



圈养与野外近人环境 猕猴肠道菌群的比较分析

赵欣然, 王晓晨*

(中国科学院动物所, 动物生态学与保护生物学重点实验室, 北京, 100101)

稿件运行过程

收稿日期: 2023-08-19

修回日期: 2023-11-02



关键词: 猕猴;

肠道菌群;

鸟枪法测序;

宏基因组分析

Key words: Macaque (*Macaca mu-**latta*);

Gut microbiome;

Shotgun sequencing;

Metagenome analysis

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-02-0269-07

DOI: 10.12375/ysdwx.20240205

摘要

通过对来自北京动物园 10 只圈养猕猴 (*Macaca mulatta*) 和来自河南济源五龙口风景区 10 只处于野外近人环境中的猕猴的粪便微生物进行鸟枪法测序, 分析两种不同环境下猕猴的肠道菌群组成和差异。结果表明: 20 份样品共检测出 9 个门、18 个纲、22 个目、31 个科、46 个属和 226 个种。通过分析发现, 圈养和野外近人环境群体共享了绝大部分细菌 (200 种), 但是近人环境群体相比于圈养群体, 独有更多种类的微生物。圈养猕猴肠道微生物主要由厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 组成。处于野外近人环境中的猕猴肠道微生物主要由厚壁菌门、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门组成。圈养猕猴和近人猕猴属水平上的肠道微生物结构存在显著差异 ($p=0.001$)。圈养猕猴和野外近人环境猕猴肠道菌群组成的多样性与差异, 可为猕猴的圈养以及景区野生动物管理提供指导和理论基础。

Comparing Gut Microbiome of Macaques in Captive and Wild Environment

ZHAO Xinran, WANG Xiaochen*

(Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Animal Ecology and
Conservation Biology, Institute of Zoology, Beijing, 100101, China)

Abstract: Based on the shotgun sequencing of the fecal microbiome of 10 macaques (*Macaca mulatta*) from the Beijing Zoo and 10 macaques from Henan Jiyuan Wulongkou Scenic Spot, the difference in gut microbial community between macaques from two differ-

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)(XDA23080201)

第一作者简介: 赵欣然(2005—), 女, 本科生。E-mail: 3255463129@qq.com

*通信作者: 王晓晨, E-mail: wangxiaochen@ioz.ac.cn

nt environments was analyzed. The results showed that nine phylum, 18 classes, 22 orders, 31 families, 46 genera and 226 species were detected in the 20 samples. The analysis found that the captive and wild populations shared the most of bacteria (200 species), but wild populations had a greater variety of microbes than captive populations. The gut microbiome of captive macaques was mainly composed of Firmicutes, Bacteroidetes, and Chloroflexi. The gut microbiome of wild macaques was mainly composed of Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes. There was a significant difference ($p=0.001$) in the gut microbiome structure between captive and wild macaques at the genus level. The diversity and difference of gut microbiome between captive macaques and wild macaques can provide guidance and theoretical basis for captive macaques and wildlife management in scenic spots.

肠道菌群作为机体的“第二套基因组”,不仅仅是一组随机的微生物,而是一个在宿主生理和行为中扮演关键角色的复杂群落^[1]。肠道菌群可以通过影响宿主代谢^[2]、营养^[3]、免疫^[4]、行为^[5]和发育^[6]等,帮助宿主适应各种饮食变化、环境气候变化以及病原体等^[7]。因肠道菌群具有高度的可塑性,饮食结构、系统发育关系和周围环境都会影响其结构和功能^[8],从而帮助宿主对环境的变化做出快速反应^[7]。圈养环境或人类干扰会导致非人灵长类动物失去原有的肠道菌群结构^[9],并且向现代人类的肠道菌群结构靠拢^[10]。

猕猴(*Macaca mulatta*)属灵长目(Primates)猴科(Cercopithecidae)猕猴属(*Macaca*),是国家二级重点保护野生动物,具有重要的科研价值^[11]。同时猕猴是诸多旅游区、动物园的重要观赏动物^[12],能够带动旅游经济。出于科研目的以及保护性目的所圈养的猕猴数量较多,对于其肠道菌群变化的探究有利于指导圈养种群的健康管理和科学喂养,但关于猕猴肠道健康的探究还较为缺乏,无论是在分类水平上还是在功能水平上,圈养和野外近人环境(野生无固定投食,但是和人类接触密切)猕猴肠道菌群的差异都知之甚少。因此本研究拟开展对圈养和野外近人环境猕猴肠道菌群差异的探究,通过宏基因组测序,对比分析来自北京动物园的圈养猕猴与来自河南济源五龙口风景区的野外近人环境猕猴肠道菌群的差异与结构,旨在为猕猴的圈养以及景区野生动物管理提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 样品采集

