

研究报告

海拔高度对青藏高原放牧牦牛肠道菌群多样性的影响

马艳¹, 向信¹, 樊嘉凯¹, 张本印^{*1,2}

1 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016

2 青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

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[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 620-634

Ma Yan, Xiang Xin, Fan Jiakai, Zhang Benyin. Effect of altitude on the diversity of gut microbiota of yaks grazing on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 620-634

摘要: 【背景】肠道菌群与宿主健康及环境适应性密切相关, 牦牛为青藏高原特有的草食性反刍动物, 不同海拔高度如何影响牦牛肠道菌群组成及肠道菌群在牦牛适应高海拔生境中的作用尚不清楚。【目的】探究青藏高原放牧牦牛肠道菌群多样性及其与海拔高度间的关系。【方法】采集青海省玛沁县(海拔 4 220 m)和乐都县(2 745 m) 2 个海拔高度放牧牦牛的 22 份新鲜粪便样品, 然后利用 16S rRNA 基因通用引物扩增 V3-V4 区并进行高通量测序和分析。【结果】从 22 份样品中共获得 1 723 018 条有效序列, 通过聚类共获得 1 113 个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 注释到 22 个门和 263 个属。在门和属分类水平上, 2 组样品中的优势菌为厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、瘤胃菌科 UCG-005 菌属(*Ruminococcaceae*_UCG-005)和理研菌科 RC9 菌属(*Rikenellaceae*_RC9_gut_group), 但是其相对丰度在 2 组样品中差异显著。随着海拔升高, 厚壁菌门和瘤胃菌科 UCG-005 菌属相对丰度显著提高, 而拟杆菌门和理研菌科 RC9 菌属的相对丰度显著降低。对不同样品菌群组成和差异分析表明, 放牧牦牛的肠道微生物群落组成受不同海拔环境的影响较大。此外, 通过 PICRUST2 功能预测分析表明, 随着海拔升高, 能量代谢、辅因子代谢、维生素代谢、核苷酸代谢、多糖代谢和氨基酸代谢等相关代谢通路显著富集, 这可能与牦牛通过提高牧草利用效率并获取更多能量以适应极端高海拔环境有关。【结论】不同海拔环境放牧牦牛的肠道菌群组成具有明显的差异, 并且肠道菌群对于牦牛适应高海拔生境具有重要功能。

关键词: 牦牛; 肠道微生物多样性; 16S rRNA 基因高通量测序; 海拔; 环境适应性

基金项目: 国家自然科学基金(31960642, 81760633)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31960642, 81760633)

*Corresponding author: E-mail: benyinzhang@qhu.edu.cn

Received: 2021-08-17; Accepted: 2021-09-13; Published online: 2021-10-26

Effect of altitude on the diversity of gut microbiota of yaks grazing on the Qinghai-Tibet Plateau

MA Yan¹, XIANG Xin¹, FAN Jiakai¹, ZHANG Benyin^{*1,2}

1 College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] Gut microbiota is closely related to the health and environmental adaptability of the host. Yak (*Bos grunniens*) is a herbivorous ruminant unique to the Qinghai-Tibet Plateau. The effect of altitude on the gut microbiota structure of yaks and the roles of gut microbiota in the adaption of yaks to high altitude, however, are still largely elusive. [Objective] This paper aims to explore the diversity of gut microbiota of yaks grazing on the Qinghai-Tibet Plateau and the relationship with altitude. [Methods] A total of 22 fresh fecal samples were collected from yaks in Maqin (altitude: 4 220 m) and Ledu (altitude: 2 745 m) of Qinghai, and the V3–V4 region of 16S rRNA gene was amplified with universal primers and then subjected to high-throughput sequencing and analysis. [Results] A total of 1 723 018 valid reads were obtained from the 22 samples, which were clustered into 1 113 operational taxonomic units (OTUs) based on 97% similarity. The OTUs belonged to 263 genera and 22 phyla. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Ruminococcaceae*_UCG-005, and *Rikenellaceae*_RC9_gut_group dominated the samples from the two regions, despite the significant difference in abundance. As the altitude elevated, the abundance of *Firmicutes* and *Ruminococcaceae*_UCG-005 significantly increased, while that of *Bacteroidetes* and *Rikenellaceae*_RC9_gut_group significantly decreased. As for the structure and difference of gut microbiota, gut microbiota structure of yaks was dramatically affected by altitude. In addition, PICRUSt2 analysis revealed that related metabolic pathways in gut microbiota such as energy metabolism, cofactor and vitamin metabolism, nucleotide metabolism, and glycan and amino acid metabolism were significantly enriched in yaks grazing at the higher altitude, in part because yaks improved forage utilization efficiency and harvested more energy to adapt to the extreme environment at higher altitude. [Conclusion] The gut microbiota structure of yak grazing at different altitudes was obviously different, and gut microbiota was proposed to play an essential role in the adaption of yaks to the environment at high altitude.

Keywords: yak; diversity of gut microbiota; 16S rRNA gene high-throughput sequencing; altitude; environmental adaptability

肠道菌群与宿主健康及环境适应性密切相关^[1], 其在宿主食物消化、能量代谢、营养稳态、免疫调节、信号传导及生长发育等多种生理活动中起着重要作用^[2]。除此之外, 宿主生活环境极大影响了肠道菌群的多样性, 反之, 肠道菌群在宿主适应生活环境中也同样具有重要的功能。比如, 通过 16S rRNA 基因高通量测序

技术研究青藏高原藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)、西藏野驴(*Equus kiang*)和藏羊(*Ovis aries*)的肠道微生物组成和多样性, 发现高海拔草食动物的肠道微生物组成和功能具有相似性, 并且其肠道菌群参与了高海拔环境的适应^[3]; 对于喜马拉雅塔尔羊(*Hemitragus jemlahicus*)、岩羊(*Pseudois nayaur*)和欧洲盘羊(*Ovis musimon*)的肠道微生物

物多样性研究表明,即使在相同海拔相同饲养条件下,3种羊亚科动物的肠道微生物群落结构存在显著差异^[4];此外,不同海拔的藏猪粪便样本 16S rRNA 基因分析结果表明,高、低海拔条件下相同物种之间的细菌多样性和组成存在显著差异^[5]。这些研究结果证实肠道菌群存在物种特异性,并且独特的肠道菌群及其功能可能与高海拔条件下的环境宿主适应密切相关。

牦牛(*Bos grunniens*)为高寒地区特有的草食性反刍动物,大多数生活于海拔 3 000 m 以上的青藏高原^[6],能够很好地适应低温、低氧、强紫外线和食物资源匮乏的高海拔环境^[7]。恶劣的高原环境可能会对肠道菌群造成巨大的进化压力,从而影响其多样性和群落组成^[8],并且生境、饮食、季节、年龄等因素都会影响牦牛的肠道菌群^[9-12]。Nie 等^[12]对 3 组年龄段的牦牛结肠内容物的研究表明,在牦牛生长过程中厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)、柔壁菌门(*Tenericutes*)和蓝藻细菌(*Cyanobacteria*)变化较大。不同饲养方式对青藏高原牦牛肠道微生物群落也有影响,当牦牛饲养方式从常年放牧转向暖季放牧(低营养)和冷季饲养场饲养(高营养)后,牦牛肠道微生物群落结构发生了显著变化^[10]。此外,研究发现牦牛瘤胃的不同组织部位的微生物群落结构也存在明显差异^[13]。但是,不同海拔高度对牦牛肠道菌群的影响及肠道菌群如何影响牦牛的高海拔生境适应性尚不清楚。

