigella* 的含量随季节温度而发生变化^[30], 由此推测环境差异如海拔、温度、湿度等不同, 也是导致两地大熊猫肠道微生物多样性差异的重要因素。本研究也进行了其他季节大熊猫肠道微生物多样性的分析, 结果显示不同季节大熊猫肠道中优势微生物的丰度确实存在一定差异, 具体数据未在本文中列出。

2.2 两地成体大熊猫肠道中纤维素酶活性及其与肠道微生物的相关性

表5的结果表明, 上海大熊猫粪便样本P3和P4平均纤维素酶活性 (4.16-16.6 U/g) 明显高于四川大熊猫P1和P2的纤维素酶活 (0.69-3.93 U/g), 这反映出上海大熊猫消化纤维素的能力较高。而且成体大熊猫的纤维素酶活性与年龄存在一定的响应趋势。

表5 大熊猫粪便中纤维素酶活测定结果表
Table 5 Results of cellulase activity measurements in giant panda stools

样品编号 Sample number	8月酶活 Enzyme in Aug. (A/U g ⁻¹)	11月酶活 Enzyme in Nov. (A/U g ⁻¹)	平均酶活 Enzyme on average (A/U g ⁻¹)
P1	0.746 ± 0.315	0.629 ± 0.037	0.687 ± 0.201
P2	1.62 ± 0.444	6.23 ± 0.370	3.93 ± 2.68
P3	2.07 ± 0.667	6.44 ± 0.259	4.16 ± 2.54
P4	13.6 ± 0.501	19.5 ± 0.481	16.6 ± 3.43

本研究选取两地成体大熊猫肠道中丰度差异较大或已有研究发现能够降解纤维素的微生物在属水平的OTU个数、表征微生物丰富度的香农指数与大熊猫的纤维素酶活性进行相关性分析, 相关系数结果见表6。从中可见, 上海大熊猫肠道中的优势微生物, 如假单胞菌、芽孢杆菌等细菌以及竹

黄菌等真菌与纤维素酶活呈现较好的响应趋势, 这可能是使其纤维素酶活性较高的原因, 结果与汪萍萍等分离得到的纤维素降解菌属^[31-32]具有一致性, 另外比较了不同年龄的上海大熊猫P3和P4相关肠道微生物的丰度, 也发现纤维素酶活性较高的P4肠道中的假单胞菌、芽孢杆菌等细菌及竹黄菌、山野壳菌科未知菌属等真菌的丰度显著高于P3, 进一步证明了以上提到的假单胞菌、芽孢杆菌、竹黄菌等可能是促使其降解纤维素的主要微生物, 而且大熊猫肠道中纤维素降解菌群的丰度可能与大熊猫的年龄存在联系, 具体地有待进一步研究。而统计分析结果表明两地成体大熊猫肠道中的不动杆菌和丝孢酵母菌丰度与大熊猫纤维素酶活性的相关性较弱。刘艳红等在亚成体大熊猫粪便的研究中发现丝孢酵母菌和白色念珠菌^[33]和不动细菌^[34]均有降解纤维素的能力, 本研究结果表明成体和亚成体大熊猫肠道中分解纤维素的优势微生物可能有所差异。

有研究发现混合菌群有利于纤维素的降解^[31, 35], 本研究亦发现大熊猫的细菌丰富度与其纤维素酶活性呈现显著的正相关关系 ($P < 0.05$), 而真菌的丰富度与纤维素酶活的相关性较小。为了进一步验证各种变量间的相互关系, 对其中与纤维素酶活性相关性较强的几个微生物变量进行了通径分析, 结果如表7所示。两种与纤维素酶活性密切相关的肠道微生物, 芽孢杆菌属和山野壳菌科未知菌属均受到大熊猫肠道细菌丰富度的影响, 且影响程度由表中的间接通径系数表示, 分别达到1.308和1.342。由此可见大熊猫肠道微生物之间相互作用、关系复杂, 且上海大熊猫肠道中更复杂的微生物结构可能是上海大熊猫能够更好地消化纤维素的另一个原因。

刘占英等发现氮源对于植食为主的动物消化纤维素至关重要^[36], 这可能是由于丰富的氮源导致更丰富的肠道微生物结构, 从而有利于纤维素降解, 这与本研究具有一致性。然而大熊猫与其他植食为主的动物相比较, 消化纤维素的能力总体较低, 降解纤维素的微生物较少^[32, 34, 36], 这极有可能是与其肠道的微环境密切相关。李昊等研究发现, 动物肠道中产酸菌的增加, 不利于降解纤维素菌的生长代谢^[37], 本研究的研究结果表明成体大熊猫中的优势细菌属, 如梭状芽孢杆菌等菌具有产酸能力, 可能会影响纤维素降解菌的活性及纤维素的消化。当然具体的影响机制还有待进一步研究。