圈养猕猴粪便样品来源于北京动物园(10份),

野外近人环境猕猴的粪便样品来源于河南济源五龙口风景区(10份)。采集的粪便样本由RNALater液体于干冰中保存,并在一周内送至实验室,-20℃保存备用。为了减少对动物栖息地的影响,在采集样品过程中未携带对生物群系有不良影响的有毒物质。本研究严格遵守中国野生动物保护学会制定的议定书、美国灵长类动物学会(ASP)关于非人灵长类动物伦理待遇的原则和中国的法律要求进行。

1.2 DNA采集和鸟枪法测序

采用QIAamp DNA stool mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)进行基因组DNA提取。按照试剂盒说明(每个粪便样本0.25 g)完成基因组DNA提取后,使用NanoDrop (ND-1000) spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)测定DNA浓度,并通过1%的琼脂糖凝胶电泳评估DNA降解程度。DNA样本于-20℃保存备用。通过Illumina NovaSeq 6000进行每样本10 Gb的鸟枪法测序。

1.3 质量控制

使用Trimmomatic v0.36剪切低质量测序片段:弃置小于70 bp的测序片段,并且当4 bp滑动窗口的平均质量小于20时,则从3'端删除片段。使用bowtie2 v2.3.5软件,选择“-very-sensitive”参数,比对参考NCBI上的基因组过滤宿主或人类污染物(*Macaca mulatta*: assembly Mmul_10; *Homo sapiens*: assembly GRCh38. p13)。

1.4 Alpha多样性与Beta多样性分析

使用R“vegan”包计算Chao1指数和ACE指数,得出圈养以及野外近人环境猕猴间的Alpha多样性。基于R“vegan”包的Bray-Curtis dissimilarity在属水平上进行主坐标分析(PCoA),并通过“stats”包

进行非度量多维尺度分析(NMDS),得出两个群体的Beta多样性。

1.5 宏基因组分类学分析

使用mOTUs v. 2. 0. 0生成分类学物种相对丰度表,并对物种丰度表进行过滤,舍弃最大相对丰度未超过 1×10^{-3} 的微生物物种以及未映射的宏基因组测序片段。

1.6 宏基因组功能分析

为了重建微生物基因组,了解每组的基因水平和功能水平特征,使用单样本宏基因组组装和功能注释。简单来说,使用MEGAHIT(v1. 2. 6)组装,使用MetaGeneMark对长度超过300 bp的DNA长片段进行基因预测。将长度大于100 bp的氨基酸序列,使用Diamond v0. 9. 24参考KEGG(v50)和CARD数据库进行功能注释,参数为-d-q-e1e-5-k1,计算KEGG功能通路相对丰度和抗性基因相对丰度。

1.7 差异分析

为了比较圈养和野外近人环境群体微生物和功

能的差异,分别绘制物种水平和抗性基因的韦恩图。此外,利用LEfSe软件对物种、KEGG通路相对丰度进行差异分析,得到野外近人环境与圈养群体之间有差异的细菌和功能。

2 结果

2.1 物种丰度

共计对20只猕猴样本进行宏基因组测序和分析,发现9个门、18个纲、22个目、31个科、46个属和226个种。根据物种注释结果,选取各个样本门水平上丰度排名前10的物种,绘制门水平物种相对丰度柱形图(图1)。在门水平上,圈养猕猴肠道微生物主要由厚壁菌门(Firmicutes, 15.18%~62.15%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 13.48%~43.47%)和绿弯菌门(Chloroflexi, 0.12%~30.51%)组成,野外近人猕猴肠道微生物主要由厚壁菌门(23.57%~66.16%)、变形菌门(Proteobacteria, 0.07%~27.42%)和拟杆菌门(6.89%~25.03%)组成。

