

大熊猫肠道菌群的研究进展

周紫晓¹ 钟志军¹ 周潇潇² 彭广能^{1*} 李奇³ 陶志勇³ 杨平³
杨俊³ 陈英³ 王亚萍³ 谭和林⁴

(1. 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130)

(2. 成都市动物疫病预防控制中心 四川 成都 610000)

(3. 四川省名山区农业局 四川 名山 625100)

(4. 重庆市开县畜牧兽医局 重庆 405499)

摘要: 随着最近分子生物学和高通量测序技术的快速发展,对大熊猫肠道菌群的结构和功能有了更深层次的认识。研究发现,大熊猫肠道菌群受到消化道结构、饮食、季节和年龄等多种因素的影响,在宿主免疫、消化和代谢等方面起到了重要的作用。本文综述大熊猫肠道菌群的群落结构以及生物学特性研究的最新进展,并讨论未来可能的研究方向。

关键词: 大熊猫, 肠道菌群, 高通量测序, 群落, 生物学特性

Giant panda intestinal bacteria—a review

ZHOU Zi-Yao¹ ZHONG Zhi-Jun¹ ZHOU Xiao-Xiao² PENG Guang-Neng^{1*} LI Qi³
TAO Zhi-Yong³ YANG Ping³ YANG Jun³ CHEN Ying³ WANG Ya-Ping³ TAN He-Lin⁴

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Animal Disease Prevention and Control Center of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610000, China)

(3. Mingshan District Agricultural Bureau, Mingshan, Sichuan 625100, China)

(4. The Bureau of Animal Husbandry of Kai County, Chongqing 405499, China)

Abstract: Recent development of molecular biology and high-throughput sequencing (next generation sequencing, NGS) technologies make our deeper understanding possible for the giant panda gut flora, both in the community structure and function. Studies have found that the giant panda's intestinal flora plays an important role in the host immunity, digestion and metabolism, which could be affected by many factors including the digestive tract structure, diet, season and age. This article reviews the progress of intestinal bacterial community structure and biological characteristics of the giant panda,

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31272620); Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201303042); Sichuan Provincial Department of Science and Technology Support Program (No. 2011NZ0060)

***Corresponding author:** E-mail: pgn.sicau@163.com

Received: July 01, 2015; **Accepted:** September 30, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 06, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31272620); 农业部公益性行业项目(No. 201303042); 四川省科技厅科技支撑项目(No. 2011NZ0060)

***通讯作者:** E-mail: pgn.sicau@163.com

收稿日期: 2015-07-01; **接受日期:** 2015-09-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-06

and discusses the future research directions.

Keywords: The giant panda, Intestinal bacteria, NGS, Community, Biological characteristics

大熊猫是我国珍贵的保护动物,也是世界濒危物种之一。据第4次大熊猫普查的结果统计,目前我国存活的大熊猫仅有2 239只,其中野生大熊猫1 864只,圈养大熊猫375只。研究发现,肠道菌群在大熊猫的免疫、消化和代谢等功能中发挥了重要的作用^[1-3]。大熊猫本身不具有编码纤维素酶的基因,其消化纤维素的功能主要由肠道细菌来完成,包括梭菌、芽孢杆菌和其他纤维消化菌在内的肠道细菌,能将竹类的多聚糖转换为单糖、二糖等为大熊猫能够利用的糖类物质^[3-6]。另一方面,肠道疾病一度被认为是大熊猫死亡的最重要原因之一,任何一个或者多个肠道微生物的变化都可能引起大熊猫一系列的消化功能紊乱甚至疾病^[7-8]。因此,研究大熊猫肠道菌群及其生物学特性是预防大熊猫肠道疾病、提高健康水平以及发展大熊猫微生态制剂的基础。本文对大熊猫肠道菌群结构及其对宿主的益生作用研究进行综述。