3 结论

在门水平上, 两地大熊猫肠道微生物种类相似但同种微生物的占比不同。在属的水平上, 两地大熊猫肠道优势真

表6 大熊猫粪便中纤维素酶活性与肠道微生物性质的Pearson相关性分析

Table 6 Pearson correlation analysis of cellulase activity and gut microorganisms in giant panda stools

参数 Parameter	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	丝孢酵母菌属 <i>Trichosporon</i>	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	竹黄菌属 <i>Shiraia</i>	山野壳菌科未知菌属 Unclassified_f_Montagnulaceae	细菌丰富度 Bacterial diversity	真菌丰富度 Fungal diversity
与纤维素酶活 的相关性系数 Cellulase activity	-0.090	-0.141	0.897	0.962	0.911	0.925	0.996	0.395

表7 大熊猫粪便中纤维素酶活性与几个肠道微生物变量的通径分析

Table 7 Path analysis of some variables of gut microorganisms and cellulase activity in giant panda stools

自变量 Independent variable	与纤维素酶活性的简单相关系数 Correlation coefficient with cellulase activity	直接通径系数 Directly path coefficients	间接通径系数 Indirect path coefficient			
			细菌丰富度 Bacterial richness	山野壳菌科未知菌属 Unclassified_f_Montagnulaceae	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	合计 Total
细菌丰富度 Bacterial richness	0.996	1.402	—	-0.045	-0.362	-0.407
山野壳菌科未知菌属 Unclassified_f_Montagnulaceae	0.962	-0.048	1.308	—	-0.298	1.010
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.925	-0.378	1.342	-0.038	—	1.304

和特异性真菌的种类和丰度差异较大,而优势细菌的种类相似,但比例不同。上海和四川的食物性质和环境差异等可能是导致两地大熊猫肠道微生物的结构和丰度差异的重要原因。两地大熊猫肠道纤维素酶活性存在一定差异。上海大熊猫的纤维素酶活性较高,可能是由于其更加复杂的肠道菌群结构和其特有的优势微生物。

参考文献 [References]