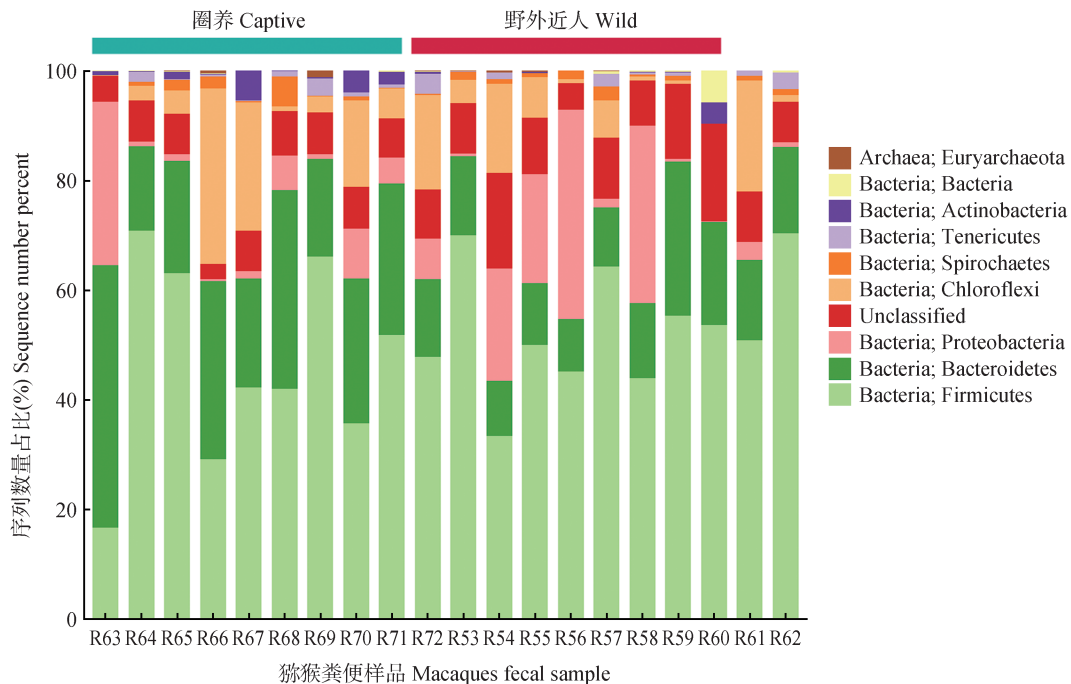


图1 野外近人-圈养猕猴肠道菌群门水平的物种相对丰度

Fig. 1 Relative abundance of gut microbial community at phylum level in wild-captive macaques

2.2 多样性

使用非度量多维尺度分析以及主坐标分析法分析属水平上猕猴肠道微生物的Beta多样性(图2)。圈养猕猴和近人猕猴的属水平上肠道微生物结构存在显著差异($p=0.001$)。通过物种水平上的韦恩图,

比较圈养和近人猕猴群体肠道菌群的组成差异(图3)。经过分析,发现圈养和近人群体共享了绝大部分细菌(200种),但是近人群体相比圈养群体,独有更多种类的微生物。由图3可知,近人群体特有20种细菌,而圈养群体特有6种细菌。

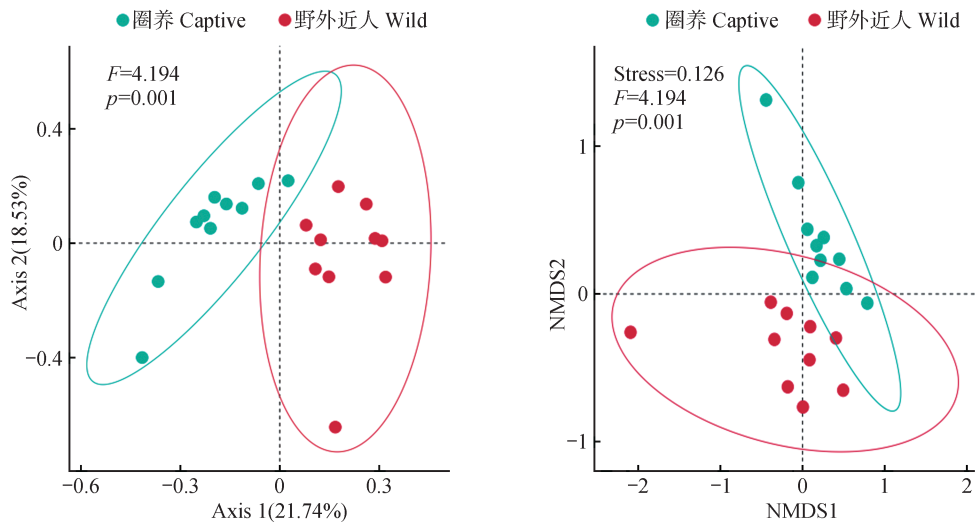


图2 野外近人-圈养猕猴肠道菌群属水平的主坐标分析(PCoA)和非度量多维排列(NMDS)Beta多样性

Fig. 2 PCoA and NMDS Beta-diversity analysis of gut microbiome at genus level in wild-captive macaques