1 大熊猫肠道菌群的群落结构研究

大熊猫肠道很短,也没有瘤胃供食物发酵,这些特点使其对竹子的消化率非常低(只有约17%)^[1,9]。因此,它每天必需消耗大量的时间(约14 h)进食竹子(约12.5 kg)来满足机体的需要^[10-11],而竹子上很多附属物(包括大量的微生物)会随着大熊猫进食而进入到消化道内,不断补充肠道菌群^[2]。这种肉食动物的消化道结构以及类似草食动物的饮食特性决定了大熊猫拥有一个与众不同的肠道菌群结构。随着研究技术的革新和发展,大熊猫肠道菌群结构的研究逐渐从以前传统的分离鉴定方法,变化到以高通量测序为基础的大规模宏组学(Meta-omics)时代,其通量和准确度都有了革命性的进步。

1.1 传统的分离鉴定方法研究大熊猫肠道菌群结构

大熊猫肠道菌群的研究可以追溯到20世纪80年代^[12]。在研究初期,传统的分离鉴定方法是研究大

熊猫肠道菌群的主要方法。其中,Hirayama等^[13]分离鉴定了日本东京动物园的大熊猫肠道细菌,发现成年大熊猫的优势菌为链球菌,而专性厌氧菌较少;随着饮食的改变,肠道主要菌群出现了变化。Williams等^[14]在14个月的时间中对2只在孟菲斯动物园的成年大熊猫检测了肠道细菌,发现食物偏好变化可以引起乳酸杆菌和拟杆菌的数量变化。张志和等^[15]对成都大熊猫繁育研究基地的13只大熊猫的粪便研究发现,大熊猫肠道需氧菌检出率较高,厌氧菌检出率较低,优势菌群为大肠杆菌。熊焰等^[16]在6只大熊猫肠道中共发现了16个菌种,均为好氧菌和兼性厌氧菌。彭广能等^[17]对3只食性转换期大熊猫肠道菌群进行了研究,发现优势菌群在食性转换期中发生了改变。

传统的分离鉴定方法在大熊猫肠道菌群的初期研究中起到了非常重要的作用,为后期进一步研究肠道菌群的结构和功能奠定了基础。这些研究初步了解了大熊猫肠道菌群的种类(如乳杆菌和链球菌在这个阶段中分离到的最多),对不同生长阶段的大熊猫饮食标准的制定具有一定的参考作用。然而,由于培养方法的局限性(如厌氧菌培养要求高导致其检测效率低下,进而大多数研究发现厌氧菌数量较少),该方法的结果可能出现误差较大、重复性较差等问题。

1.2 分子鉴定方法研究大熊猫肠道菌群

扩增某些特定碱基序列的基因指纹图谱技术是监测微生物群落动态变化的重要方法之一。鲁海峰等^[18]首次运用ERIC-PCR技术对大熊猫的肠道菌群进行研究,发现不同大熊猫个体之间的肠道菌群结构比较相似,同一个体在不同时期也表现出比较高的稳定性。Wei等^[19]用PCR-TGGE图谱技术发现,大熊猫肠道微生物菌群结构非常相似,梭状芽孢杆菌的优势非常明显(达到76%)。Fang等^[5]通过16S rDNA-RFLP以及分离培养方法发现大熊猫肠

道中的细菌主要为变形菌门(53%)和厚壁菌门(47%),并证明了它们可以降解木质素。王焱等^[20]采用了ERIC-PCR技术分析了不同季节亚成体大熊猫肠道菌群的多样性,发现相同季节的大熊猫肠道菌群结构相对稳定,肠杆菌为亚成体大熊猫肠道菌群中的优势菌群。何廷美等^[21]用16S rDNA-RFLP技术对成年大熊猫肠道菌群的多样性进行了研究,发现不同季节的环境对大熊猫肠道菌群的多样性有一定影响,大肠杆菌、假单胞菌和链球菌为主要菌群。罗永久等^[22]对食性转换前期的3只大熊猫粪便细菌总DNA进行ERIC-PCR分析并构建16S rRNA基因克隆文库,表明这个阶段的大熊猫肠道细菌主要由厚壁菌门和变形菌门组成,随着食性转换前期的过渡,大熊猫肠道的优势菌群由梭菌属渐变为球菌属。他们还进一步发现与肉食动物相比,大熊猫肠道细菌种群丰富度较高,但优势菌群不是很明显^[23]。

