



鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落结构及功能预测分析

赖政^{1,2,3,4}, 盛颖², 肖力婷², 杨慧林², 阳文静^{1,3}, 简敏菲^{1,2,3*}

- 1 江西师范大学地理与环境学院, 江西 南昌 330022
- 2 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022
- 3 江西师范大学鄱阳湖湿地与流域研究教育部重点实验室, 江西 南昌 330022
- 4 佛山科学技术学院医学院, 广东 佛山 528225

赖政, 盛颖, 肖力婷, 杨慧林, 阳文静, 简敏菲. 鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落结构及功能预测分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4302-4314.

LAI Zheng, SHENG Ying, XIAO Liting, YANG Huilin, YANG Wenjing, JIAN Minfei. Gut microbiota structure and function of Siberian crane (*Grus leucogeranus*) overwintering in Poyang Lake[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4302-4314.

摘要:【目的】分析鄱阳湖越冬白鹤在人工生境中肠道微生物群落组成和代谢功能特征。【方法】利用 16S rRNA 基因高通量测序技术比较藕田和稻田 2 种不同人工生境鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落组成和重建未观察到的状态(phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, PICRUST)进行功能预测。【结果】稻田白鹤肠道微生物 α 多样性(Ace、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数)高于藕田白鹤, 但未达到显著水平($P>0.05$)。基于 Binary-Jaccard 距离矩阵的 β 多样性分析发现 2 种人工生境的白鹤肠道微生物群落结构差异显著($R^2=0.312$, $P<0.05$)。不同人工生境鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物组成存在差异, 藕田白鹤肠道微生物的优势菌属是土孢杆菌属、罗布西亚属和苏黎世杆菌属; 稻田白鹤肠道微生物的优势菌属是乳酸杆菌属、里氏杆菌属和球菌属。线性判别分析[line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe]分析发现乳杆菌科、乳酸杆菌属、苏黎世杆菌属等具有较强发酵代谢碳水化合物能力的微生物在 2 种人工生境下差异显著。PICRUST 功能预测表明鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物与新陈代谢、基因信息处理、环境信息处理和人类疾病等功能相关, 在 level 1 水平上, 有 5 类代谢通路具有显著性差异($P<0.001$)。【结论】

资助项目: 国家自然科学基金(41967055, 32260016); 江西省地质局科技研究项目(2022JXDZKJKY05); 江西省自然科学基金(20212BAB203023)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41967055, 32260016), the Scientific Research Projects of Jiangxi Geological Bureau (2022JXDZKJKY05), and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212BAB203023).

*Corresponding author. E-mail: jianminfei0914@163.com

Received: 2023-03-24; Accepted: 2023-06-12; Published online: 2023-06-30

两种人工生境中鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物组成和群落特征差异较大, 可能是由于同域觅食鸟类的种类、数量以及食物来源的不同。同时, PICRUSt 功能预测揭示了不同人工生境中鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物功能基因丰度的显著差异, 表明白鹤可以通过调整自身肠道微生物组成来适应不同人工生境食物资源的变化带来的挑战。本研究对不同人工生境下白鹤肠道微生物的组成和功能潜力的研究结果可以为鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物的研究提供一定依据, 对于白鹤的保护和制定管理策略具有一定的参考价值和现实意义。

关键词: 白鹤; 肠道微生物; 高通量测序; 功能预测; 鄱阳湖

Gut microbiota structure and function of Siberian crane (*Grus leucogeranus*) overwintering in Poyang Lake

LAI Zheng^{1,2,3,4}, SHENG Ying², XIAO Liting², YANG Huilin², YANG Wenjing^{1,3}, JIAN Minfei^{1,2,3*}

1 College of Geography and Environment, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

2 Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

3 Key Laboratory of Poyang Lake Wetland and Watershed Research, Ministry of Education, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

4 School of Medicine, Foshan Institute of Science and Technology, Foshan 528225, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To analyze the composition and metabolic characteristics of gut microbiota in Siberian crane (*Grus leucogeranus*) overwintering in the Poyang Lake. [Methods] The 16S rRNA gene high-throughput sequencing was employed to reveal the gut microbiota composition and PICRUSt to predict the function of Siberian crane overwintering in two artificial habitats (lotus field and paddy field) in the Poyang Lake. [Results] The alpha diversity indexes (Ace, Chao1, Shannon, and Simpson) showed that the gut microbiota diversity of Siberian crane in the paddy field were higher than those in the lotus field ($P>0.05$). The beta diversity based on Binary-Jaccard distance matrix revealed significant differences in the gut microbiota structure between the two artificial habitats ($R^2=0.312$, $P<0.05$). The Siberian crane overwintering in different artificial habitats of the Poyang Lake showed varied gut microbiota composition. *Terrisporobacter*, *Romboutsia*, and *Turicibacter* were dominant genera in the gut of Siberian cranes in the lotus field, while *Lactobacillus*, *Riemerella*, and *Catelllicoccus* in the paddy field. Line discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis showed that the microorganisms like *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus*, and *Turicibacter* with a strong ability to metabolize carbohydrates had significantly different relative abundance between the two artificial habitats. Functional prediction of PICRUSt showed that the intestinal microorganisms were mainly involved in metabolism, gene information processing, environmental information processing, and human diseases. At level 1, there were 5 types of metabolic pathways with significant differences ($P<0.001$). [Conclusion] Different species and

