

# 人工辅助投食对滇金丝猴肠道微生物群落的影响

李蕾<sup>1</sup>, 秦明森<sup>1,2</sup>, 王瑶<sup>1</sup>, 李润<sup>1</sup>, 黎大勇<sup>1,2</sup>, 唐贇<sup>\*1</sup>

1 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637002

2 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637002

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[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 301-312.

LI Lei, QIN Mingsen, WANG Yao, LI Run, LI Dayong, TANG Yun. Effect of food-provisioning on gut microbial community of Yunnan snub-nosed monkeys[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 301-312.

**摘要:** 【背景】肠道菌群与宿主的消化吸收、免疫抵抗和行为等息息相关, 并受宿主的饮食、生活环境等因素影响。【目的】人工辅助投食能增加野生动物的营养摄入, 但对其肠道菌群影响的研究较少。【方法】以云南白马雪山国家级自然保护区内的野生和人工辅助投食滇金丝猴群的新鲜粪便为材料, 通过高通量测序探究人工辅助投食对猴群肠道菌群的影响。【结果】人工辅助投食的猴群肠道菌群丰富度、均匀度及谱系多样性更高, 并且个体间群落组成差异更小。通过多级物种差异判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析发现, 人工辅助投食对 20 种不同分类水平的细菌相对丰度有影响, 包括提升了厚壁菌门(*Firmicutes*)等 8 种类群的相对丰度, 降低了变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)等 12 种类群的相对丰度。通过构建微生物相关网络发现, 野生猴群肠道菌群网络结构更加复杂, 鲁棒性更高。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能预测结果表明, 人工辅助投食降低了猴群肠道菌群降解代谢功能, 这可能与投食增加了易降解的高营养物质摄入比例有关。【结论】本研究揭示了人工辅助投食对滇金丝猴肠道菌群的作用是多方位的, 菌群的多样性、群落组成、相关网络结构等均需纳入探究范畴。

**关键词:** 滇金丝猴; 肠道微生物; 多样性; 人工辅助投食; 网络分析

资助项目: 四川省科技厅应用基础重点项目(2020YJ0346); 西华师范大学英才基金(17YC344); 西华师范大学博士科研启动基金(19E048)

This work was supported by the Key Project of Applied Basic Research Program of Sichuan Province (2020YJ0346), the Scientific Research Foundation of Young Scientists of China West Normal University (17YC344), and the Fundamental Research Fund of China West Normal University (19E048).

\*Corresponding author. E-mail: tangyun\_502@cwnu.edu.cn

Received: 2022-06-08; Accepted: 2022-07-29; Published online: 2022-08-25

# Effect of food-provisioning on gut microbial community of Yunnan snub-nosed monkeys

LI Lei<sup>1</sup>, QIN Mingsen<sup>1,2</sup>, WANG Yao<sup>1</sup>, LI Run<sup>1</sup>, LI Dayong<sup>1,2</sup>, TANG Yun<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, Sichuan, China

2 Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation, Ministry of Education, Nanchong 637002, Sichuan, China

**Abstract:** **[Background]** Gut flora influences the nutrient digestion and absorption, immunity, and behavior of the host and is impacted by the diet, living environment, and other factors of the host. **[Objective]** Food-provisioning can improve the nutrition in wild animals, but a few reports on the impact on gut flora are available. **[Methods]** Through high-throughput sequencing of the fresh feces of wild and food-provisioned snub-nosed monkeys in the Baima Snow Mountain National Nature Reserve in Yunnan, we explored the effect of food-provisioning on gut flora of the monkeys. **[Results]** Food-provisioning significantly increased the richness, evenness, and phylogenetic diversity of the gut flora and reduced the variance of community composition among monkey individuals. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis revealed that food-provisioning significantly changed the relative abundance of 20 bacterial taxa. To be specific, it increased the abundance of 8 taxa, such as *Firmicutes*, and decreased the abundance of 12 taxa, including *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. The correlation network analysis revealed that wild monkey group had more complex and robust microbial correlation network. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) functional prediction found that food-provisioning mainly reduced the degradation ability as it added highly degradable nutrients. **[Conclusion]** Food-provisioning influences multiple aspects of gut flora of Yunnan snub-nosed monkeys, particularly the biodiversity, community composition, and correlation network.

**Keywords:** Yunnan snub-nosed monkey; gut microbes; diversity; food-provisioning; network analysis

金丝猴(*Rhinopithecus*)是一类濒危的疣猴亚科(*Colobinae*)动物,全世界仅有5种,而我国就有4种,其中,我国特有的滇金丝猴(*R. bieti*)是分布海拔最高的非人灵长类动物之一<sup>[1]</sup>。该物种常栖息于海拔3 000–4 400 m的高海拔森林中,食物种类丰富,包括地衣、竹笋、叶、芽、花、树皮、昆虫及真菌等<sup>[2-3]</sup>。受栖息地破碎化和人为干扰的影响<sup>[4-5]</sup>,滇金丝猴种群数量

急剧减少<sup>[6]</sup>,为了保护其种群,我国于1988年建立了云南白马雪山国家级自然保护区。为弥补野生动物频繁的食物短缺,保护区每天在供应点向滇金丝猴提供补充食物,即人工辅助投食,供应包括花生、苹果、南瓜籽、鸡蛋等食物<sup>[3,7]</sup>。

肠道微生物对宿主消化、发育、免疫、大脑发育及行为具有重要作用,其群落组成与宿主栖息地、社会行为、饮食及系统发育等因素

有关<sup>[8-14]</sup>。近年来,一些学者对圈养和野生动物肠道微生物差异研究较多。2013年,Amato等<sup>[12]</sup>研究表明圈养黑吼猴饮食多样性减少时肠道微生物多样性会相应减少;2018年,Clayton等<sup>[15]</sup>发现圈养白臀叶猴肠道中的普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)相对丰度更高;2019年,Hale等<sup>[16]</sup>在圈养黔金丝猴中发现了与Clayton等<sup>[15]</sup>相似的结果。然而,人工辅助投食作为圈养和野生的中间态,在客观上增加了一定的食物多样性,同时也增加了高营养物质的摄入,其对肠道微生物的具体影响还不得而知。