分子分型鉴定方法研究大熊猫肠道菌群相较于之前传统的分离鉴定方法,可以更多地检出一些不能进行培养的细菌(如梭菌等)。在这个阶段中,研究人员基本上确定了大熊猫肠道菌群主要包括厚壁菌门和变形菌门,同时涉及了季节和年龄等不同因素对大熊猫肠道菌群的影响。然而分子鉴定方法仍然存在分辨率较低、重复性差、操作繁琐(比如16S rDNA-RFLP技术中每个样品需要挑选80–100个单克隆)等问题。因此,随着高通量测序技术的发展,利用该方法研究大熊猫肠道菌群的报道越来越少。

1.3 高通量测序方法研究大熊猫肠道菌群

由于分子生物学技术的进步和高通量大规模测序技术的革新,研究者对微生物群落的结构和功能有了新的认识。近年来,高通量测序方法也开始被应用到大熊猫的肠道菌群的研究中。Zhu等^[3]首次利用宏基因组学和16S rRNA基因测序技术对大熊猫肠道菌群进行了研究,对来自7只野生大熊猫和8只圈养大熊猫新鲜粪便的肠道菌群的5 522条

16S rRNA基因序列进行分析,发现野生大熊猫肠道菌群的主要特点是具有高比例的梭菌纲物种。该研究进一步采用生物信息学方法,组装了其中3只野生大熊猫肠道菌群的宏基因组,均发现了纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶、1,4- β -木糖苷酶木聚糖以及1,4- β -木聚糖酶的相关编码基因,而且大部分来自梭菌属物种。他们的研究进一步证实了在大熊猫消化纤维素与半纤维素时,肠道菌群尤其是梭菌扮演了重要角色。

Tun等^[4]通过对成年和老年大熊猫的肠道菌群进行16S rRNA基因的高通量测序,发现厚壁菌门和变形菌门是成年和老年大熊猫肠道中最丰富的微生物种群,这些细菌可能对老年大熊猫的正常消化具有十分重要的作用。该研究同时报道了木质纤维素消化真菌的存在,并为大熊猫消化乙酸提供了证据。

Li等^[24]从宿主基因角度分析了大熊猫肠道菌群的特异性。他们通过比对大熊猫、小熊猫以及黑熊的肠道菌群16S rRNA基因序列,发现大熊猫的肠道菌群结构与其遗传近亲黑熊更为相似,而不是饮食更为相近的小熊猫。这个有趣的发现说明了宿主基因对肠道菌群具有重要的影响。

而在最近的研究中,Xue等^[25]也同样发现了大熊猫肠道菌群与肉食性和杂食性的动物相似。他们通过对54只大熊猫的124个肠道微生物样本进行了16S rRNA基因V3区的高通量测序,发现这些熊猫具有极低的肠道菌群多样性,主要是大肠杆菌和链球菌组成。他们提出,大熊猫似乎还没有进化出完全符合高纤维饮食的肠道菌群,可能对竹子的消化产生不利影响。该研究同时发现了季节变化可以显著地影响大熊猫肠道菌群的结构。

由于高通量测序技术可研究表征复杂的微生物环境,科研人员利用此技术研究大熊猫肠道菌群时获得了比以前更准确的数据和更多有趣的发现。然而,截止到目前,利用二代测序技术对大熊猫肠道菌群结构的研究仍然较少,其中只有一篇论文是

基于全宏基因组鸟枪测序方法来预测和分析大熊猫肠道菌群的功能^[8]; 在这些研究中, 不同的研究人员得到的菌群结构和结论差异较大(如 Li 等^[24]与 Tun 等^[4]的研究正好相反, 其主要菌群是链球菌而不是伽马变形菌, 同时表现了更低的肠道菌群多样性), 还没有研究能够说明造成这些差异的原因; 另外, 目前的研究方法仅存在于基因组阶段, 还没有利用宏转录组学、宏蛋白组学以及多组学结合的方法来分析大熊猫肠道菌群结构和功能。综上所述, 大熊猫肠道菌群结构和功能研究仍然有很多未知等着研究人员来发现。