最新关于牦牛肠道菌群的研究主要集中于瘤胃组织^[14-16],而其粪便菌群的研究则很少受到关注。瘤胃内容物和新鲜粪便体外发酵试验表明,各种饲料消化率与饲料在牦牛体内的消化率都呈正相关,说明粪便菌群一定程度上能够替代瘤胃菌群解析肠道菌群在动物食物消化和环境适应中的功能^[17]。另外,通过胃管采集、

瘤胃穿刺、安装瘤胃瘘管等采集瘤胃内容物的方法,对于全放牧牦牛会造成一定的生理伤害^[18],然而采集新鲜粪便则能够避免这一缺陷。本研究利用 16S rRNA 基因高通量测序技术揭示了高、低海拔全放牧牦牛粪便的微生物群落结构和组成差异,并根据肠道菌群基因预测了其参与的代谢通路及其潜在功能,为研究牦牛肠道菌群与环境适应性之间的关系提供了依据,也为进一步开发青藏高原的益生菌资源奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集信息

选取生活在青海省玛沁县(34°47'74.6"N, 100°23'90.1"E, 海拔 4 220 m)和青海省乐都县(36°17'42.01"N, 102°22'00.5"E, 海拔 2 745 m)的全放牧牦牛作为粪便采集对象,根据采集地点分组为高海拔组(HA)和低海拔组(LA),分别于 2020 年 8 月 13 日和 2020 年 8 月 20 日早上 9-11 点采集。采样对象为 3 岁左右健康牦牛,牦牛体重为 200-220 kg,其中 HA 组公、母牦牛粪便样品分别是 4 份和 8 份,LA 组公、母牦牛粪便样品分别是 3 份和 7 份,共 22 份粪便样品。采样前 6 个月牦牛未服用或注射抗生素,无肠道疾病史,新鲜粪便应干燥、成型、色泽正常。在目标动物排便后,随即采集新鲜样品于 50 mL 无菌离心管中,盖口后用封口膜密封,避免样品间的交叉污染,标记后置于液氮中,回到实验室后转存于-80 °C 中,以上过程均严格无菌操作。

1.2 主要试剂和仪器

KOD FX Neo 酶,上海东洋纺管理有限公司;NucleoSpin DNA 提取试剂盒,Machery-Nagel 公司;PCR 引物,苏州泓迅生物科技有限公司。微型离心机,北京天根生化科技有限公司;振荡器,SI 公司;96 well PCR 仪,ABI

公司; 核酸测定仪、24 孔离心机, Eppendorf 公司; 真空泵, 杭州米欧仪器有限公司; 酶标仪, 中国香港基因有限公司。

1.3 总 DNA 提取和 PCR 扩增

按照试剂盒使用说明, 采用 NucleoSpin DNA 提取试剂盒提取牦牛粪便细菌总 DNA。细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区 PCR 扩增引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR 反应体系(10 μ L): 2 \times KOD FX Neo 缓冲液 5 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.3 μ L, KOD FX Neo 酶(1 U/ μ L) 0.2 μ L, DNA 模板(50 ng/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 2 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 25 次循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。首先对目标区域进行 PCR 扩增及纯化后, 再进行 Solexa PCR 扩增纯化, 纯化产物进行 NanoDrop 定量及混样(质量比为 1:1), 经 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳切胶回收目的片段, 构建好的文库经过质量控制, 采用 Illumina HiSeq 2500 平台进行高通量测序, 测序原始数据已上传 NCBI SRA 数据库(收录号为 PRJNA751737)。

1.4 数据处理与分析

使用 USEARCH V10 软件^[19]对原始数据进行质控, 得到最终的有效序列; 采用 RDP classifier 算法对 97.0% 相似水平的操作分类单元代表序列进行分类分析^[20], 并在门和属水平进行相对丰度分析。使用 mothur^[21] (V1.30) 进行 α 和 β 多样性分析及对测序深度的检测, α 多样性分析研究每个牦牛粪便样品的物种多样性, 并对每个样品的 ACE、Chao1、Shannon 及 PD_whole_trees 指数进行统计, 绘制了样品稀释曲线^[22]; β 多样性分析比较不同组间的群落组成及结构差异。根据距离矩阵获得相应距离下的样品 PCoA 分析、热图聚类及 PERMANOVA

分析; 然后通过组间差异 LEfSe 分析^[23]寻找不同组间差异显著的物种; 最后利用 PICRUST2^[24] 软件进行功能预测分析, 找出肠道微生物所参与的 KEGG 代谢通路。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量评估

通过对 2 个不同海拔高度(HA 组和 LA 组) 全放牧牦牛粪便 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区的高通量测序, 从 22 个样品中共获得 1 760 633 条 raw read。过滤低质量的序列后获得 1 723 018 条有效序列(effective read), 每条有效序列平均长度为 412 bp。使用 USEARCH 软件对有效序列在 97.0% 的一致性条件下进行聚类, 共获得 1 113 个 OTU, 平均每个样品 994 个 OTU。物种稀疏曲线表明, 随着测序深度的增加, 稀释曲线逐渐趋于平缓(图 1), 测序数据深度足以反映每个样本中的微生物群落信息。

通过 ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 等 α 多样性指数评估了肠道菌群多样性和丰度,

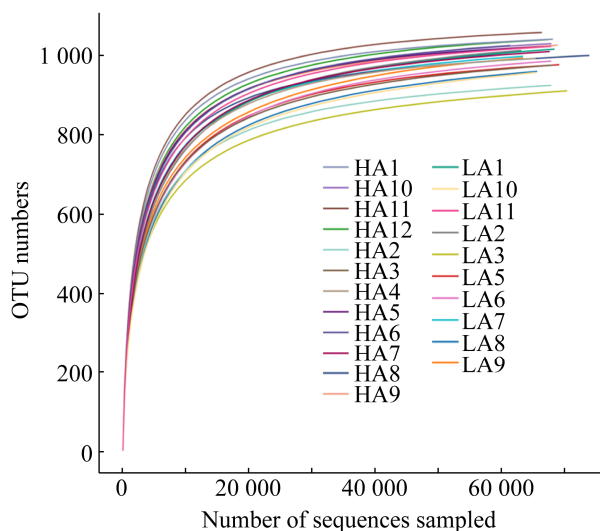


图 1 22 份样品的稀疏曲线

Figure 1 Sparse curves of 22 samples. HA: High altitude; LA: Low altitude.

从图 2 中可以看出, 高海拔样品的 α 多样性指数均高于低海拔样品, 并且 HA 组的 Shannon 指数相较于 LA 组具有显著性差异($P < 0.05$), 表明高海拔牦牛肠道菌群具有更高的多样性和丰度。

2.2 高、低海拔放牧牦牛肠道菌群的组成和差异分析

以 SILVA 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器对特征序列进行分类学注释, 从 22 份牦牛粪便样品共注释到 22 个门 62 个纲 107 个目 245 个科 263 个属。在门水平上(图 3A), 高、低海拔放牧牦牛(HA 组和 LA 组)肠道菌群中丰度排名前 10 的菌门分别是厚壁菌门(*Firmicutes*, HA: 69.96%, LA: 62.43%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*, HA: 22.25%, LA: 27.66%)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*, HA: 2.30%, LA: 4.58%)、柔壁菌门(*Tenericutes*, HA: 2.04%, LA: 1.16%)、变形菌门(*Proteobacteria*, HA: 1.42%, LA: 1.46%)、蓝藻细菌(*Cyanobacteria*, HA: 0.76%, LA: 1.18%)、*Patescibacteria* (HA: 0.54%, LA: 0.74%)、放线菌门(*Actinobacteria*, HA: 0.39%, LA: 0.33%)、螺旋体门(*Spirochaetes*, HA: 0.16%, LA: 0.08%)和 *Kiritimatiellaeota* (HA: 0.04%, LA: 0.09%)。从图 3A 可以看出, 2 个海拔高度的牦牛肠道中优势菌群主要是厚

壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 并且高海拔样品中 2 种菌门的丰度(92.16%)稍高于低海拔样品(90.03%)。此外, 通过高、低海拔放牧牦牛肠道微生物相对丰度的差异分析(图 3B), 发现具有显著差异的菌门有厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、柔壁菌门(*Tenericutes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和螺旋体门(*Spirochaetes*), 其中, 厚壁菌门(*Firmicutes*)、柔壁菌门(*Tenericutes*)及螺旋体门(*Spirochaetes*)在高海拔放牧牦牛肠道菌群中显著高于低海拔放牧牦牛($P < 0.01$), 然而拟杆菌门(*Bacteroidetes*) ($P < 0.01$)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*) ($P < 0.05$)呈现相反趋势, 其相对丰度在低海拔放牧牦牛中较高。

在属水平上(图 4A), 发现瘤胃菌科 UCG-005 菌属(*Ruminococcaceae*_UCG-005, HA: 21.39%, LA: 19.64%)和理研菌科_RC9 菌属(*Rikenellaceae*_RC9_gut_group, HA: 64.26%, LA: 78.15%)是牦牛肠道菌群中的优势物种, 除了优势菌属之外, 其他丰度较高的属有 uncultured_bacterium_f_*Ruminococcaceae* (HA: 5.83%, LA: 5.3%), 瘤胃菌科 UCG-013 菌属(*Ruminococcaceae*_UCG-013, HA: 5.3%, LA: 5.3%), 产粪甾醇真细菌(*Eubacterium_coprostanoligenes*_group, HA: 5.2%, LA: 5.24%), 克里斯滕森

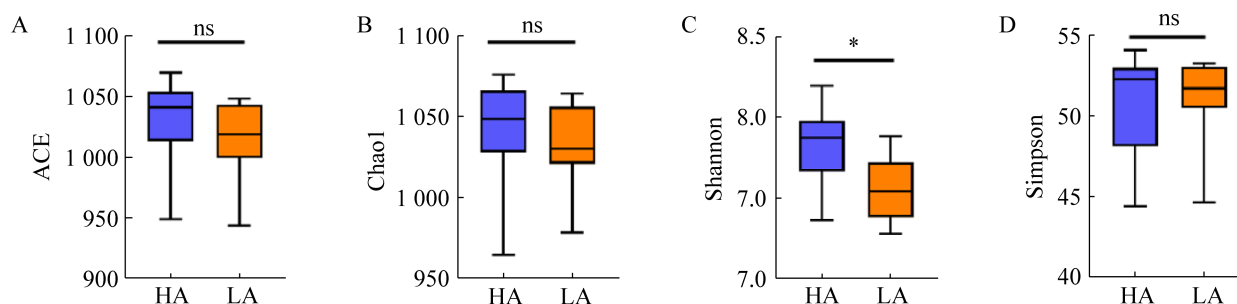


图 2 高、低海拔牦牛肠道微生物群落多样性指数

Figure 2 Diversity indices of gut microbiota of yaks grazing at high and low altitudes. HA: High altitude; LA: Low altitude; *: $P < 0.05$; ns: The difference level is not significant.

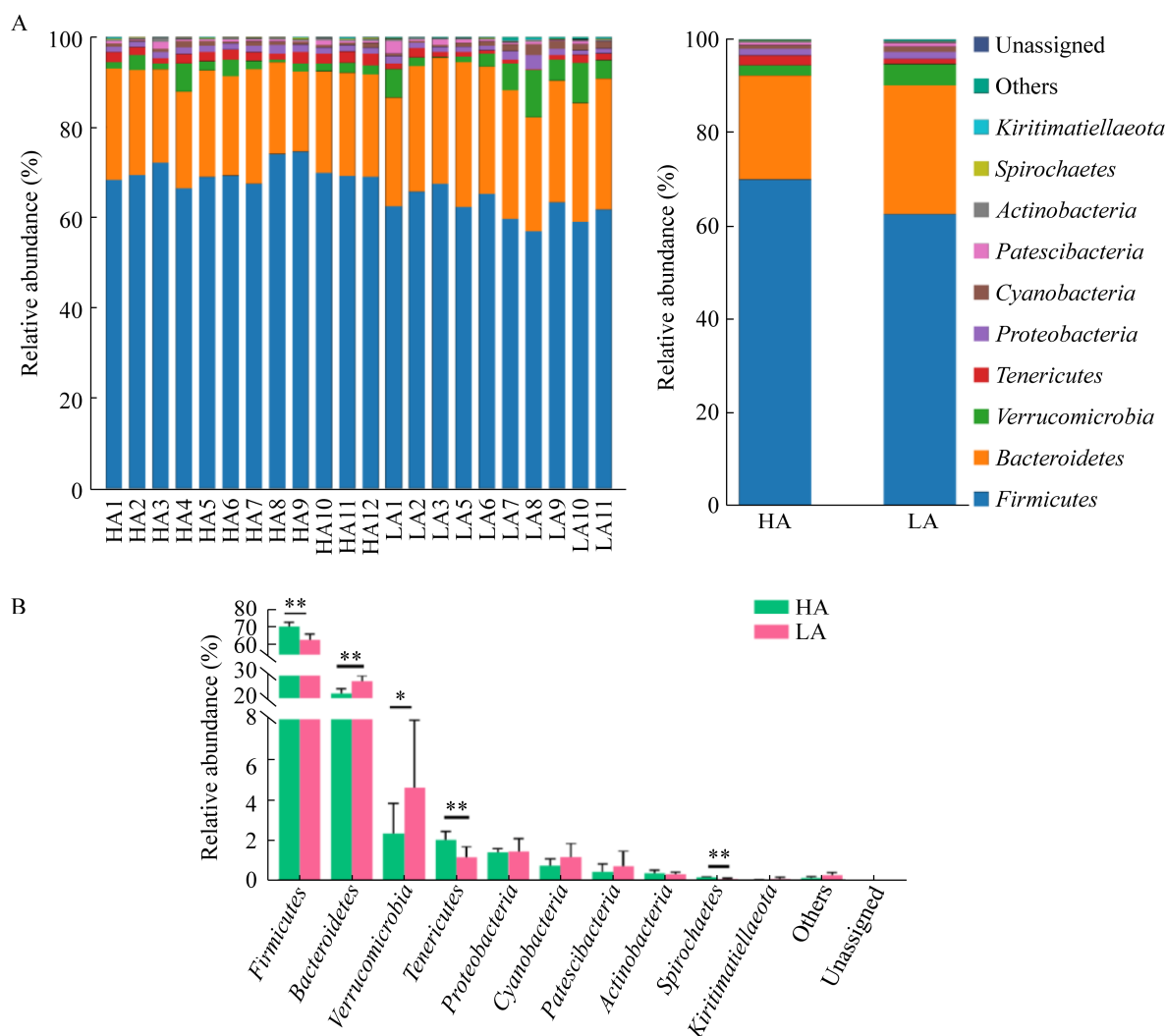


图 3 不同海拔放牧牦牛肠道菌群门水平相对丰度(A)及优势菌差异性分析(B)

Figure 3 The relative abundance at the phylum level (A) and difference analysis (B) of gut microbiota of yaks grazing at high and low altitudes. HA: High altitude; LA: Low altitude. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