越来越多的研究发现,肠道微生物功能不仅受其群落多样性的影响,还与其群落内部相关网络结构息息相关<sup>[17]</sup>。微生物相关网络基于微生物间的作用关系而构建,是分析群落内部作用的有力工具。人们认为,互惠共生的微生物或那些相互受益的微生物相互之间表现为正相关;相反地,具有拮抗关系的微生物,如为同一生态位竞争的微生物则呈负相关<sup>[18]</sup>。另外,当一个网络的部分节点被破坏时,该网络保持其连通性的能力,即抗毁性或鲁棒性,对于网络性能的稳定至关重要,也是评估网络结构的重要指标<sup>[19]</sup>。因此,探明人工辅助投食对肠道微生物群落网络结构及其稳定性的影响,能进一步理解人工辅助投食对微生物群落和功能的变化。

基于以上原因,本研究根据白马雪山保护区内典型生境,选择响古箐人工辅助投食猴群和另一群类似生境的野生滇金丝猴群作为对照,围绕肠道微生物多样性和网络结构,探究人工辅助投食对滇金丝猴群肠道微生物的影响,以期完善对人工辅助投食的科学评估,为滇金丝猴种群的保护和管理提供重要的科学参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 猴群生境

研究选择保护区的安一和响古箐人工辅助投食猴群作为研究对象,其中安一猴群无人 为干扰,约有40只,为野生猴群(YS);响古 箐猴群约有480只滇金丝猴,其中53-71只 为人工辅助投食猴(FS)<sup>[20]</sup>。安一(99°09'E, 27°27'N)与响古箐(99°21'E, 27°39'N)两地相距34 km, 两处植被类型较为一致,主要包括针叶林、落 叶阔叶林(2 500-3 600 m)及亚高山冷杉林 (3 500-4 000 m)<sup>[21]</sup>。两处猴群的日常野外食物 包括附近森林中的树叶、芽、地衣及野果等<sup>[3]</sup>。 护林员每天9:00和17:00在响古箐供应点撒下 10 kg左右的地衣(6月中旬至7月中旬换成竹笋) 和4 kg左右的其他食物(花生、苹果、南瓜籽、 鸡蛋)<sup>[21]</sup>,供给量约为每只250 g/d,约占滇金 丝猴取食量的42%<sup>[3]</sup>。

### 1.2 样品收集

样品于2020年5、6月采集,在不干扰猴 群正常活动的情况下,采集新鲜滇金丝猴粪便。 使用消毒镊子采集粪便,放入灭菌冷冻管中, 冰盒保存,运至实验室后保存于-80℃冰箱内。 本实验采集野生和人工辅助投食猴群新鲜粪便 各10份,共20份。

### 1.3 主要试剂和仪器

酪蛋白、福林试剂、可溶性淀粉、碘酸 钾、碘化钾、聚乙烯醇、橄榄油、酚酞指示 剂、3,5-二硝基水杨酸、考马斯亮蓝,生工生物 工程(上海)股份有限公司;DNA抽提试剂盒, Omega Bio-Tek公司。全波长酶标仪, Thermo Fisher Scientific公司;PCR仪,ABI公司;电 泳仪,北京六一生物科技有限公司;MiSeq PE300测序平台,Illumina公司。

### 1.4 酶活性和理化性质测定

称取0.1 g冻干粪便,加入1 mL磷酸缓冲

液(pH 7.5), 在冰浴中充分混匀后, 12 000 r/min 离心 20 min, 所得上清液即为粗酶液。酶活性参考白燕等的方法<sup>[22]</sup>, 其中蛋白酶活性采用福林-酚法测定; 淀粉酶活性采用淀粉-碘法测定; 脂肪酶活性采用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法测定; 纤维素酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸法测定。蛋白质含量采用考马斯亮蓝双波长法测定<sup>[23]</sup>; 葡萄糖含量采用 3,5-二硝基水杨酸法测定<sup>[24]</sup>; pH 使用 pH 计测量。

### 1.5 肠道微生物群落调查

冻存样品低温送至上海美吉生物科技有限公司进行总 DNA 提取和高通量测序。使用 DNA 抽提试剂盒对滇金丝猴粪便样品总 DNA 进行提取, 并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。采用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区片段进行 PCR 扩增, PCR 反应体系参考 Wang 等<sup>[25]</sup>, PCR 扩增产物使用 2% 琼脂糖电泳检测。在 Illumina MiSeq PE300 平台完成高通量测序, 获得的数据已提交 NCBI 平台, 登录号为 PRJNA846586。使用 VSEARCH 对双端序列进行合并, 并在 97% 水平划分分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU), 选取各 OTU 中最长序列为代表序列<sup>[26]</sup>, 使用 QIIME2 平台 feature-classifier 功能, 用对应引物的训练过后的数据集对 OTU 代表序列进行鉴定, 其中鉴定置信阈值为 0.8<sup>[27]</sup>。使用 PICRUST2 软件, 根据 OTU 鉴定结果预测细菌群落功能丰度<sup>[28]</sup>。为了避免测序深度对群落的影响, 将所有样品序列抽平至 22 789 条。

### 1.6 数据分析

数据分析在 R 语言(4.1.0 版本)平台完成<sup>[29]</sup>。使用 *t* 检验确定人工辅助投食和野生滇金丝猴肠道微生物酶活性和理化性质差异的显著性。

使用“vegan”包计算群落的丰富度和均匀度指数, 并使用“ape”包计算谱系多样性以及亲缘关系指数, 以反映物种间亲缘关系的复杂度和远近差异。使用非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)对群落组成进行排序, 以确定群落整体组成差异。使用“adonis2”命令计算微生物菌群与主要酶活性和理化性质的相关性。进行多级物种差异判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)以确定不同分组间的差异物种及差异 KEGG 通路, 此过程使用在线网站(<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)<sup>[30]</sup>。为了探究微生物相互关系, 选取人工辅助投食和野生样品中丰度前 200 的 OTU, 分别计算两两之间的相关性, 选取相关性  $|r| > 0.6$  和  $P < 0.05$  的配对 OTU 进行相关性网络分析, 并在 Gephi 软件中分别构建两组样品的相关网络。对相关网络进行网络的抗毁性测试, 以确定相关网络的稳定性, 即随机移除 1-100 个节点, 计算自然连通度随移除节点的变化程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 肠道酶活性和理化性质