2 大熊猫肠道细菌的生物学特性研究

除了在宏观上对大熊猫肠道菌群的结构和功能研究之外, 研究人员还在另一方面对大熊猫肠道细菌的生物学特性进行了研究。这些研究不仅获得了细菌在大熊猫肠道中的生存状态、致病机理以及益生作用, 还能够对大熊猫保健、饮食、用药等提供依据。最近高通量测序方法的发展也使得我们在基因水平上对细菌在大熊猫肠道高纤维环境中的生长情况、压力适应以及益生作用的调节机制进行了更进一步的研究。

2.1 大熊猫肠道致病菌以及耐药性研究

统计发现在影响大熊猫健康的各种疾病中, 肠道疾病曾是最严重、致死率最高的原因之一^[8]。目前发现能够引起大熊猫肠道疾病的病原菌包括小肠结肠炎耶尔森氏菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠埃希氏杆菌、铜绿色假单胞菌、魏氏梭菌、 β -溶血性链球菌等^[26]。其中, 有部分研究显示大肠埃希氏杆菌和克雷伯氏菌可能会和其他病原进行混合感染, 因此被认为是导致大熊猫患上肠道疾病的主要病原菌; 而由于亚成体大熊猫体质较弱, 被认为是最容易发生肠道疾病的年龄阶段^[20]。令人欣慰的是, 随着大熊猫保护工作的持续开展, 近十年没有发现病原菌引起大熊猫肠道疾病的报道。

有研究提出, 动物肠道细菌疾病的减少可能部分归功于近些年抗生素的大量使用, 然而这也同时

提高了某些肠道细菌广泛耐药的风险^[27]。在大熊猫肠道细菌耐药性研究中, Zhang 等^[28]发现大熊猫肠道细菌中 32.20% 的菌株对至少一种抗生素耐药, 同时耐受 3 种以上抗生素的菌株占 16.95%。Wang 等^[29]对大熊猫源大肠杆菌进行的耐药性分析发现 76% 的菌株至少具有一种抗生素耐药, 同时耐受 3 种以上抗生素的菌株占 36%。李进等^[30]对分离得到的大熊猫肠道 21 株芽孢杆菌进行耐药性分析, 发现 42.68% 的菌株至少对一种抗生素耐药, 同时耐受 3 种以上抗生素的菌株占 14.29%。

可以看到, 大熊猫的疾病保护工作已经取得了十分显著的成绩, 病原菌引起的肠道疾病已经几乎绝迹。然而大熊猫肠道细菌的耐药性情况仍然十分严峻, 提示下一阶段大熊猫的疾病预防保护工作可能需要更加注意对抗生素药品的控制。

2.2 大熊猫源益生菌候选菌的研究

由于微生态制剂具有安全、无耐药等特点, 大熊猫源益生菌的研究在分离鉴定时代就已经开展了。王强等^[31]首次从正常大熊猫粪便中筛选出的乳杆菌菌株制成乳杆菌制剂, 在对部分实验动物进行急性毒性实验无毒性反应的基础上, 临床应用到几例不同年龄、性别的患病大熊猫身上, 填补了大熊猫专用微生态制剂的空白。在这之后, 荣华等^[32]分离到一株大熊猫肠道梭菌属细菌, 该分离菌株不仅能利用纤维二糖、葡萄糖、蔗糖、淀粉、松三糖、覃糖等多种可溶性碳源, 而且可以利用纤维素粉等不溶性碳源。樊程等^[33]从大熊猫粪便中分离到一株解淀粉芽孢杆菌, 对 4 种纤维素底物(滤纸、脱脂棉、秸秆、竹纤维)均能有不同程度的降解, 其内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶具有不同的酶活变化, 总酶活最高达到 0.228 3 IU/mL。赵珊等^[34]分离得到一株大熊猫肠道纤维素降解菌, 鉴定为蜡样芽孢杆菌, 其最大总酶活为 0.108 5 IU/mL, 并对碱性环境有一定的耐受能力, 具有较为广阔的应用前景。周潇潇等^[35]从大熊猫肠道中分离得到了 7 株芽孢杆菌, 其中 ZX1、FF2 因具有良好的纤维分解能