氏菌科 R-7 菌属(*Christensenellaceae_R-7_group*, HA: 5.07%, LA: 3.96%), 瘤胃菌科 UCG-010 菌属(*Ruminococcaceae_UCG-010*, HA: 4.87%, LA: 3.68%), 普雷沃氏菌科 UCG-004 菌属(*Prevotellaceae_UCG-004*, HA: 3.72%, LA: 4.39%), 艾克曼菌属(*Akkermansia*, HA: 2.29%, LA: 4.58%), *uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae* (HA: 3.45%, LA: 3.24%)。牦牛肠道菌群在属水平前 10 的优势菌属中(图 4B), HA 组相比

LA 组具有显著性差异的菌属有瘤胃菌科 UCG-010 菌属(*Ruminococcaceae_UCG-010*) ($P<0.01$)和克里斯滕森氏菌科 R-7 菌属(*Christensenellaceae_R-7_group*) ($P<0.05$), 但是 LA 组的普雷沃氏科 UCG-004 菌属(*Prevotellaceae_UCG-004*) ($P<0.01$)、理研菌科 RC9 菌属(*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)和艾克曼菌属(*Akkermansia*)显著性高于 HA 组 ($P<0.05$)。

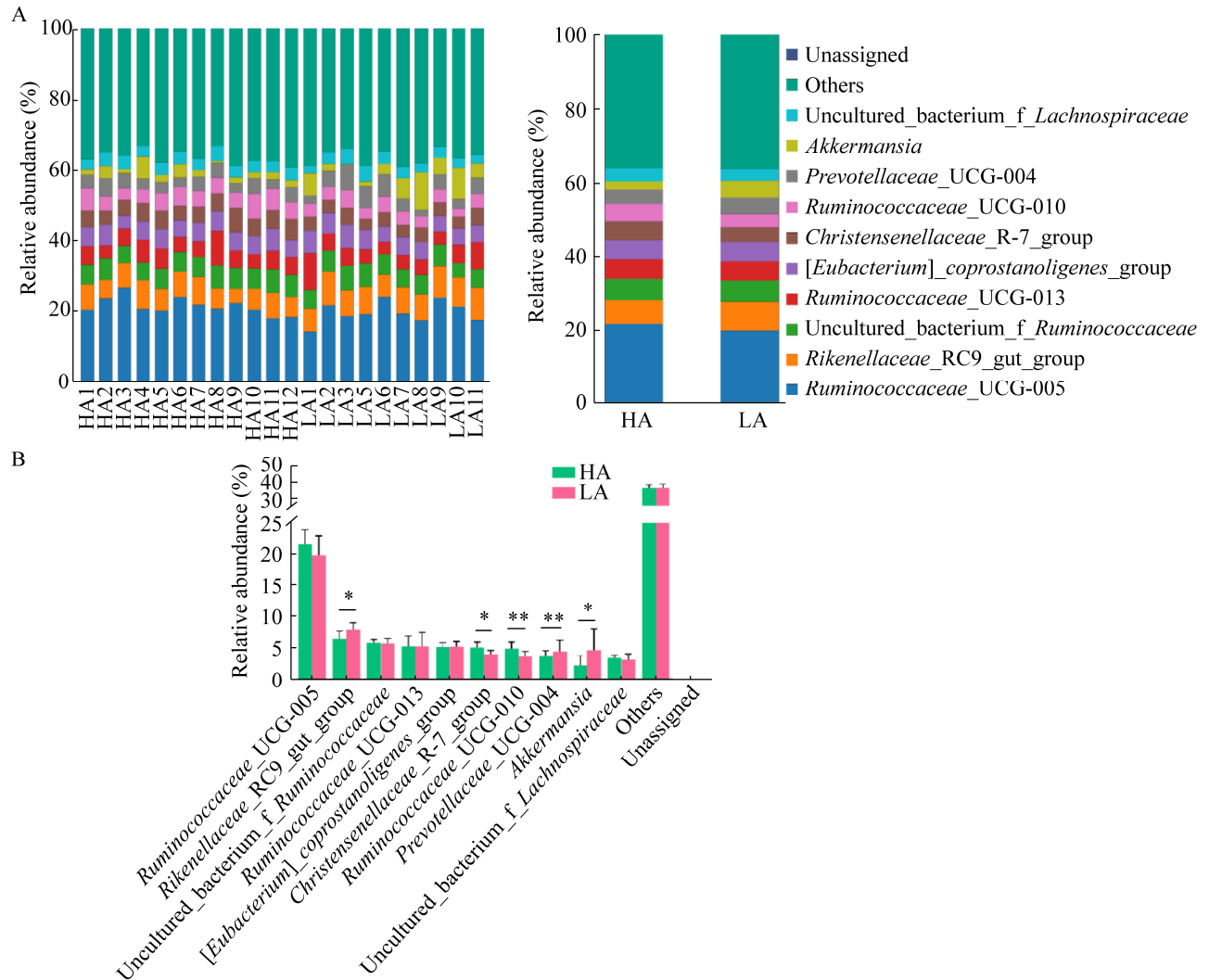


图 4 牦牛肠道菌群属水平相对丰度(A)和优势菌差异分析(B)

Figure 4 The relative abundance at the genus level (A) and difference analysis (B) of gut microbiota of yaks grazing at high and low altitudes. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

此外,我们还进行了LEfSe [line discriminant analysis (LDA) effect size]分析,以检测细菌分类群组成的变化及鉴定相对丰度存在显著差异的分类群(生物标记物)。LEfSe 分析结果表明(图 5),高、低海拔放牧牦牛肠道菌群中差异显著的分类群主要属于厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)。根据 LDA 分值 >4.0 ,在 HA 组鉴定了 6 种丰度差异显著的分类群,即瘤

胃菌科 UCG-014 菌属(*Ruminococcaceae*_UCG-014)、uncultured_bacterium_g_*Ruminococcaceae*_UCG-014、瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、梭菌目(*Clostridiales*)、梭菌属(*Clostridia*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。在 LA 组鉴定了 4 种丰度差异显著的分类群,即拟杆菌纲(*Bacteroidia*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、拟杆菌目(*Bacteroidales*)和理研菌科(*Rikenellaceae*)。