通过比较肠道酶活性和理化性质测量结果发现, 人工辅助投食能够显著提升滇金丝猴肠道脂肪酶活性, 降低淀粉酶活性以及葡萄糖含量, 对蛋白酶和纤维素酶活性, 以及蛋白质含量、肠道酸碱性有一定影响, 但均不显著(表 1)。

### 2.2 人工辅助投食对肠道菌群多样性影响

研究共得到 377 个 OTU, 其中人工辅助投食猴群的 OTU 数量为 278, 野生猴群的 OTU 数量为 189, 两个猴群共有的 OTU 数量为 90。对比多样性发现, 人工辅助投食能够显著提升肠道微生物的丰富度、均匀度及谱系多样性, 但对微生物的最近亲缘指数无显著影响(表 2)。

表 1 滇金丝猴肠道酶活性和理化性质

Table 1 Enzyme activity and physicochemical properties of *Rhinopithecus bieti* gut

理化指标	野生	人工辅助投食	显著性
Physicochemical properties	YS	FS	<i>P</i>
蛋白酶活性 Protease activity (U/mg)	6.76±0.42	6.85±0.19	0.577
纤维素酶活性 Cellulase activity (U/kg)	8.37±5.26	6.72±0.77	0.366
淀粉酶活性 Amylase activity (U/mg)	3.26±1.20	1.53±1.30	0.009
脂肪酶活性 Lipase activity (U/g)	0.17±0.12	0.42±0.21	0.006
蛋白质浓度 Protein concentration (μg/μL)	17.19±2.51	15.09±7.54	0.440
葡萄糖浓度 Glucose concentration (mg/mL)	5.59±1.61	4.26±0.41	0.026
pH	6.63±0.24	6.70±0.22	0.527

表 2 人工辅助投食对滇金丝猴肠道微生物多样性和亲缘关系指数的影响

Table 2 Effects of food-provisioning on gut microbial diversities and nearest taxon index in *Rhinopithecus bieti*

$\alpha$ 多样性指数	野生	人工辅助投食	显著性
Alpha diversity index	YS	FS	<i>P</i>
香农指数 Shannon	2.83±0.64	4.03±0.50	<0.001
丰富度 Richness	260.60±38.97	390.90±63.75	<0.001
均匀度 Evenness	0.51±0.11	0.67±0.07	<0.001
谱系多样性 Phylogenetic diversity	21.34±1.98	29.66±3.18	<0.001
最近亲缘指数 Nearest taxon index	2.33±0.75	1.91±0.50	0.178

### 2.3 人工辅助投食对肠道菌群群落组成的影响

人工辅助投食和野生猴群肠道菌群均以 5 个细菌门为主(图 1), 包括厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、

放线菌门(*Actinobacteria*)和螺旋菌门(*Spirochaetes*)。人工辅助投食猴群中厚壁菌门相对丰度最高, 而野生猴群中变形菌门相对丰度最高。

采用 LEfSe 分析进一步发现, 人工辅助投食对 20 种不同分类水平细菌存在影响(图 2), 其中增加了厚壁菌门及其从属的克里斯滕森菌目 (*Christensenellales*)、丹毒丝梭菌目 (*Erysipelotrichales*)、毛螺菌目 (*Lachnospirales*)、克里斯滕森菌科 (*Christensenellaceae*)、*Erysipelatoclostridiaceae*、韦荣球菌科 UCG\_003 属 (*Erysipelotrichaceae*\_UCG\_003)及 *Marvinbryantia* 的相对丰度; 降低了拟杆菌门及其从属的拟杆菌纲 (*Bacteroidetes*)、黄杆菌目 (*Flavobacteriales*)、鞘脂杆菌目 (*Sphingobacteriales*)、黄杆菌科 (*Flavobacteriaceae*)及黄杆菌属 (*Flavobacterium*), 变形菌门及其从属的  $\gamma$  变形菌纲 (*Gammaproteobacteria*), 以及芽孢杆菌纲 (*Bacilli*)

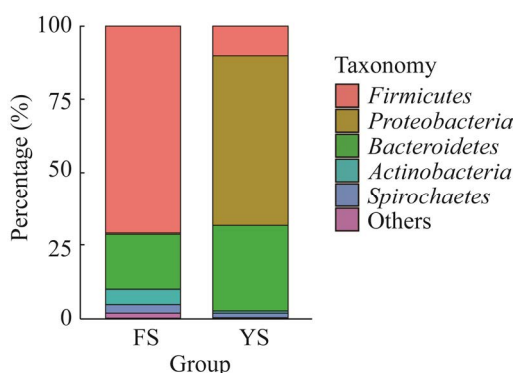


图 1 门水平物种相对丰度柱状图

Figure 1 Barplot of relative abundance of species at phylum level. FS: Food-provisioned monkeys; YS: Wild monkeys.