力和抗逆性,可以作为大熊猫益生菌制剂的候选菌株。Zhou 等^[2]发现大熊猫肠道中部分芽孢杆菌具有良好的纤维分解能力,并对常见的几种肠道病原菌有较好的抑制作用。他们进一步利用转录组测序技术对其中一株枯草芽孢杆菌 HH2 在不同碳源下的转录情况进行了研究,发现其可以通过一系列的转录调控(如升高表达纤维素酶、减少非必要蛋白质合成以节省能源等)在大熊猫肠道高纤维环境中发挥益生作用^[36]。

虽然乳杆菌被首次报道应用到大熊猫的微生物生态制剂中,最近的益生候选菌株大多为芽孢杆菌。这些研究发现,芽孢杆菌作为微生态制剂的候选菌株具有许多天然的优势,包括分泌纤维素酶促进大熊猫消化竹子,产生多种抗菌肽帮助大熊猫保存肠道菌群的平衡,拥有良好的抗逆性方便制作微生态制剂等。然而,随着微生物制剂的使用安全标准提高,我们不能简单地对大熊猫益生菌进行分离和酶活研究,还需要了解其在大熊猫肠道中的生存状态及作用机制,才能够更好地将大熊猫肠道益生菌应用到实际生产中。

3 小结与展望

大熊猫独特的肠道解剖和饮食结构共同决定了其拥有一个与众不同的肠道菌群,引起了科研人员的广泛兴趣。通过近年来不断地研究大熊猫肠道菌群,科研人员不仅发现了不同年龄、不同季节等因素能够导致肠道菌群发生动态变化,还进一步发现肠道菌群能够帮助大熊猫消化竹子中的纤维素、木质素等成分,对大熊猫适应竹子的饮食起到了重要的作用。在肠道纤维素降解菌中,梭菌、伽马变形菌等可能起了主要的作用,然而由于这些厌氧细菌不易分离,目前大熊猫源益生菌的候选菌株主要以芽孢杆菌为主。我们还看到随着保护工作的投入不断加大,大熊猫肠道疾病控制十分出色,但仍可能需要注意控制抗生素药物的使用来减少细菌的交叉耐药性。

高通量测序技术使研究人员对大熊猫肠道菌

群的群落结构和生物学特性有了深层次的认识,同时也带给我们更多的问题和思考。我们认为今后大熊猫肠道菌群研究的方向可能包括:利用多组学的方法研究大熊猫肠道菌群的结构和功能;扩充样本量来确定大熊猫的肠道核心菌群以及主要影响因素;在肠道单个细菌方面超越分离株的生物学特性,更注重细菌在大熊猫肠道中的生存状态和相互作用机制的研究等。