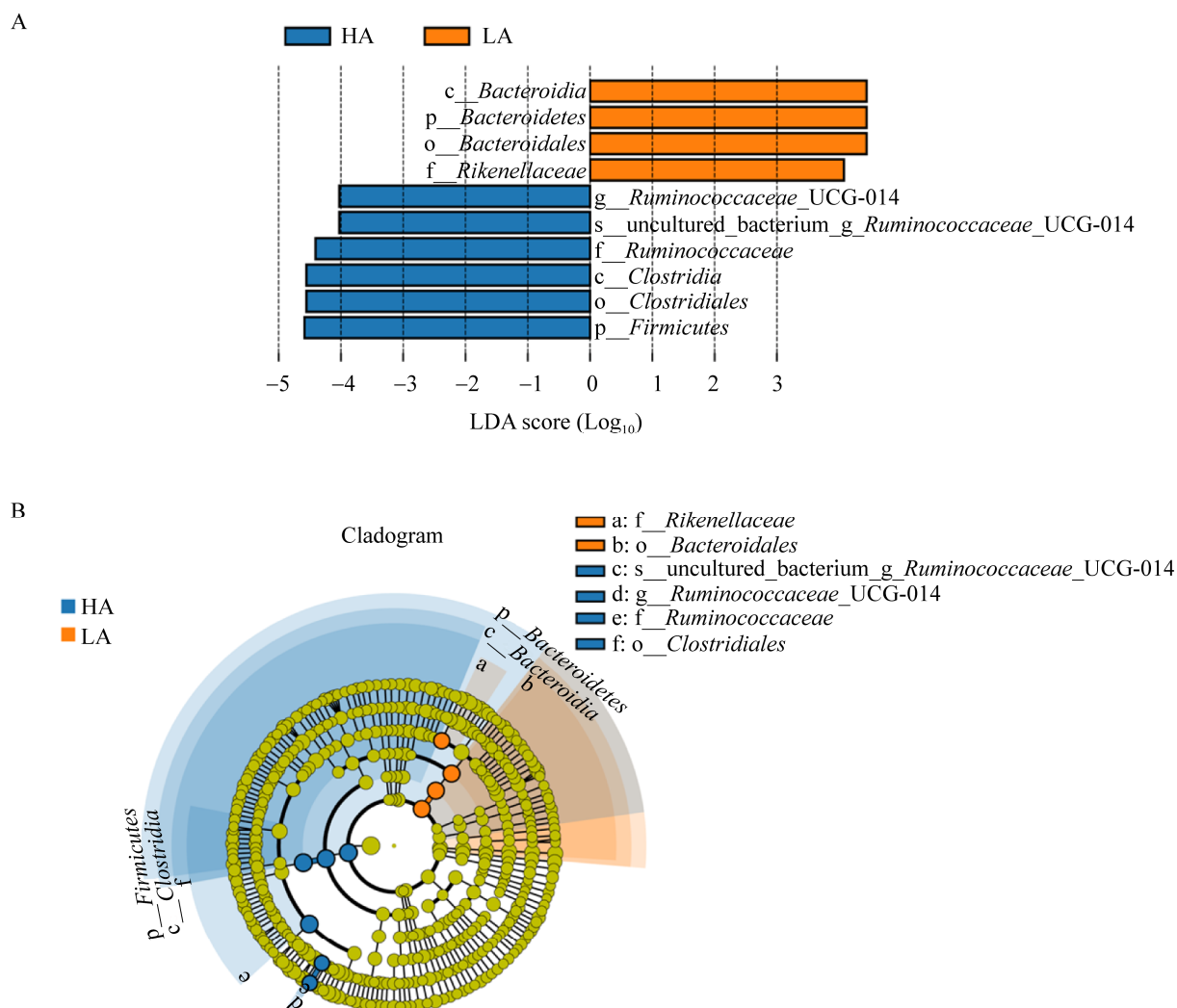


图 5 高、低海拔放牧牦牛肠道菌群 LefSe 分析(A)和进化分支图(B)

Figure 5 LefSe analysis of intestinal flora of yak grazing at high and low altitude (A) and evolutionary clade (B). HA: High altitude; LA: Low altitude.

2.3 高、低海拔放牧牦牛肠道菌群 β 多样性分析

PCoA 分析中 PC1 和 PC2 这 2 个主坐标成分的贡献值分别为 12.206 5%和 13.642 9% (图 6A), 高、低海拔样品(HA 和 LA)能够明显区分, 并且每组样品较为聚集, 表明所采集的每组样品重复性较好。此外, 基于 weighted 距离算法得到样品间的距离矩阵并绘制了样品聚类热图(图 6B), 由图 6 可以看出, 2 组样品发生了明显聚类, 而且 2 组样品因海拔高度不同而区分明显。以

上数据表明, 高、低海拔放牧牦牛的肠道菌群组成差异较大, 而这可能是由于不同海拔高度环境所引起的。由于 PCoA 和 heatmap 聚类热图分析无法反映出不同分组样品间是否存在显著差异, 本研究采用置换多元方差分析(PERMANOVA)方法继续检验了不同分组样品间 β 多样性的差异显著性(图 6C), 结果表明高、低海拔放牧牦牛肠道微生物群落 β 多样性具有显著性差异($R^2=0.331$, $P=0.001$), 说明牦牛肠道微生物群落因海拔高度不同而存在差异。

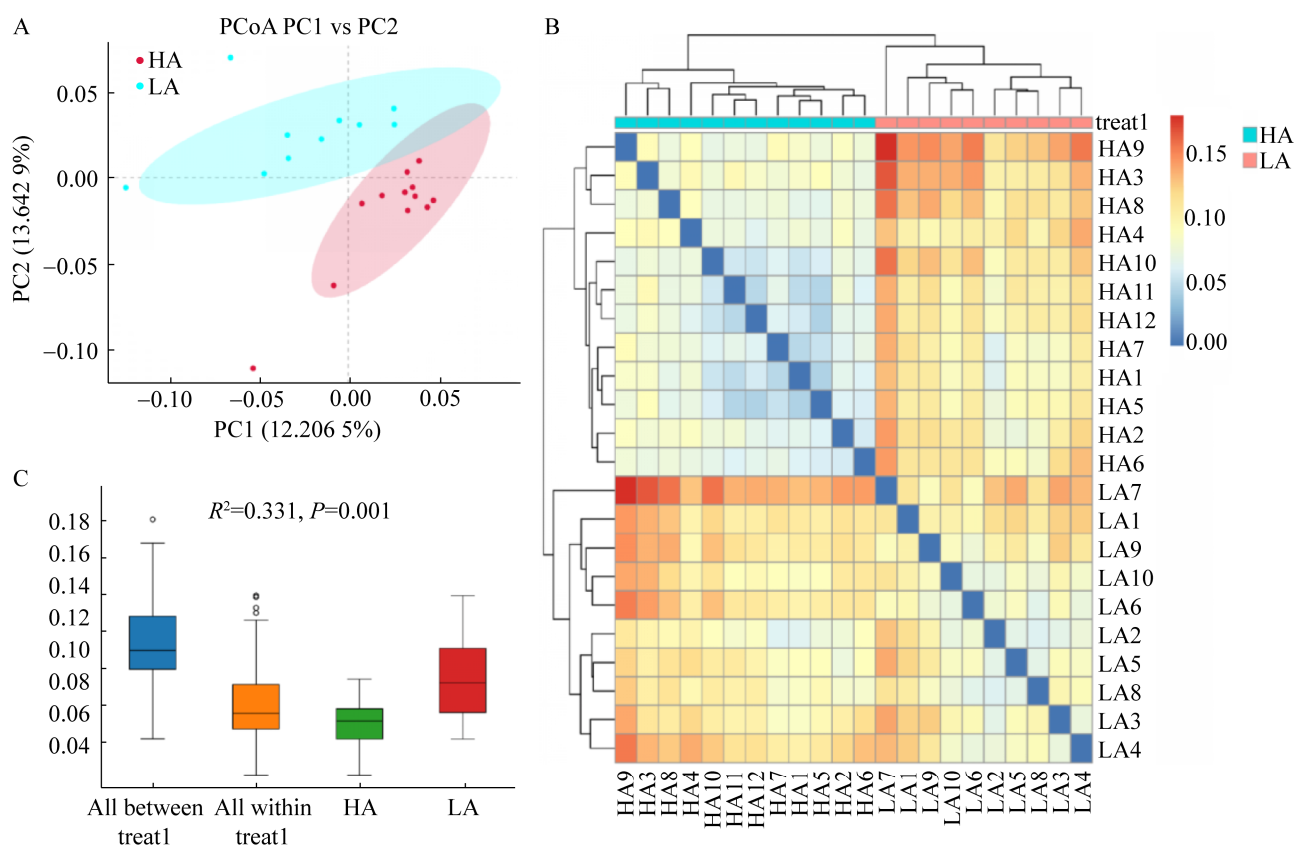


图6 高低海拔放牧牦牛肠道菌群 PCoA (A)、聚类热图(B)和 PERMANOVA (C)分析

Figure 6 Analysis of PCoA (A), cluster heatmap (B) and PERMANOVA (C) of intestinal microflora of yaks grazing at high and low altitudes. HA: High altitude; LA: Low altitude. All between: The beta distance data of all samples between groups; All within: The beta distance data of all samples within the group.