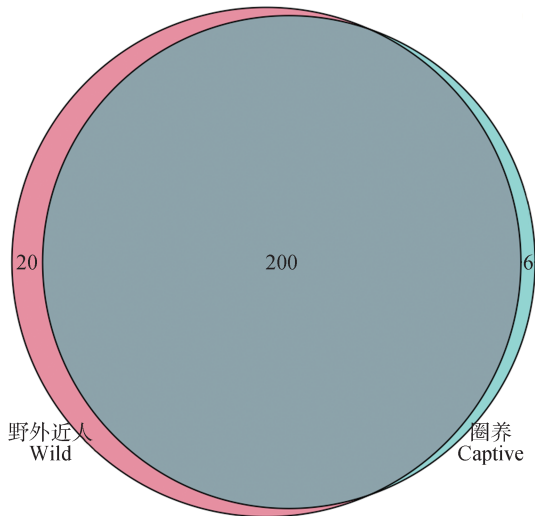


图3 野外近人-圈养猕猴肠道菌群物种水平韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of gut microbiome at species level in wild-captive macaques

2.3 基于属水平上的物种差异

通过线性判别分析,在属水平上判定野外近人组和圈养组间具有显著差异的菌属(图4),结果表明,在野外近人组中具有显著丰度差异的属是不动杆菌属(*Acinetobacter*)、霍尔德曼氏菌属(*Holdemannella*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、变形杆菌属(*Proteus*)、月单胞菌属(*Selenomonas*)、柯林斯菌属(*Collinsella*)、库特氏菌属(*Kurthia*)、土壤芽孢杆菌属(*Solibacillus*)、丁酸球菌属(*Butyricoccus*)、粪球菌属(*Coprococcus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)。此外,在野外近人群体中存在更多的未知细菌。

在圈养组中具有显著丰度差异的菌属有普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、毛螺菌属(*Lachnospira*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、真细菌属(*Eubacterium*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、琥珀酸弧菌属(*Succinivibrio*)及Succinivibrionaceae unclassified。

2.4 肠道菌群功能差异

通过抗性基因韦恩图(图5)可知,野外近人猕猴所独有的抗性基因要远多于圈养猕猴所独有的抗性基因。在进一步分析两组间抗性基因的Alpha多样性后,发现野外近人群体的抗性基因多样性要高于圈养群体。这一发现与之前的部分野生圈养研究存在差异,如在Brisson等^[13]对非洲圈养与自由放养的野生食草动物的研究中发现,相比于自由放养的野生食草动物,圈养动物粪便中的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)更有可能携带抗性基因;Guo等^[14]研究发现圈养大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)的肠道微生物相比于野生大熊猫拥有更多的抗性基因。

3 讨论

本研究对猕猴粪便进行了宏基因组测序,结果表明,圈养猕猴肠道微生物主要由厚壁菌门、拟杆菌门和绿弯菌门组成,野外近人猕猴肠道微生物主要由厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门组成。不论是圈养猕猴还是野外近人猕猴,其肠道微生物中的优势菌群都包含厚壁菌门与拟杆菌门,这与人类健康肠道微生物群的主要结构相似,即主要由厚壁菌门和拟杆菌门组成^[15]。