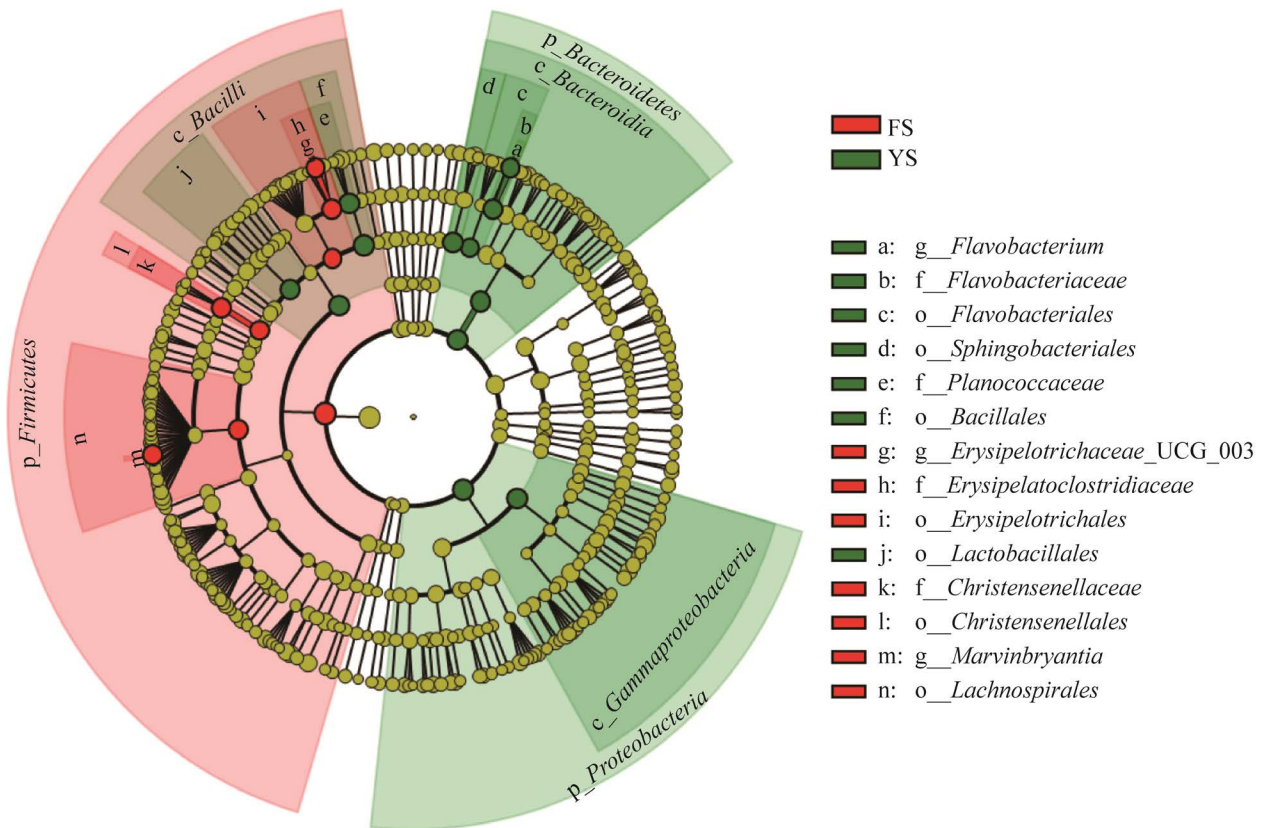


图 2 微生物组间差异的进化分支图

Figure 2 Differences between the various microorganisms based on cladogram. FS: Food-provisioned monkeys; YS: Wild monkeys. LDA>4.5,  $P<0.05$ .

及其从属的核衣细菌目(*Bacillales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)及动球菌科(*Planococcaceae*)。总体来看,人工辅助投食主要增加了厚壁菌门的相对丰度,降低了拟杆菌门和变形菌门的相对丰度。

基于群落相似性排序分析发现,人工辅助投食和野生猴群的肠道菌群组成差异明显,通过比较人工辅助投食和野生猴群肠道微生物群落 Bray-Curtis 距离分析发现,野生猴群之间肠道微生物群落差异更大,即野生猴群肠道微生物  $\beta$  多样性更高(图 3)。通过 Adonis 分析发现,肠道的各种酶活性和理化性质与肠道菌群组成在野生和人工辅助投食下均无显著关系。

#### 2.4 肠道菌群网络分析

通过比较微生物相关网络发现,野生和人工辅助投食猴群肠道菌群网络均以正相关为主,

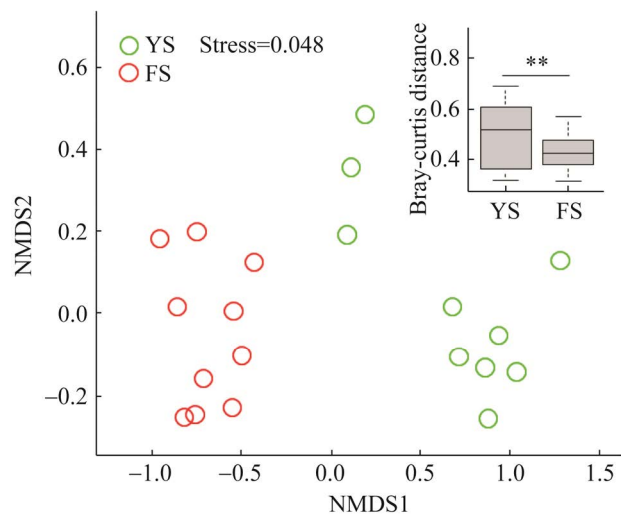


图 3 肠道细菌群落 NMDS 排序以及群落差异比较

Figure 3 Gut bacterial community NMDS ranking and comparison of community differences. FS: Food-provisioned monkeys; YS: Wild monkeys.

但人工辅助投食猴群肠道菌群网络边数量更少, 而且正相关关系比例更低, 人工辅助投食猴群肠道微生物网络均匀度也更低(图 4, 表 3)。通过计算其模块化和平均路径长度发现, 野生猴群肠道微生物网络模块化和节点的平均路径长度均低于人工辅助投食猴群。通过不断移除节点发现, 人工辅助投食猴群肠道菌群相关网络自然连通度低于野生猴群, 即其相关网络的鲁棒性更低, 这代表人工辅助投食猴群菌群网络结构稳定性较差(图 5)。

## 2.5 肠道菌群功能预测

通过 LEfSe 分析 KEGG 功能预测结果发

现, 在 KEGG 一级通路中, 人工辅助投食猴群菌群中与遗传信息处理(genetic information processing)、细胞进程(cellular processes)及生物体系统(organismal systems)相关的基因相对丰度更高, 而野生猴群中与代谢(metabolism)相关基因相对丰度更高(图 6A)。在二级通路中, 人工辅助投食猴群中与复制和修复(replication and repair)、翻译(translation)、转录(transcription)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)及免疫系统(immune system)相关基因相对丰度更高, 野生猴群中与外源物生物降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism)、脂质代谢(lipid