2.4 KEGG 功能预测

通过 KEGG 通路功能预测(图 7), 分析了 2 组之间肠道菌群在功能上的差异。在 KEGG 代谢通路二级水平上, 不同海拔放牧牦牛肠道菌群的功能存在显著差异, 如细胞群落-原核生物 (cellular community-prokaryotes)、细胞运动(cell motility)、膜转运(membrane transport)、信号传导(signal transduction)、在遗传信息过程中富集翻译(translation)、复制和修复(replication and repair)、辅助因子和维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)、能量代谢(energy metabolism)、其他次生代谢产物的生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites)、多

糖生物合成和代谢(glycan biosynthesis and metabolism)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、其他氨基酸的代谢(metabolism of other amino acids)、环境适应(environmental adaptation)等, 推测这些生物过程与牦牛肠道菌群对海拔高度的响应有关, 在宿主适应高海拔环境中具有重要功能。

3 讨论与结论

肠道菌群多样性往往受到宿主周围环境的影响, 同时肠道微生物组成和功能也与宿主对恶劣生活环境的适应相关^[3]。较高的微生物多样性与宿主的代谢能力和稳定性密切相关^[25],

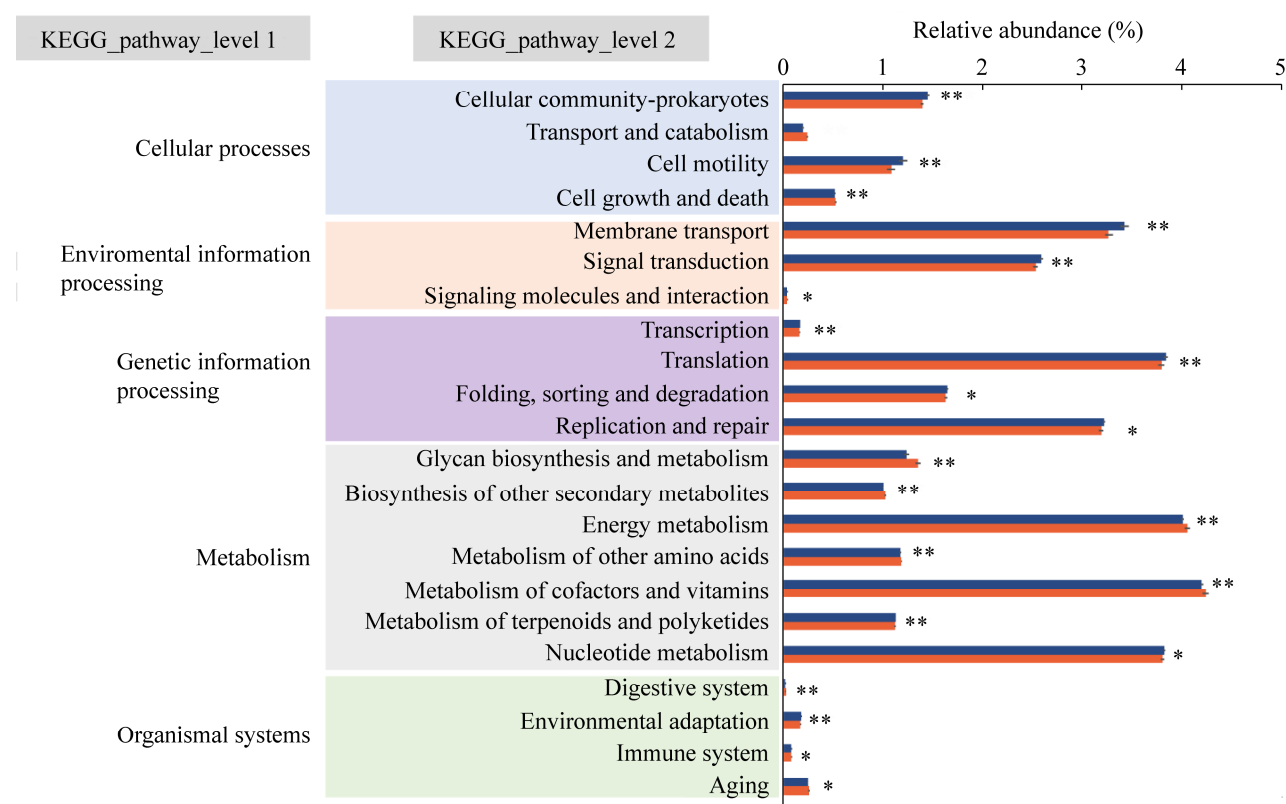


图 7 KEGG 代谢通路富集分析

Figure 7 Enrichment analysis of KEGG metabolic pathways. Blue: High altitude; Orange: Low altitude, * and ** indicate difference level at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

人体肠道菌群多样性能够提高膳食纤维发酵效率, 促进肠道生态系统稳定, 进而维持宿主健康^[26]。适应寒冷和低氧的极端环境对青藏高原的动物来说是一项挑战, 与低海拔动物相比, 高海拔藏区的马、羊、猪等动物代谢速度更快, 消耗更多的氧气和能量来维持正常生存^[27-29]。在进化过程中, 宿主及其肠道微生物已经进化出了独特的适应高海拔环境的生理机制, 海拔变化影响了肠道微生态, 并进一步影响哺乳动物肠道菌群的结构和功能^[30]。Fan 等^[31]发现, 牦牛瘤胃微生物多样性随海拔升高而增加, 这与高海拔牦牛瘤胃菌群可能具有更高效利用高纤维牧草获取能力以抵御不利环境条件有关。此外, 牦牛 4 个胃部位中的微生物多样性也具有显著差

异, 说明菌群多样性存在组织特异性^[13]。海拔高度对牦牛肠道微生物多样性的影响, 以及肠道微生物在牦牛适应高寒环境中的生态功能尚不清楚。本研究利用 16S rRNA 基因高通量测序技术对高、低海拔的全放牧牦牛粪便样品中的微生物多样性进行了研究, 发现高海拔放牧牦牛的肠道菌群多样性高于低海拔放牧牦牛 (Shannon 指数较高), 并且不同海拔的样品之间的菌群结构存在明显的差异, 说明海拔的升高导致牦牛肠道微生物多样性发生了明显变化。

本研究中发现厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)在 2 个海拔高度的放牧牦牛肠道菌群中占据主导地位, 这个结果与其他高原动物如藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)、藏

野驴(*Equus kiang*)、鼠兔(*Ochotona curzoniae*)等肠道和牦牛瘤胃菌群组成类似^[3,32-33],表明这2种菌门在高原动物适应极端生境中具有重要功能。Nie等^[12]研究表明,野牦牛肠道菌群结构以厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为主,拟杆菌(*Bacteroides*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)和黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)等肠道微生物对牦牛的能量代谢和氨基酸的合成起重要作用。Li等^[25]研究高原鼠兔肠道菌群发现,随着海拔的升高,肠道菌群的 α 、 β 多样性和功能多样性显著增加,并且体内富含一些潜在的益生菌可以提高代谢能力以维持宿主健康。Liu等^[9]研究表明疣微菌门(*Verrucomicrobia*)丰度较低与纤维摄入量增加相关,并且瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)相对丰度较高与纤维素消化有关。

在门水平上,虽然高海拔地区和低海拔地区厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的总丰度差异不大,但是与低海拔地区相比,高海拔地区的厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度更高(69.96% vs. 62.43%),拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度较低(22.25% vs. 27.66%)。在本研究中,高海拔牦牛肠道菌群的能量代谢和物质分解相关能力更强,而厚壁菌门(*Firmicutes*)物种含有与能量代谢和分解纤维、纤维素等物质相关的基因^[34],拟杆菌门(*Bacteroidetes*)物种具有降解蛋白质和碳水化合物的生物功能^[35-36],说明牦牛肠道菌群的这些能力与其宿主的高海拔适应有关。此外,我们发现高海拔放牧牦牛肠道菌群中厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的丰度比值(F:B)远高于低海拔放牧牦牛,而高比值的F:B对于动物通过肠道微生物介导的能量吸收,进而维持低温环境下的代谢平衡具有重要作用,这一现象在其他动