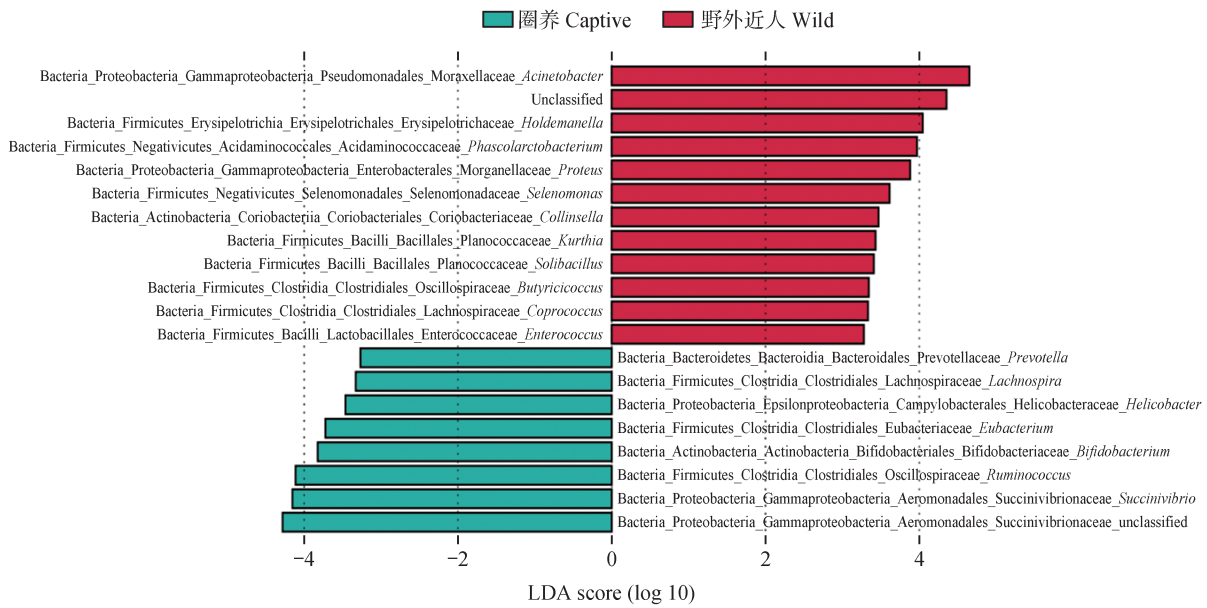


图4 野外近人-圈养猕猴肠道菌群属水平 LEfSe 差异分析

Fig. 4 The LEfSe difference analysis of gut microbiome at genus level in wild-captive macaques

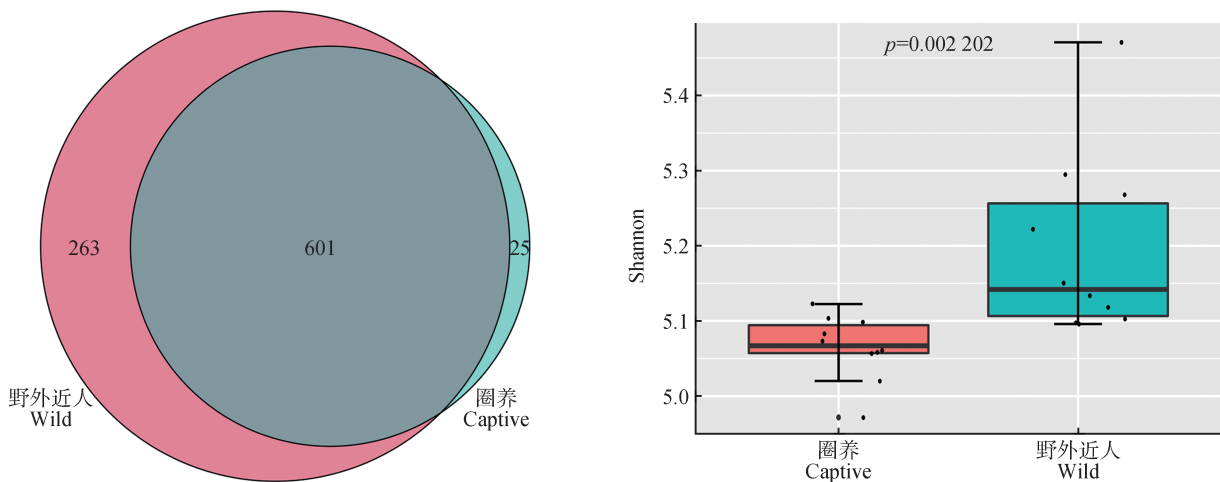


图5 野外近人-圈养猕猴肠道菌群抗性基因差异比较以及 Alpha 多样性比较

Fig. 5 Comparison of gut microbiota resistance gene variations and Alpha diversity in wild-captive macaques