- 胡旭, 王涛, 梁娜, 李薇, 吴晓丽, 金锋. 肠道微生物与认知功能[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 27 (11): 1359-1364 [Hu X, Wang T, Liang S, Li W, Wu XL, Jin F. The role of gut microbiota in cognitive function [J]. *Chin J Microbiol*, 2011, 27 (11): 1359-1364.]
- Guo L. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan [J]. *Cell*, 2014, 156 (1-2): 109-122
- Chu H. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. *Science*, 2016, 352 (6289): 1116
- Perry RJ. Acetate mediates a microbiome-brain- β cell axis promoting metabolic syndrome [J]. *Nature*, 2016, 534 (7606): 213-217
- Rangan KJ. A secreted bacterial peptidoglycan hydrolase enhances tolerance to enteric pathogens. *Science*, 2016, 353 (6306): 1434
- Shao Y. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24 (1): 66
- Hesla HM. Impact of lifestyle on the gut microbiota of healthy infants and their mothers—the ALADDIN birth cohort [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2015, 90 (3): 791-801
- Gohir W. Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptional diet [J]. *Gut Microb*, 2015, 6 (5): 310-320
- 朱立猛. 菊粉对小鼠肠道微生物调节作用的研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017 [Zhu LM. Study on intestinal microorganism regulation effect of inulin on mice [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Science, 2017]
- Ohland CL. Effects of *Lactobacillus helveticus* on murine behavior are dependent on diet and genotype and correlate with alterations in the gut microbiome [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38 (9): 1738-174
- 何永果, 晋蕾, 李果, 李才武, 李蓓, 李伟, 张亚辉, 胡正泉, 黄炎, 张和民, 邹立扣. 基于高通量测序技术研究成年大熊猫肠道菌群[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23 (5): 771-777 [He YG, Jin L, Li G, Li CW, Li B, Li W, Zhang YH, Hu ZQ, Huang Y, Zhang HM, Zou LK. Gut microbiome of adult giant pandas based on high-throughput sequencing technology [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, 23 (5): 771-777]
- 李蓓, 郭莉娟, 龙梅, 汤纯香, 周晓平, 罗燕, 邹立扣. 圈养大熊猫肠道微生物分离、鉴定及细菌耐药性研究[J]. 四川动物, 2014, 33 (2): 161-166 [Li B, Guo LJ, Long M, Tang CX, Zhou XP, Luo Y, Zou LK. Isolation and antimicrobial resistance of bacteria from intestinal tract of giant panda [J]. *Sichuan J Zool*, 2014, 33 (2): 161-166]
- 曹涵文, 吴琰韬, 甘乾福, 鲍若虹, 梁学武. 熊猫粪便中纤维素降解菌的筛选与鉴定[J]. 家畜生态学报, 2015, 36 (6): 19-25 [Cao HW, Wu LT, Gan QF, Bao RH, Liang XW. Isolation and Identification of cellulose-degradation bacteria from panda dung [J]. *Acta Ecol Anim Dom*, 2015, 36 (6): 19-25.]
- 马纛, 殷红涛. 大熊猫源纤维素分解菌的分离及产酶条件研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017 (2): 172-174 [Ma Y, Yin HY. Isolation and enzyme production of giant panda derived cellulolytic bacteria [J]. *Heilongjiang Ani Husb*, 2017 (2): 172-174]
- 张文平, 张志和. 大熊猫肠道宏基因组发育分析[R]. 第十三届全国野生动物生态与资源保护学术研讨会暨第六届中国西部动物学学术研讨会, 成都, 2017 [Zhang WP, Zhang ZH. Macro genome development analysis of giant panda's intestine [R]. The 13th National Symposium on Wildlife Conservation and the 6th Western China Zoological Symposium, Chengdu, 2017]
- 房伟, 方泽民, 张学成, 肖亚中. 肠道微生物协助大熊猫转化降解木质素的证据[R]. 全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会, 呼和浩特, 2012 [Fang W, Fang ZM, Zhang XC, Xiao YZ. Intestinal microorganisms assisting giant pandas in transforming and degrading lignin [R]. National Microbial Resources Academic and National Microbial Resource Platform Operation Service Seminar, Huhhot, 2012]
- Li R. Erratum: the sequence and de novo assembly of the giant panda genome [J]. *Nature*, 2010, 463: 311-317
- 陆海燕, 宋美, 史卫东, 郭铁. 蒽酮光度法测定羧甲基纤维素钠[J]. 天津科技大学学报, 1996 (2): 86-88 [Lu HY, Song M, Shi WD, Guo T. Anthrone photometric on the determination of sodium carboxymethyl cellulose [J]. *J Tianjin Univ Light Ind*, 1996 (2): 86-88]