物如恒河猴(*Macaca mulatta*)^[37]、高原牦牛(*Bos grunniens*)^[38]、西藏猕猴(*Macaca thibetana*)^[39]中也存在。

在属水平上,瘤胃菌科 UCG-005 菌属(*Ruminococcaceae*_UCG-005)在2个海拔放牧的牦牛肠道菌群中的相对丰度最大,但是无显著性差异。*Ruminococcaceae*_UCG-005参与动物体内纤维素降解和淀粉消化过程^[40],推测该物种在牦牛基础代谢中发挥重要功能。*Ruminococcaceae*_UCG-010 ($P<0.01$)、*Ruminococcaceae*_UCG-014 ($P<0.01$)在高海拔牦牛中的相对丰度显著高于低海拔牦牛,而*Ruminococcaceae*_UCG-014能够改善瘤胃中的糖代谢^[41],说明瘤胃菌属可能也参与了牦牛适应高海拔极端生境的生物过程,如低氧耐受性和高能量代谢。益生菌 *Rikenellaceae*_RC9_gut_group 和 *Akkermansia* 在高海拔牦牛中的相对丰度明显低于低海拔牦牛($P<0.05$)。*Rikenellaceae*被认为是肥胖人群中的肠道微生物标记物^[42],并且在高脂小鼠模型中该菌属的丰度也得到显著提高^[43-44];然而 *Akkermansia* 是一种耐氧型黏蛋白降解菌,属于 *Verrucomicrobia* 的典型代表,与宿主肠道健康和代谢有关,在预防宿主代谢疾病如肥胖、脂肪肝和2型糖尿病中具有重要作用^[45-47]。高海拔牦牛中2种菌属丰度的降低可能会导致高海拔放牧牦牛发生代谢疾病的风险更大。*Christensenellaceae* 家族成员能够分泌3种糖苷酶,促进牧草饲料中纤维素和半纤维素的分解,提高饲料的利用效能^[48],而本结果中高海拔牦牛克里斯滕森氏菌科 R-7 菌属(*Christensenellaceae*_R-7_group) ($P<0.05$)的相对丰度显著提高,提高了高海拔牦牛降解牧草纤维素并从难消化的多糖中获取能量的能力,以适应高海拔更加寒冷和更低氧含量的极端生存环境。

肠道微生物代谢产物在维持其宿主生理和代谢稳态中起重要作用^[49], 肠道微生物间接影响宿主能量摄入效率, 从而影响宿主的高海拔适应性^[30,50-52], 如高海拔地区的羊肠道微生物群具有较强的能量代谢和纤维素分解能力, 有很好的高原适应性^[40]。牦牛瘤胃细菌功能预测表明, 牦牛比黄牛拥有更高的能量储存、脂质代谢、聚糖合成和代谢基因家族, 这些基因家族的差异可能会帮助牦牛提高能量效率^[11]。本研究通过 PICRUSt2 基因功能预测发现, 牦牛肠道菌群的基因功能显著受到海拔高度的影响。在 KEGG 代谢通路二级水平上, 高海拔放牧牦牛肠道菌群基因参与了代谢相关通路如能量代谢、辅因子代谢、维生素代谢、核苷酸代谢、多糖代谢和氨基酸代谢等, 而这些代谢过程帮助牦牛提高高纤维牧草利用效率并获取更多能量以适应低温、低氧的高海拔环境。此外, 在高海拔牦牛肠道菌群中膜转运、复制和修复代谢通路也显著富集, 一方面可能由于转运蛋白直接参与 ATP 的产生而提供能量, 并且保护宿主免受有毒物质入侵; 另一方面在高海拔环境中, 低氧和强紫外线辐射可能导致 DNA 和蛋白质损伤, 与复制和修复相关的基因可能有助于减少对生物分子的损伤^[53], 因此, 这些途径也有助于牦牛适应更加恶劣的高海拔环境。

综上所述, 青藏高原不同海拔的放牧牦牛肠道菌群多样性具有显著差异, 肠道菌群的功能性细菌和代谢产物对牦牛适应高海拔生境发挥了一定的作用。本研究从肠道菌群的角度揭示了其与牦牛适应高海拔环境的相关性, 并为从牦牛肠道细菌中挖掘益生菌资源奠定了理论依据, 但其适应性机制和益生菌挖掘有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine[J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915-1920
- [2] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 837-848
- [3] Ma Y, Ma S, Chang L, Wang HJ, Ga Q, Ma L, Bai ZZ, Shen YY, Ge RL. Gut microbiota adaptation to high altitude in indigenous animals[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 516(1): 120-126
- [4] 孙国雷. 基于 16S rRNA 基因的喜马拉雅塔尔羊、岩羊和欧洲盘羊的肠道微生态研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学硕士学位论文, 2017
Sun GL. Study on the gut microbiota of Himalayan thar, Mouflon and Bharal based on 16S rRNA gene sequencing[D]. Qufu: Master's Thesis of Qufu Normal University, 2017 (in Chinese)
- [5] Zeng B, Zhang SY, Xu HL, Kong FL, Yu XQ, Wang P, Yang MY, Li DY, Zhang MW, Ni QY, et al. Gut microbiota of Tibetans and Tibetan pigs varies between high and low altitude environments[J]. *Microbiological Research*, 2020, 235: 126447
- [6] 黄彩霞, 高媛, 孙宝忠, 卢凌. 牦牛品种品质研究进展[J]. *肉类研究*, 2012, 26(9): 30-34
Huang CX, Gao Y, Sun BZ, Lu L. Research progress in meat quality of different yak breeds[J]. *Meat Research*, 2012, 26(9): 30-34 (in Chinese)
- [7] Huang XD, Tan HY, Long RJ, Liang JB, Wright ADG. Comparison of methanogen diversity of yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12(1): 237
- [8] Guo N, Wu QF, Shi FY, Niu JH, Zhang T, Degen AA, Fang QG, Ding LM, Shang ZH, Zhang ZG, et al. Seasonal dynamics of diet-gut microbiota interaction in adaptation of yaks to life at high altitude[J]. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7: 38
- [9] Liu WW, Wang Q, Song JJ, Xin JW, Zhang SS, Lei YH, Yang YL, Xie P, Suo HY. Comparison of gut microbiota of yaks from different geographical regions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 666940
- [10] Zhang XL, Xu TW, Wang XG, Geng YY, Liu HJ, Hu LY, Zhao N, Kang SP, Zhang WM, Xu SX. The effect of transitioning between feeding methods on the gut