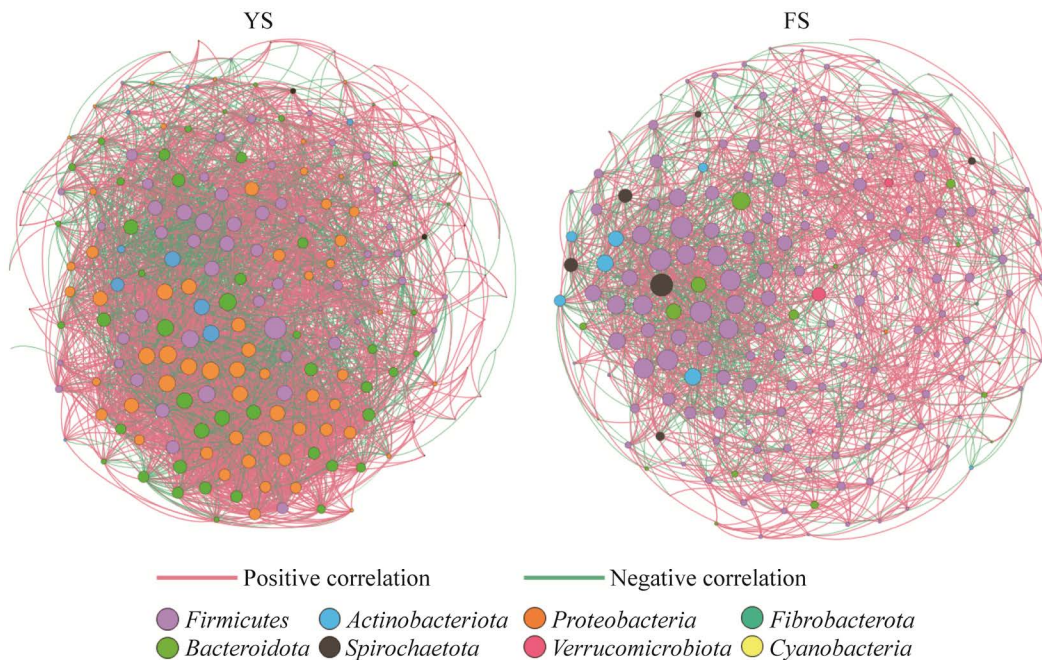


图 4 肠道菌群相关网络分析

Figure 4 Correlation network analysis of gut bacterial community. FS: Food-provisioned monkeys; YS: Wild monkeys.

表 3 网络拓扑结构参数

Table 3 The topological features of network

参数	点的数量	边的数量	正相关边数量	负相关边数量	均匀度
Parameters	Number of nodes	Number of edges	Number of positive edges	Number of negative edges	Average degree
YS	199	4 162	2 666	1 496	41.829
FS	197	1 929	1 211	718	19.584
$\Delta( YS-FS )$	2	2 233	1 455	778	22.245

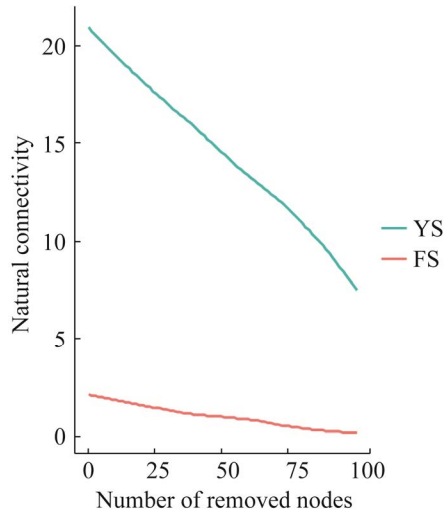


图5 微生物相关网络的自然连通度

Figure 5 The natural connectivity of microbial network. FS: Food-provisioned monkeys; YS: Wild monkeys.

metabolism)及其他氨基酸代谢(metabolism of other amino acids)相关基因相对丰度更高(图6B)。在三级通路中,人工辅助投食猴群中与安沙霉素类的生物合成(biosynthesis of ansamycins)、戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway)等13种非降解功能相关的基因相对丰度更高,而野生猴群中与香叶醇降解(geraniol degradation)、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解(valine, leucine and isoleucine degradation)等10条降解通路及脂多糖生物合成(lipopolysaccharide biosynthesis)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)、硫辛酸代谢(lipoic acid metabolism)和不饱和脂肪酸的生物合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids)相关基因的相对丰度更高(图6C)。从整体上看,相对人工辅助投食猴群,野生猴群菌群中具有代谢特别是降解代谢相关基因的细菌相对丰度更高。

### 3 讨论

本研究结果表明人工辅助投食提高了肠道

菌群的丰富度和均匀度,与Amato等<sup>[12]</sup>研究结果一致。这可能与人工辅助投食既能提高取食食物的多样性,又能增加肠道内蛋白质、脂肪及碳水化合物等底物,以及两者共同作用有关<sup>[31]</sup>。通过Adonis分析发现,野生和人工辅助投食猴群菌群与酶活性、理化性质之间并无显著相关,这可能是由于部分酶来自于宿主分泌<sup>[32]</sup>,而肠道菌群组成主要受食物和外部环境影响,并非肠道理化性质<sup>[33]</sup>。

通过计算微生物 $\beta$ 多样性发现,人工辅助投食和野生滇金丝猴的微生物群落结构存在显著差异,其中野生猴群个体间群落差异更大,这是因为人工辅助投食增加了猴群摄入食物的相似程度,从而缩减了肠道微生物的差异<sup>[34]</sup>。通过物种组成和LEfSe分析发现,厚壁菌门在人工辅助投食猴群中显著富集,变形菌门和拟杆菌门在野生猴群中显著富集。Jumpertz等<sup>[35]</sup>的研究表明,厚壁菌门和拟杆菌门的变化与摄入的能量有关,当摄入约150 kcal能量时,厚壁菌门比例会增加20%,而能量减少150 kcal时,拟杆菌门比例会增加20%,这与本研究结果较为一致。野生猴群肠道微生物的主要优势菌为变形菌门,而在Clayton等<sup>[36]</sup>的综述中发现,非人灵长类动物肠道微生物多以厚壁菌门为主,但在一些黑猩猩、狒狒肠道中,偶尔发现以变形菌门为主的微生物群落。结合我们的研究表明,野生滇金丝猴肠道微生物群落较其他灵长类有一定的特殊性,其研究潜力巨大。

一般情况下,微生物间正相关表明两者有合作关系,负相关代表竞争或者捕食关系<sup>[37]</sup>。本研究构建的两个网络均以正相关为主,表明滇金丝猴肠道菌群在野生和人工辅助投食情况下,微生物之间多为合作关系。然而野生猴群菌群网络结构的正、负相关关系均高于人工辅助投食猴群。这是因为野生猴群的食物营养更低,微生