参考文献

- [1] Wei FW, Hu YB, Yan L, et al. Giant pandas are not an evolutionary cul-de-sac: evidence from multidisciplinary research[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 4-12
- [2] Zhou ZY, Zhou XX, Zhong ZJ, et al. Investigation of antibacterial activity of *Bacillus* spp. isolated from the feces of Giant Panda and characterization of their antimicrobial gene distributions[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(12): 3129-3136
- [3] Zhu L, Wu Q, Dai J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(43): 17714-17719
- [4] Tun HM, Mauroo NF, San Yuen C, et al. Microbial diversity and evidence of novel homoacetogens in the gut of both geriatric and adult giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e79902
- [5] Fang W, Fang ZM, Zhou P, et al. Evidence for lignin oxidation by the giant panda fecal microbiome[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50312
- [6] Li RQ, Fan W, Tian G, et al. The sequence and *de novo* assembly of the giant panda genome[J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 311-317
- [7] Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions[J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2013, 25(1): 4-15
- [8] Qiu XM, Mainka SA. Review of mortality of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1993, 24(4): 425-429
- [9] Zhan XJ, Li M, Zhang ZJ, et al. Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve[J]. *Current Biology*, 2006, 16(12): R451-R452
- [10] Jin CZ, Ciochon RL, Dong W, et al. The first skull of the earliest giant panda[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(26): 10932-10937
- [11] Jin K, Xue CY, Wu XL, et al. Why does the giant panda eat bamboo? A comparative analysis of appetite-reward-related genes among mammals[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22602
- [12] Wu J, Jiang YK, Cao GW, et al. Isolation and identification of two pathogenic strains from the gut of the giant panda[J]. *Chinese Veterinary Science and Technology*, 1988(11): 36-39 (in Chinese)
郭捷, 姜永康, 曹国文, 等. 两例大熊猫肠道致病菌的分离与鉴定[J]. *中国兽医科技*, 1988(11): 36-39
- [13] Hirayama K, Kawamura S, Mitsuoka T, et al. The faecal flora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 67(4): 411-415
- [14] Williams CL, Willard S, Kouba A, et al. Dietary shifts affect the gastrointestinal microflora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2013, 97(3): 577-585