- microbiota dynamics of yaks on the Qinghai-Tibet plateau[J]. *Animals*, 2020, 10(9): 1641
- [11] 米见对. 细菌与甲烷菌在牦牛瘤胃中的时间动态及其在消化道的空间分布[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2016
- Mi JD. Dynamics in rumen and distribution along gastrointestinal tracts of bacteria and methanogen in yak[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2016 (in Chinese)
- [12] Nie YY, Zhou ZW, Guan JQ, Xia BX, Luo XL, Yang Y, Fu Y, Sun Q. Dynamic changes of yak (*Bos grunniens*) gut microbiota during growth revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and metagenomics[J]. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(7): 957-966
- [13] Xin JW, Chai ZX, Zhang CF, Zhang Q, Zhu Y, Cao HW, Zhong JC, Ji QM. Comparing the microbial community in four stomach of dairy cattle, yellow cattle and three yak herds in Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1547
- [14] Wu DW, Vinitchaikul P, Deng MY, Zhang GR, Sun LY, Wang HX, Gou X, Mao HM, Yang SL. Exploration of the effects of altitude change on bacteria and fungi in the rumen of yak (*Bos grunniens*)[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(2): 835-846
- [15] Kataev VY, Sleptsov II, Martynov AA, Aduchiev BK, Khlopko YA, Miroshnikov SA, Cherkasov SV, Plotnikov AO. Data on rumen and faeces microbiota profiles of Yakutian and Kalmyk cattle revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons[J]. *Data in Brief*, 2020, 33: 106407
- [16] 王云洲, 陈凤梅, 张万明, 郭建强, 马朝银, 胡士林. 应用高通量测序技术分析青海牦牛引进山东后瘤胃菌群的变化[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(7): 2013-2024
- Wang YZ, Chen FM, Zhang WM, Guo JQ, Ma CY, Hu SL. High throughput sequencing analyzed changes in the yak rumen microflora after Qinghai yaks introduced to Shandong[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(7): 2013-2024 (in Chinese)
- [17] El-Meadaway A, Mir Z, Mir PS, Zaman MS, Yanke LJ. Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining *in vitro* digestibility and gas production[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 1998, 78(4): 673-679
- [18] 王继文, 王立志, 闫天海, 郭伟, 徐琴. 山羊瘤胃与粪便微生物多样性[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(8): 2559-2571
- Wang JW, Wang LZ, Yan TH, Guo W, Xu Q. Diversity of ruminal and fecal microbiota of goat[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(8): 2559-2571 (in Chinese)
- [19] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [20] Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57-59
- [21] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541
- [22] Wang Y, Sheng HF, He Y, Wu JY, Jiang YX, Tam NFY, Zhou HW. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264-8271
- [23] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60
- [24] Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld J, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. PICRUSt2: an improved and extensible approach for metagenome inference[J]. *bioRxiv*, 2019. DOI: 10.1101/672295
- [25] Li H, Zhou R, Zhu JX, Huang XD, Qu JP. Environmental filtering increases with elevation for the assembly of gut microbiota in wild pikas[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(5): 976-992
- [26] Tap J, Furet JP, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, Lakhdari O, Lombard V, Henrissat B, Corthier G, et al. Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(12): 4954-4964
- [27] Liu XX, Zhang YL, Li YF, Pan JF, Wang DD, Chen WH, Zheng ZQ, He XH, Zhao QJ, Pu YB, et al. EPAS1 gain-of-function mutation contributes to high-altitude

- adaptation in Tibetan horses[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2019, 36(11): 2591-2603
- [28] Liu JB, Yuan C, Guo TT, Wang F, Zeng YF, Ding XZ, Lu ZK, Renqing DK, Zhang H, Xu XL, et al. Genetic signatures of high-altitude adaptation and geographic distribution in Tibetan sheep[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 18332
- [29] Ma YF, Han XM, Huang CP, Zhong L, Adeola AC, Irwin DM, Xie HB, Zhang YP. Population genomics analysis revealed origin and high-altitude adaptation of Tibetan pigs[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11463
- [30] Suzuki TA, Martins FM, Nachman MW. Altitudinal variation of the gut microbiota in wild house mice[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(9): 2378-2390
- [31] Fan QS, Wanapat M, Yan TH, Hou FJ. Altitude influences microbial diversity and herbage fermentation in the rumen of yaks[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 370
- [32] Liu HJ, Zhao XQ, Han XP, Xu SX, Zhao L, Hu LY, Xu TW, Zhao N, Zhang XL, Chen DD, et al. Comparative study of gut microbiota in Tibetan wild asses (*Equus kiang*) and domestic donkeys (*Equus asinus*) on the Qinghai-Tibet plateau[J]. *PeerJ*, 2020. DOI: 10.7717/peerj.9032
- [33] Wang YJ, Zhou R, Yu QL, Feng TS, Li H. Gut microbiome adaptation to extreme cold winter in wild plateau pika (*Ochotona curzoniae*) on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(16): fnaa134
- [34] Kaakoush NO. Insights into the role of *Erysipelotrichaceae* in the human host[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 84
- [35] Fernando SC, Purvis HT, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Krehbiel CR, Nagaraja TG, Roe BA, Desilva U. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(22): 7482-7490
- [36] Waite DW, Taylor MW. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 223
- [37] Wu YH, Yao YF, Dong MM, Xia TR, Li DY, Xie M, Wu JY, Wen AX, Wang Q, Zhu GX, et al. Characterisation of the gut microbial community of rhesus macaques in high-altitude environments[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 68
- [38] Wu DW, Vinitchaikul P, Deng MY, Zhang GR, Sun LY, Gou X, Mao HM, Yang SL. Host and altitude factors affect rumen bacteria in cattle[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(4): 1573-1583
- [39] Zhao JS, Yao YF, Li DY, Xu HM, Wu JY, Wen AX, Xie M, Ni QY, Zhang MW, Peng GN, et al. Characterization of the gut microbiota in six geographical populations of Chinese rhesus macaques (*Macaca mulatta*), implying an adaptation to high-altitude environment[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76(2): 565-577
- [40] Sun GL, Zhang HH, Wei QG, Zhao C, Yang XF, Wu XY, Xia T, Liu GS, Zhang L, Gao Y, et al. Comparative analyses of fecal microbiota in European mouflon (*Ovis orientalis musimon*) and blue sheep (*Pseudois nayaur*) living at low or high altitudes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1735
- [41] McLoughlin S, Spillane C, Claffey N, Smith PE, O'Rourke T, Diskin MG, Waters SM. Rumen microbiome composition is altered in sheep divergent in feed efficiency[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1981
- [42] Del Chierico F, Abbatini F, Russo A, Quagliarriello A, Reddel S, Capoccia D, Caccamo R, Ginanni Corradini S, Nobili V, De Peppo F, et al. Gut microbiota markers in obese adolescent and adult patients: age-dependent differential patterns[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1210
- [43] Lagkouvardos I, Lesker TR, Hitch TCA, Gálvez EJC, Smit N, Neuhaus K, Wang J, Baines JF, Abt B, Stecher B, et al. Sequence and cultivation study of *Muribaculaceae* reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 28
- [44] Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(2): 295-308
- [45] Derrien M, Belzer C, De Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 106: 171-181
- [46] Cani PD, De Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1765
- [47] Qin JJ, Li YR, Cai ZM, Li SH, Zhu JF, Zhang F, Liang SS, Zhang WW, Guan YL, Shen DQ, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota

- in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60
- [48] Perea K, Perz K, Olivo SK, Williams A, Lachman M, Ishaq SL, Thomson J, Yeoman CJ. Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota[J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95(6): 2585-2592
- [49] Consortium THMP. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 207-214
- [50] Mazel F. Living the high life: could gut microbiota matter for adaptation to high altitude?[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(9): 2119-2121
- [51] Zhang ZG, Xu DM, Wang L, Hao JJ, Wang JF, Zhou X, Wang WW, Qiu Q, Huang XD, Zhou JW, et al. Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals[J]. *Current Biology*, 2016, 26(14): 1873-1879
- [52] 赵聪聪. 放牧条件下黄牛、犏牛和牦牛瘤胃液生理生化指标及微生物组成比较研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019
- Zhao CC. Analysis of physiological and biochemical indexes and microbial composition of rumen liquid of cattle, dzo and yak under grazing conditions[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese)
- [53] Hamana K, Itoh T, Sakamoto M, Hayashi H. Covalently linked polyamines in the cell wall peptidoglycan of the anaerobes belonging to the order *Selenomonadales*[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2012, 58(4): 339-347