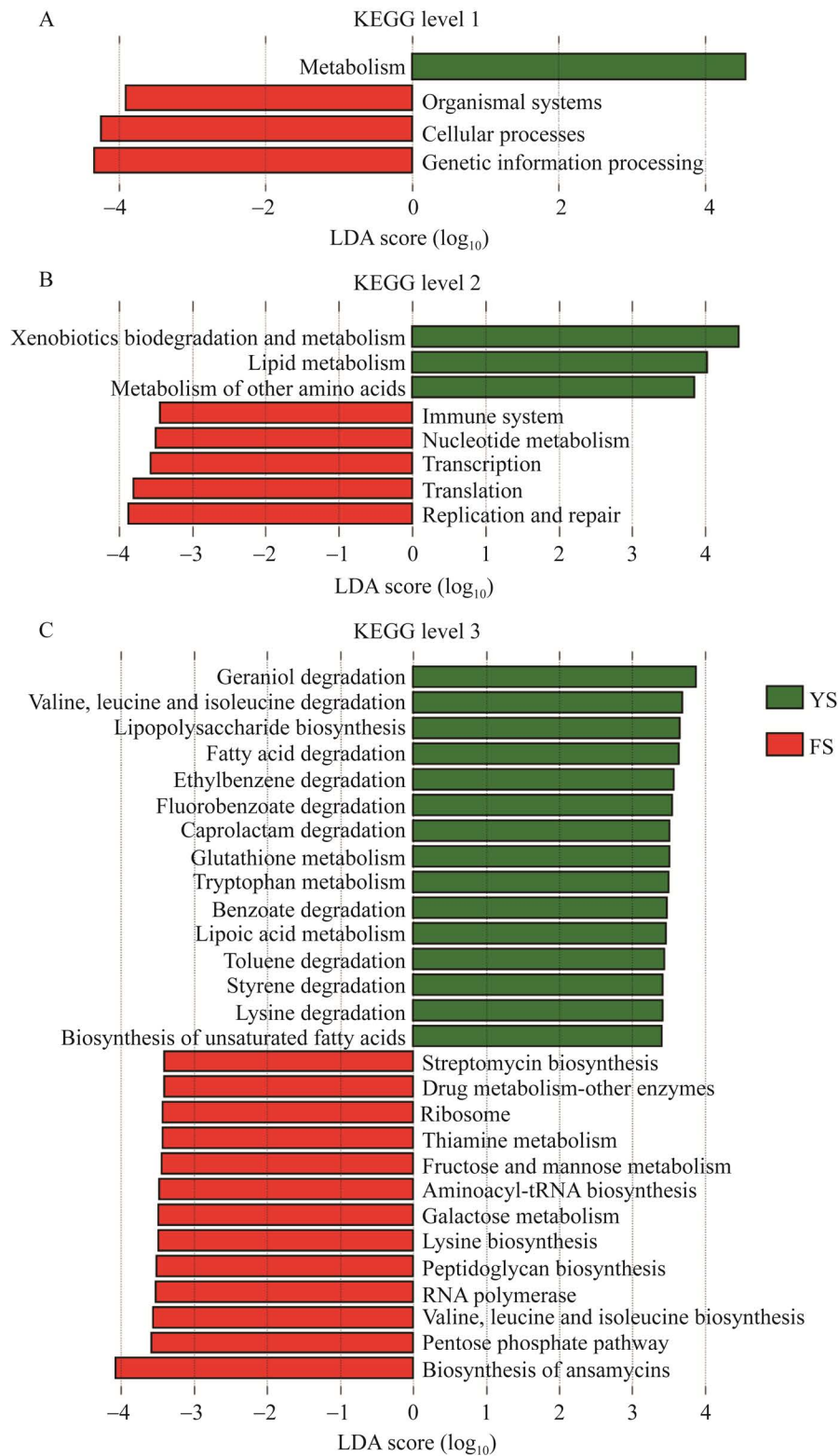


图 6 KEGG 通路丰度 LDA 值柱状图

Figure 6 KEGG pathway abundance LDA value histogram. FS: Food-provisioned monkeys; YS: Wild monkeys. LDA>3.4,  $P<0.05$ .

物间需多合作才能保障共存；同时，较低的营养会造成相似生态位微生物间的竞争关系，增加细菌间的负相关关系。在整体上促使野生猴群肠道菌群网络复杂度更高<sup>[38]</sup>。针对土壤微生物的研究发现，网络复杂度能提高其生态功能的多样性<sup>[39]</sup>，这一关系是否在肠道环境存在还需进一步证实。本研究对网络进行的抗毁性测试显示，野生猴群菌群在不断移除 OTU 后其保留的连接度始终高于人工辅助投食猴群，该结果表明部分细菌消失对相关网络结构的影响更小，野生猴群菌群抗干扰能力更强，网络结构更加稳定<sup>[40]</sup>。

本研究通过 KEGG 功能预测发现，野生猴群菌群中具有降解代谢相关功能的细菌更丰富。这是因为野生猴群摄入低营养食物的比例更高，这些食物中富含生物碱等天然毒素，而该类毒素能促进具解毒功能细菌的生存，包括具有谷胱甘肽代谢<sup>[41]</sup>、香叶醇降解<sup>[42]</sup>等功能的细菌；同时，相对于人工辅助投食猴群，食物中脂肪和糖类比例更低，蛋白质比例更高，这为肠道菌群提供了更多的氨基酸，进而提升了缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解细菌的丰度<sup>[43]</sup>。人工辅助投食猴群的肠道菌群中涉及遗传信息处理、细胞进程及生物体系统等功能的细菌相对丰度更高，我们推测这可能与较高的营养条件下需要更多的非降解代谢功能来维持菌群的正常功能有关。此外，人工辅助投食对具有安沙霉素生物合成功能的菌群丰度影响最为显著，该菌群代谢产物安沙霉素具有一定的抗病毒性，还能抑制肿瘤细胞的生长<sup>[44]</sup>。该结果在一定程度上暗示了辅助投食后的肠道菌群有利于宿主健康，但需要更多的研究来证实。

## 4 结论

本研究从微生物多样性、网络结构及功能预测 3 个方面调查了人工辅助投食对滇金丝猴肠

道微生物的影响。结果发现，人工辅助投食能够显著提高肠道微生物多样性，降低个体间群落组成差异，但也会削弱微生物网络的复杂性和稳定性。此外，人工辅助投食还降低了滇金丝猴肠道微生物对各类物质的降解代谢功能，特别是对有毒物质的降解代谢。综合来看，人工辅助投食对滇金丝猴肠道微生物的影响是多方位、多层次的，仅从多样性来评估其具体影响将有失偏颇，“人工辅助投食—肠道微生物—宿主”间的具体相互关系，还需要在以后的研究中继续深入探讨。本研究为进一步完善滇金丝猴的人工辅助投食措施提供了科学参考，具有一定的理论和实践价值。