- [15] Zhang ZH, He GX, Wang XL, et al. The study on the giant panda's intestinal flora[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1995, 15(3): 170-175 (in Chinese)
张志和, 何光昕, 王行亮, 等. 大熊猫肠道正常菌群的研究[J]. *兽类学报*, 1995, 15(3): 170-175
- [16] Xiong Y, Li DS, Wang Y, et al. Study of the bacterial isolation, identification and distribution of the feces from giant panda in wolong nature protection area[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2000, 31(2): 165-170 (in Chinese)
熊焰, 李德生, 王印, 等. 卧龙自然保护区大熊猫粪样菌群的分离鉴定与分布研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(2): 165-170
- [17] Peng GN, Xiong Y, Li DS, et al. Preliminary study on the changes of intestinal normal flora in sub adult giant panda[J]. *Sichuan Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1999, 26(5): 26 (in Chinese)
彭广能, 熊焰, 李德生, 等. 亚成体大熊猫肠道正常菌群变化的初步研究[J]. *四川畜牧兽医*, 1999, 26(5): 26
- [18] Lu HF, Wei GF, Li ZK, et al. ERIC-PCR based fingerprinting and molecular hybridization to analyze the characteristics of intestinal microflora of giant panda[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2005, 17(2): 81-84 (in Chinese)
鲁海峰, 魏桂芳, 李仲达, 等. ERIC-PCR 分子杂交技术分析大熊猫肠道菌群结构[J]. *中国微生态学杂志*, 2005, 17(2): 81-84
- [19] Wei GF, Lu HF, Zhou ZH, et al. The microbial community in the feces of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as determined by PCR-TGGE profiling and clone library analysis[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(1): 194-202
- [20] Wang Y, He TM, Zhong ZJ, et al. Analysis of the characteristics of intestinal flora with seasonal shift in subadult giant panda by ERIC-PCR fingerprinting[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2011, 41(8): 778-783 (in Chinese)
王焱, 何廷美, 钟志军, 等. 不同季节亚成体大熊猫肠道菌群 ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(8): 778-783
- [21] He TM, Cui TT, Zhong ZJ, et al. Research on diversity of intestinal flora in an adult giant panda based on the 16S rDNA-RFLP[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 42(11): 1121-1127 (in Chinese)
何廷美, 崔婷婷, 钟志军, 等. 成年大熊猫肠道菌群多样性的16S rDNA-RFLP 分析[J]. *中国兽医科学*, 2013, 42(11): 1121-1127
- [22] Luo YJ, He TM, Zhong ZJ, et al. The diversity of intestinal bacterial flora of captive giant panda in the prophase of diet conversion[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(12): 1896-1901 (in Chinese)
罗永久, 何廷美, 钟志军, 等. 圈养大熊猫食性转换前期肠道细菌多样性[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(12): 1896-1901
- [23] Luo YJ, Zhong ZJ, Peng GN, et al. Characterization of intestind bacterial diversity for different feeding habit animals by ERIC-PCR fingerprinting[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(11): 1764-1769 (in Chinese)
罗永久, 钟志军, 彭广能, 等. 不同食性动物肠道菌群的ERIC-PCR 指纹图谱分析[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(11): 1764-1769
- [24] Li Y, Guo W, Han SS, et al. The evolution of the gut microbiota in the giant and the red pandas[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10185
- [25] Xue ZS, Zhang WP, Wang LH, et al. The bamboo-eating giant panda harbors a carnivore-like gut microbiota, with excessive seasonal variations[J]. *mBio*, 2015, 6(3): e00022-15
- [26] Sun FL, Liu JX, Xi D, et al. Pathogens of intestinal diseases in giant panda[J]. *Journal of Economic Animal*, 2002, 6(2): 20-23 (in Chinese)
孙飞龙, 刘敬贤, 席丹, 等. 大熊猫肠道疾病致病病菌[J]. *经济动物学报*, 2002, 6(2): 20-23
- [27] Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, et al. Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2014, 68: 217-235
- [28] Zhang AY, Wang HN, Tian GB, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 Giant pandas[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33(5): 456-460
- [29] Wang X, Yan QG, Xia XD, et al. Serotypes, virulence factors, and antimicrobial susceptibilities of vaginal and fecal isolates of *Escherichia coli* from giant pandas[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(17): 5146-5150
- [30] Li J, Zhong ZJ, Zhou ZY, et al. Isolation, identification and partial biology research of *Bacillus* in giant panda intestines[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(2): 351-359 (in Chinese)
李进, 钟志军, 周紫晓, 等. 大熊猫肠道芽孢杆菌的分离鉴定及部分生物学特性研究[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(2): 351-359
- [31] Wang Q, He GX, Yu XM, et al. Study on the clinical application of probiotics in the treatment of the giant panda disease[J]. *China Microecology Journal*, 1998, 10(6): 349-350,353 (in Chinese)
王强, 何光昕, 余星明, 等. 微生态制剂在大熊猫疾病治疗中的临床应用研究[J]. *中国微生态学杂志*, 1998, 10(6): 349-350,353
- [32] Rong H, Qiu CS, Hu GQ, et al. Isolation of cellulolytic anaerobic strain from the giant pandas intestines and its biological characteristics and phylogeny[J]. *China Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(2): 239-242 (in Chinese)
荣华, 邱成书, 胡国全, 等. 一株大熊猫肠道厌氧纤维素菌的分离鉴定, 系统发育分析及生物学特性的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(2): 239-242
- [33] Fan C, Li SJ, Li CL, et al. Isolation, identification and cellulase production of a cellulolytic bacterium from intestines of giant panda[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(9): 1113-1121 (in Chinese)
樊程, 李双江, 李成磊, 等. 大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质[J]. *微生物学报*, 2012, 52(9): 1113-1121
- [34] Zhao S, Lv WT, Liu J, et al. Isolation of cellulose degradable-bacteria from giant panda's intestines and its enzymatic characterization[J]. *Journal of Microbiology in China*, 2015, 35(1): 73-78 (in Chinese)
赵珊, 吕雯婷, 刘杰, 等. 1株大熊猫肠道纤维素降解菌的分离鉴定及其酶学性质[J]. *微生物学杂志*, 2015, 35(1): 73-78
- [35] Zhou XX, He TM, Peng GN, et al. Isolation, indentification and resistance analysis of 7 bacillus strains from the intestinal tract of giant panda[J]. *China Veterinary Science*, 2013, 43(11): 1115-1121 (in Chinese)
周潇潇, 何廷美, 彭广能, 等. 大熊猫肠道芽孢杆菌的分离鉴定及其抗性研究[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(11): 1115-1121
- [36] Zhou ZY, Zhou XX, Li J, et al. Transcriptional regulation and adaptation to a high-fiber environment in *Bacillus subtilis* HH2 isolated from feces of the giant panda[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116935