- 19 范鹏程, 田静, 黄静美, 雷文泉, 邱会东. 花生壳中纤维素和木质素含量的测定方法[J]. 重庆科技学院学报: 自然科学版, 2008, **10** (5): 64-65. [Fan PC, Tian J, Huang JM, Lei WQ, Qiu HD. On the determination of cellulose and lignin of peanut shells [J]. *J Chongqing Univ Sci Technol Nat Sci Ed*, 2008, **10** (5): 64-65.]
- 20 徐昶, 龙敏南, 邬小兵, 徐惠娟, 陈重安, 张凤章, 许良树. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 厦门大学学报(自然版), 2005, **44** (1): 107-111 [Xu C, Long MN, Wu XB, Xu HJ, Chen CA, Zhang FZ, Xu LS. Screening and characterization of a high cellulase producing strain *Aspergillus glaucus* XC9 [J]. *J Xiamen Univ (Nat Sci)*, 2005, **44** (1): 107-111]
- 21 袁楠, 亢宗静, 卢圣鄂, 王莹燕, 张小平, 辜运富. 富集培养下的若尔盖高原湿地低温纤维素降解细菌群落结构[J]. 应用与环境生物学报, 2016, **22** (3): 402-408 [Yuan N, Kang ZJ, Lu SE, Wang YY, Zhang XP, Gu YF. Community structures of the cold-adapted cellulose-degrading bacteria in the Zoige plateau wetland under enrichment culture conditions [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, **22** (3): 402-408]
- 22 曾文慧, 钟俊鸿, 李秋健, 刘炳荣. 反应温度对台湾乳白蚁内外源纤维素酶活力的差异影响[J]. 江苏农业科学, 2017, **45** (8): 91-94 [Zeng WH, Zhong JH, Li QJ, Liu BR. Effects of reaction temperature on endogenous and exogenous cellulase activities of *C. formosanus* in Taiwan [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, **45** (8): 91-94.]
- 23 骆伦伦. 秸秆对黄粉虫生长发育、消化酶和肠道微生物的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017 [Luo LL. Effects of straw on growth, development, digestive enzymes and intestinal microbes of *Tenebrio molitor* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2017]
- 24 段云峰, 吴晓丽, 金锋. 饮食对自闭症的影响研究进展[J]. 科学通报, 2015, **60** (30): 2845-2861 [Duan YF, Wu XL, Jin F. Advances in research on the effects of diet on autism [J]. *Chin Sci Bull*, 2015, **60** (30): 2845-2861]
- 25 Justyna MC. Transcriptome remodeling of *Pseudomonas putida* KT2440 during mcl-PHAs synthesis: effect of different carbon sources and response to nitrogen stress [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, **45** (6): 1-14
- 26 步长英. 丝兰皂甙、芽孢杆菌对肉鸡生产性能、氮代谢和排泄物氨气散发量的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008 [Bu CY. Effect of saponin and *Bacillus* on broiler performance, nitrogen metabolism and excretion ammonia emissions [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2008]
- 27 王启明. 中国担子菌酵母的分类与分子系统学研究[D]. 北京: 中国科学院微生物所, 2004 [Wang QM. Classification and molecular systematic studies of Basidiomycetes in China [D]. Beijing: Institute of Microbiology, Chinese Academy Science, 2004]
- 28 林海萍, 黄小波, 毛胜凤, 张昕. 野生竹黄菌生物学性状研究[J]. 中草药, 2008, **39** (9): 1407-1409 [Lin HP, Huang XB, Mao SF, Zhang X. Study on biological characters of wild bamboo flavobacterium [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2008, **39** (9): 1407-1409]
- 29 刘海波, 绳秀珍, 唐小千, 邢婧, 战文斌. 培养条件对海豚链球菌的生长及其胞外产物蛋白组成的影响[J]. 中国动物检疫, 2016, **33** (5): 85-89 [Liu HB, Sheng XZ, Tang XQ, Xing J, Zhan WB. Effects of culture conditions on the growth of *Streptococcus iniae* and the protein composition of extracellular products [J]. *Chin Anim Health Insp*, 2016, **33** (5): 85-89]
- 30 贾小营. 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[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017 [Jia XY. Analysis of intestinal microbial diversity and functional studies of African lions in different seasons [D]. Chagnchun: Jilin Agricultural University, 2017]
- 31 汪萍萍, 袁兴中, 梁运珊, 曾光明, 黄华军, 祝慧娜, 晁阳, 孙婷. 铜绿假单胞菌对白腐菌产木质纤维素降解酶的影响[J]. 环境科学学报, 2011, **31** (10): 2125-2131 [Wang PP, Yuan XZ, Liang YS, Zeng GM, Huang HJ, Zhu HN, Chao Y, Sun T. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the production of lignocellulase from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Acta Sci Circumst*, 2011, **31** (10): 2125-2131]
- 32 朱亚静. 鹅肠道纤维素酶和蛋白酶活性分析以及纤维素降解菌的筛选[D]. 南宁: 广西大学, 2013 [Zhu YJ. Analysis of cellulase and protease activities in goose intestine and screening of cellulose degrading bacteria [D]. Nanning: Guangxi University, 2013.]
- 33 刘艳红, 钟志军, 艾生权, 王承东, 夏玉, 吴虹林, 李才武, 杨海迪, 林珊珊, 彭广能. 亚成体大熊猫肠道纤维素降解真菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2015 (1): 43-49 [Liu YH, Zhong ZJ, Ai SQ, Wang CD, Xia Y, Wu HL, Li CW, Yang HD, Lin SS, Peng GN. Isolation and identification of intestinal cellulose-degrading fungi in sub-adult giant pandas [J]. *Chin Vet Sci*, 2015 (1): 43-49]
- 34 刘松. 竹虫 (*Omphisca fuscidentalis*) 肠道微生物多样性及纤维素酶学特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017 [Liu S. The intestinal microbial diversity and cellulase properties of *Omphisca fuscidentalis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultura Science, 2017]
- 35 Lópezmondéjar R, Zühlke D, Becher D. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems [J]. *Sci Rep*, 2016, **6** (6): 25279
- 36 刘占英. 绵羊瘤胃主要纤维降解细菌的分离鉴定及不同氮源对其纤维降解能力的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008 [Liu ZY. Isolation and identification of main fiber degradation bacteria in sheep rumen and effects of different nitrogen sources on their fiber degradation capability [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008]
- 37 李昊. 固氮菌和纤维素分解菌的分离及混合添加对瘤胃发酵的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013 [Li H. Effects of azotobacter and cellulolytic bacterium on the rumen fermentation by mixed addition [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013]