## REFERENCES

- [1] LONG YC, KIRKPATRICK CR, ZT, XL. Report on the distribution, population, and ecology of the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*)[J]. Primates, 1994, 35(2): 241-250.
- [2] 黎大勇, 任宝平, 和鑫明, 胡刚, 李保国, 李明. 白马雪山自然保护区响古箐滇金丝猴的食性[J]. 兽类学报, 2011, 31(4): 338-346.  
LI DY, REN BP, HE XM, HU G, LI BG, LI M. Diet of *Rhinopithecus bieti* at Xiangguqing in Baimaxueshan National Nature Reserve[J]. Acta Theriologica Sinica, 2011, 31(4): 338-346 (in Chinese).
- [3] XIA WC, LIU GQ, WANG DL, CHEN H, ZHU LF, LI DY. Functional convergence of Yunnan snub-nosed monkey and bamboo-eating panda gut microbiomes revealing the driving by dietary flexibility on mammal gut microbiome[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2022, 20: 685-699.
- [4] LIU ZJ, REN BP, WU RD, ZHAO L, HAO YL, WANG BS, WEI FW, LONG YC, LI M. The effect of landscape features on population genetic structure in Yunnan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) implies an anthropogenic genetic discontinuity[J]. Molecular Ecology, 2009, 18(18): 3831-3846.
- [5] XIA WC, ZHANG C, ZHUANG HF, REN BP, ZHOU J, SHEN J, KRZTON A, LUAN XF, LI DY. The potential distribution and disappearing of Yunnan snub-nosed monkey: influences of habitat fragmentation[J]. Global Ecology and Conservation, 2020, 21: e00835.
- [6] ZHAO XM, REN BP, LI DY, XIANG ZF, GARBER PA, LI M. Effects of habitat fragmentation and human

- disturbance on the population dynamics of the Yunnan snub-nosed monkey from 1994 to 2016[J]. PeerJ, 2019, 7: e6633.
- [7] 夏凡, 朱平芬, 李明, 任宝平. 白马雪山自然保护区响古箐滇金丝猴的交配行为[J]. 兽类学报, 2016, 36(1): 1-14.  
XIA F, ZHU PF, LI M, REN BP. Mating behavior of Yunnan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Xiangguqing in Baimaxueshan National Nature Reserve, Yunnan, China[J]. Acta Theriologica Sinica, 2016, 36(1): 1-14 (in Chinese).
- [8] SUZUKI TA. Links between natural variation in the microbiome and host fitness in wild mammals[J]. Integrative and Comparative Biology, 2017, 57(4): 756-769.
- [9] MCFALL-NGAI M, HADFIELD MG, BOSCH TCG, CAREY HV, DOMAZET-LOŠO T, DOUGLAS AE, DUBILIER N, EBERL G, FUKAMI T, GILBERT SF, HENTSCHEL U, KING N, KJELLEBERG S, KNOLL AH, KREMER N, MAZMANIAN SK, METCALF JL, NEALSON K, PIERCE NE, RAWLS JF, et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(9): 3229-3236.
- [10] DIAZ HEIJTZ R, WANG SG, ANUAR F, QIAN Y, BJÖRKHOLM B, SAMUELSSON A, HIBBERD ML, FORSSBERG H, PETERSSON S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(7): 3047-3052.
- [11] SAMPSON TR, MAZMANIAN SK. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(5): 565-576.
- [12] AMATO KR, YEOMAN CJ, KENT A, RIGHINI N, CARBONERO F, ESTRADA A, REX GASKINS H, STUMPF RM, YILDIRIM S, TORRALBA M, GILLIS M, WILSON BA, NELSON KE, WHITE BA, LEIGH SR. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1344-1353.
- [13] ARCHIE EA, TUNG J. Social behavior and the microbiome[J]. Current Opinion in Behavioral Sciences, 2015, 6: 28-34.
- [14] LEY RE, HAMADY M, LOZUPONE C, TURNBAUGH PJ, RAMEY RR, BIRCHER JS, SCHLEGEL ML, TUCKER TA, SCHRENZEL MD, KNIGHT R, GORDON JI. Evolution of mammals and their gut microbes[J]. Science, 2008, 320(5883): 1647-1651.
- [15] CLAYTON JB, AL-GHALITH GA, LONG HT, TUAN BV, CABANA F, HUANG H, VANGAY P, WARD T, MINH VV, TAM NA, DAT NT, TRAVIS DA, MURTAUGH MP, COVERT H, GLANDER KE, NADLER T, TODDES B, SHA JCM, SINGER R, KNIGHTS D, et al. Associations between nutrition, gut microbiome, and health in a novel nonhuman primate model[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 11159.
- [16] HALE VL, TAN CL, NIU KF, YANG YQ, ZHANG QK, KNIGHT R, AMATO KR. Gut microbiota in wild and captive Guizhou snub-nosed monkeys, *Rhinopithecus brelichi*[J]. American Journal of Primatology, 2019, 81(10/11): e22989.
- [17] BANERJEE S, SCHLAEPPI K, van der HEIJDEN MGA. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 567-576.
- [18] WEISS S, van TREUREN W, LOZUPONE C, FAUST K, FRIEDMAN J, DENG Y, XIA LC, XU ZZ, URSELL L, ALM EJ, BIRMINGHAM A, CRAM JA, FUHRMAN JA, RAES J, SUN FZ, ZHOU JZ, KNIGHT R. Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision[J]. The ISME Journal, 2016, 10(7): 1669-1681.
- [19] WU J, BARAHONA M, TAN YJ, DENG HZ. Natural connectivity of complex networks[J]. Chinese Physics Letters, 2010, 27(7): 078902.
- [20] 夏万才. 人工辅助投食滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*)的行为策略研究[D]. 南充: 西华师范大学硕士学位论文, 2017.  
XIA WC. Research on behavior strategy of a provisioned Yunnan snub-nosed monkey group[D]. Nanchong: Master's Thesis of China West Normal University, 2017 (in Chinese).
- [21] ZHU PF, REN BP, GARBER PA, XIA F, GRUETER CC, LI M. Aiming low: a resident male's rank predicts takeover success by challenging males in Yunnan snub-nosed monkeys[J]. American Journal of Primatology, 2016, 78(9): 974-982.
- [22] 白燕, 王维新. 刺参肠道蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶与纤维素酶活性的测定方法[J]. 饲料工业, 2012, 33(20): 28-32.  
BAI Y, WANG WX. Determination of protease, amylase, lipase and cellulase activities in sea cucumber intestinal tract[J]. Feed Industry, 2012, 33(20): 28-32 (in Chinese).
- [23] 房列涛, 兰雪, 沈秀军, 叶本晨, 杨雪伟, 杨文多, 李能树, 黄训端. 双波长 600 nm/460 nm 分光光度法测定蛋白质含量研究[J]. 生物学杂志, 2015, 32(4): 94-97.  
FANG LT, LAN X, SHEN XJ, YE BC, YANG XW, YANG WD, LI NS, HUANG XD. Study on spectrophotometric determination for protein content using 600 nm/460 nm dual-wavelength[J]. Journal of Biology, 2015, 32(4): 94-97 (in Chinese).
- [24] 师改琴, 李心怡, 孙雅琪, 靳文涛, 王随锟, 李茹, 梁振海. 分光光度法测定葡萄糖含量的研究[J]. 云南化工, 2020, 47(10): 53-55, 58.