3.1 圈养与野外近人环境猕猴肠道菌群存在显著差异

本研究对猕猴的肠道菌群进行了 Alpha 多样性和 Beta 多样性分析,结果表明圈养猕猴和野外近人环境猕猴的肠道微生物在物种组成和功能上存在显著差异。在其他物种的研究中,也存在这样的差异,如在对绿尾虹雉(*Lophophorus lhuysii*)的研究中发现野生和家养的绿尾虹雉肠道菌群结构之间存在显著差异^[16];对鹿鼠(*Peromyscus maniculatus*)的研究中发现野生鹿鼠肠道菌群的 Alpha 多样性高于圈养鹿

鼠^[17]。这样的差异可能是由食物种类不同导致。

3.2 圈养与野外近人环境猕猴肠道菌群存在结构和功能差异

本研究进行了属水平上的物种差异分析,发现野外近人组具有显著丰度差异的属一共有 11 个,其中变形杆菌代表着代谢紊乱和炎症性肠病等疾病^[18];霍尔德曼氏菌能够改善葡萄糖耐量并调节 GLP-1 信号通路^[19];不动杆菌能够利用广泛的有机化合物作为碳和能量的来源,降解多种有机污染物^[20];考拉杆菌则可以利用拟杆菌属(*Bacteroides*)和副拟杆菌属

(*Parabacteroides*)产生的琥珀酸盐(succinate)生成短链脂肪酸,而高脂肪的饮食会使*Bacteroides*和*Parabacteroides*的丰度增加^[21]。因此,考拉杆菌的丰度会因为高脂肪的饮食而增加,意味着野外近人环境猕猴可能接触到更多的有机污染物和高脂肪饮食。这可能是游客在风景区中旅游时,经常会向野生动物投喂自行携带的高热量高脂肪食品。在圈养组中具有显著丰度差异的属一共有8个。其中毛螺菌是肠道菌群中重要的丁酸盐生产者^[22];螺杆菌引起肠炎和胃炎^[23];真细菌产生丁酸盐,在能量稳态、结肠运动、免疫调节和抑制肠道炎症中起关键作用^[24];双歧杆菌能将芳香族氨基酸转化为乳酸衍生物^[25];普雷沃氏菌与高水平的碳水化合物以及水果和蔬菜的摄入呈正相关^[26],代表圈养猕猴的饮食中所含碳水化合物的成分更多。在对黔金丝猴(*Rhinopithecus brelichi*)的研究中也发现,相比于野生群体,圈养黔金丝猴具有更高相对丰度的普雷沃氏菌,并推测其原因是圈养群体主要饮食为水果及玉米粉^[27]。

3.3 野外近人环境猕猴具有更多特有的抗药性肠道微生物

通过对猕猴肠道菌群的基因进行抗性基因检测,发现相比于圈养猕猴,野外近人环境猕猴的肠道微生物中拥有更多的特有抗药性基因。在对圈养、半圈养以及野生猕猴的研究^[28]中,同样发现半圈养(因为野外近人环境的猕猴粪便取样地点位于风景区,猕猴虽身处野外,却能够经常与人类接触,所以认为其与“半圈养”状态类似)状态下的猕猴拥有更高的抗性基因多样性,推测是野外近人环境猕猴的粪便样本来源于河南济源五龙口风景区中的非圈养猕猴,在风景区中并未禁止游客同猕猴产生肢体接触。因此野外近人环境猕猴拥有与更多、更复杂的人群接触的机会,可能导致它们接触到更多抗生素;而圈养猕猴生活在北京动物园,除了饲养员外极少与人类拥有亲密接触的机会,因此其肠道菌群拥有相对较少的抗性基因。

参考文献:

- [1] AMATO K R, YEOMAN C J, CERDA G, *et al.* Variable responses of human and non-human primate gut microbiomes to a Western diet[J]. *Microbiome*, 2015, 3: 53.
- [2] VALDES A M, WALTER J, SEGAL E, *et al.* Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *BMJ*, 2018, 361: k2179.
- [3] CHEVALIER C, STOJANOVIĆ O, COLIN D J, *et al.* Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold [J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1360–1374.
- [4] LEE Y K, MAZMANIAN S K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? [J]. *Science*, 2010, 330(6012): 1768–1773.
- [5] BRUCE-KELLER A J, SALBAUM J M, LUO M, *et al.* Obesity-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity [J]. *Biological Psychiatry*, 2015, 77 (7) : 607–615.
- [6] MUELLER N T, BAKACS E, COMBELLIK J, *et al.* The infant microbiome development: mom matters[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2015, 21(2): 109–117.
- [7] SUZUKI T A, LEY R E. The role of the microbiota in human genetic adaptation[J]. *Science*, 2020, 370(6521): eaaz6827.
- [8] BAJ A, MORO E, BISTOLETTI M, *et al.* Glutamatergic signaling along the microbiota-gut-brain axis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1482.
- [9] FRANKEL J S, MALLOTT E K, HOPPER L M, *et al.* The effect of captivity on the primate gut microbiome varies with host dietary niche [J]. *American Journal of Primatology*, 2019, 81 (12) : e23061.
- [10] CLAYTON J B, VANGAY P, HUANG H, *et al.* Captivity humanizes the primate microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (37): 10376–10381.
- [11] 蒋学龙, 王应祥, 马世来. 中国猕猴的分类及分布[J]. *动物学研究*, 1991, 12(3): 241–247.
- JIANG X L, WANG Y X, MA S L. Taxonomic revision and distribution of subspecies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in China [J]. *Zoological Research*, 1991, 12(3): 241–247.
- [12] 王钰炜, 路纪琪, 田军东. 国内涉及非圈养猕猴的旅游区现状调查[J]. *动物学杂志*, 2022, 57(4): 514–520.
- WANG Y W, LU J Q, TIAN J D. Survey on the status of rhesus macaque-involved tourism in China [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2022, 57(4): 514–520.
- [13] BRISSON L, CARON A, MAZUY-CRUHADET C, *et al.* Comparing antibiotic resistance in free-ranging vs. captive African wild herbivores[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2023, 59(2): 224–233.
- [14] GUO W, MISHRA S, WANG C D, *et al.* Comparative study of gut microbiota in wild and captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. *Genes*, 2019, 10(10): 827.
- [15] JANDHYALA S M, TALUKDAR R, SUBRAMANYAM C, *et al.* Role of the normal gut microbiota [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(29): 8787–8803.
- [16] JIANG D D, HE X, VALITUTTO M, *et al.* Gut microbiota composition and metabolomic profiles of wild and captive Chinese monals (*Lophophorus lhuysii*) [J]. *Frontiers in Zoology*, 2020, 17(1): 36.
- [17] SCHMIDT E, MYKYTCZUK N, SCHULTE-HOSTEDDE A I. Effects of the captive and wild environment on diversity of the gut

- microbiome of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) [J]. The ISME Journal, 2019, 13: 1293–1305.
- [18] RIZZATTI G, LOPETUSO L R, GIBIINO G, *et al.* Proteobacteria: a common factor in human diseases [J]. BioMed Research International, 2017, 2017: 9351507.
- [19] ROMANÍ-PÉREZ M, LÓPEZ-ALMELA I, BULLICH-VILAR-RUBIAS C, *et al.* *Holdemanella bififormis* improves glucose tolerance and regulates GLP-1 signaling in obese mice [J]. FASEB Journal, 2021, 35(7): e21734.
- [20] KAMPFER P. *Acinetobacter* [M]//BATT C A, TORTORELLO M L. Encyclopedia of food microbiology. 2nd ed. London: Academic Press, 2014: 11–17.
- [21] WU F F, GUO X F, ZHANG J C, *et al.* *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 14(4): 3122–3126.
- [22] DAHIYA D K, RENUKA, DANGI A K, *et al.* New-generation probiotics: perspectives and applications [M]//FAINTUCH J, FAINTUCH S. Microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications. London: Academic Press, 2019: 417–424.
- [23] WESLEY I V. *Helicobacter* [M]//ROBINSON R K, BATT C A, PATEL P D. Encyclopedia of food microbiology. San Diego: Academic Press, 2000: 1047–1052.
- [24] MUKHERJEE A, LORDAN C, ROSS R P, *et al.* Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health [J]. Gut Microbes, 2020, 12(1): 1802866.
- [25] LAURSEN M F, SAKANAKA M, VON BURG N, *et al.* Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut [J]. Nature Microbiology, 2021, 6: 1367–1382.
- [26] WU G D, CHEN J, HOFFMANN C, *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes [J]. Science, 2011, 334(6052):105–108.
- [27] HALE V L, TAN C L, NIU K F, *et al.* Gut microbiota in wild and captive Guizhou snub-nosed monkeys, *Rhinopithecus brelichi* [J]. American Journal of Primatology, 2019, 81(10/11): e22989.
- [28] JIA T, CHANG W S, MARCELINO V R, *et al.* Characterization of the gut microbiome and resistomes of wild and zoo-captive macaques [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 8: 778556.