- SHI GQ, LI XY, SUN YQ, JIN WT, WANG SK, LI R, LIANG ZH. Study on determination of glucose by spectrophotometry[J]. *Yunnan Chemical Technology*, 2020, 47(10): 53-55, 58 (in Chinese).
- [25] WANG YP, GUO XH, ZHENG PF, ZOU SB, LI GH, GONG J. Distinct seasonality of chytrid-dominated benthic fungal communities in the neritic oceans (Bohai Sea and North Yellow Sea)[J]. *Fungal Ecology*, 2017, 30: 55-66.
- [26] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, QUINCE C, MAHÉ F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [27] BOLYEN E, RIDEOUT JR, DILLON MR, BOKULICH NA, ABNET CC, AL-GHALITH GA, ALEXANDER H, ALM EJ, ARUMUGAM M, ASNICAR F, BAI Y, BISANZ JE, BITTINGER K, BREJNROD A, BRISLAWN CJ, BROWN CT, CALLAHAN BJ, CARABALLO-RODRÍGUEZ AM, CHASE J, COPE EK, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852-857.
- [28] ROBESON MS II, O'ROURKE DR, KAEHLER BD, ZIEMSKI M, DILLON MR, FOSTER JT, BOKULICH NA. RESCRIPt: reproducible sequence taxonomy reference database management[J]. *PLoS Computational Biology*, 2021, 17(11): e1009581.
- [29] R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing[Z]. 2022. <https://www.R-project.org/>.
- [30] 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.
- [31] SHEPHERD ES, DELOACHE WC, PRUSS KM, WHITAKER WR, SONNENBURG JL. An exclusive metabolic niche enables strain engraftment in the gut microbiota[J]. *Nature*, 2018, 557(7705): 434-438.
- [32] XIE YT, WANG C, ZHAO D, ZHOU CY, LI CB. Long-term intake of pork meat proteins altered the composition of gut microbiota and host-derived proteins in the gut contents of mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(17): e2000291.
- [33] NG SH, STAT M, BUNCE M, SIMMONS LW. The influence of diet and environment on the gut microbial community of field crickets[J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(9): 4704-4720.
- [34] CLAYTON JB, VANGAY P, HUANG H, WARD T, HILLMANN BM, AL-GHALITH GA, TRAVIS DA, LONG HT, TUAN BV, MINH VV, CABANA F, NADLER T, TODDES B, MURPHY T, GLANDER KE, JOHNSON TJ, KNIGHTS D. Captivity humanizes the primate microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(37): 10376-10381.
- [35] JUMPERTZ R, LE DS, TURNBAUGH PJ, TRINIDAD C, BOGARDUS C, GORDON JI, KRAKOFF J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 94(1): 58-65.
- [36] CLAYTON JB, GOMEZ A, AMATO K, KNIGHTS D, TRAVIS DA, BLEKHMAN R, KNIGHT R, LEIGH S, STUMPF R, WOLF T, GLANDER KE, CABANA F, JOHNSON TJ. The gut microbiome of nonhuman primates: lessons in ecology and evolution[J]. *American Journal of Primatology*, 2018, 80(6): e22867.
- [37] LAYEGHIFARD M, HWANG DM, GUTTMAN DS. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(3): 217-228.
- [38] MORRIËN E, HANNULA SE, SNOEK LB, HELMSING NR, ZWEERS H, de HOLLANDER M, SOTO RL, BOUFFAUD ML, BUÉE M, DIMMERS W, DUYTS H, GEISEN S, GIRLANDA M, GRIFFITHS RI, JØRGENSEN HB, JENSEN J, PLASSART P, REDECKER D, SCHMELZ RM, SCHMIDT O, et al. Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14349.
- [39] WAGG C, SCHLAEPPI K, BANERJEE S, KURAMAE EE, van der HEIJDEN MGA. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4841.
- [40] COYTE KZ, SCHLUTER J, FOSTER KR. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 663-666.
- [41] BOCK KW, LILIENBLUM W, FISCHER G, SCHIRMER G, BOCK-HENNING BS. The role of conjugation reactions in detoxication[J]. *Archives of Toxicology*, 1987, 60(1): 22-29.
- [42] CHEN W, VILJOEN AM. Geraniol—a review of a commercially important fragrance material[J]. *South African Journal of Botany*, 2010, 76(4): 643-651.
- [43] MADSEN L, MYRMEL LS, FJÆRE E, LIASET B, KRISTIANSEN K. Links between dietary protein sources, the gut microbiota, and obesity[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 1047.
- [44] GARCÍA-MORALES P, CARRASCO-GARCÍA E, RUIZ-RICO P, MARTÍNEZ-MIRA R, MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ MP, FERRAGUT JA, SACEDA M, MARTÍNEZ-LACACI I. Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G2/M arrest in glioblastoma cell lines[J]. *Oncogene*, 2007, 26(51): 7185-7193.