number of birds and different food sources of the two artificial habitats resulted in significant differences in gut microbiota composition and characteristics of Siberian cranes overwintering in the Poyang Lake. PICRUSt functional prediction showed that there were significant differences in the abundance of functional genes of gut microbiota in the Siberian cranes overwintering in different artificial habitats, suggesting that Siberian cranes could adapt to the changes of food resources in artificial habitats by adjusting their gut microbiota. We preliminarily studied the composition and function of gut microbiota in the Siberian cranes overwintering in Poyang Lake. The findings underpin the relevant research and provide references for the conservation of overwintering Siberian cranes and the formulation of management measures.

Keywords: Siberian crane; intestinal microorganisms; high-throughput sequencing; function prediction; Poyang Lake

动物具有动态而复杂的肠道菌群，肠道微生物群落与动物健康密切相关。肠道菌群与宿主共同作用，在长期的进化过程中形成一种协同进化且复杂的共生关系^[1]。肠道微生物群落在地理、营养、免疫等多方面因素影响下，通过代谢功能的改变来影响动物宿主的健康^[2-3]。随着肠道微生物研究的不断深入，人们通过研究动物肠道微生物菌群结构及其代谢功能来评估动物生活状况^[4]。

已有研究证明，鸟类肠道微生物菌群容易受到多方面因素的影响而处于一个相对动态变化的状态，如鸟的种类、越冬期的不同、食性等多重因素^[5-7]。野生鸟类有复杂的生活史，且具有飞翔能力，可以进行大范围的领地跨越，这导致其肠道微生态环境更加复杂^[8]。同时，因野外采样困难、DNA 提取量低等因素，导致人们对于野生鸟类肠道微生物的研究较少并具挑战性^[9]。随着分子生物学技术的发展，高通量测序技术的 16S rRNA 基因 V3-V4 区扩增片段测序给肠道微生物研究带来了巨大变化，推动了野生鸟类肠道微生物群落以及与之相关病原菌等领域的研究^[10]。

在世界 15 种鹤类中，白鹤是唯一被世界自然保护联盟列入极危等级的物种，是我国一级重点保护野生动物^[11]，是江西省的“省鸟”。近年来，

作为世界上白鹤越冬重要栖息地的鄱阳湖受人为因素干扰影响严重^[12]，白鹤栖息地不断退化，适宜的天然觅食生境不断丧失，大量白鹤离开自然生境，前往稻田和藕田觅食，人工生境已成为白鹤的重要觅食地^[13]。但鄱阳湖越冬白鹤能否更好地适应人工生境尚不清楚，亟需加强白鹤对人工生境的适应性研究。以往的研究主要集中于鸟类的食物食性^[14]、觅食地特征^[15]、时间分配与行为节律^[16]和取食行为^[17]等外部环境来评估白鹤在人工生境的生存现状，但缺乏对白鹤内部环境的探讨。鉴于此，本研究通过 16S rRNA 基因高通量测序技术对鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落组成和功能进行分析，揭示鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落组成和代谢功能，以期了解鄱阳湖越冬白鹤种群生存现状并开展种群保护研究，为鄱阳湖候鸟保护政策的制定和白鹤的保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

鄱阳湖(28°11′-29°51′N、115°49′-116°46′E)位于长江中游和下游交界处，长江南岸，江西北部，是中国第一大淡水湖。鄱阳湖区光照充足，多年平均气温为 16.5-17.8 °C，夏季高温多雨，冬

季寒冷干燥, 雨量充沛, 年平均降水量达 1 450–1 550 mm, 发达的水系和丰富的食物资源, 为越冬水鸟提供了良好的栖息环境。采样地点位于南昌五星白鹤小区和康山垦殖场。两个采样地点与鄱阳湖仅一堤之隔, 距离越冬白鹤栖息的自然生境较近, 气候、地理特征比较一致, 白鹤白天在藕田或稻田觅食, 夜晚飞回湖区休息。南昌五星白鹤小区地处南昌市东郊鲤鱼洲, 濒临鄱阳湖, 地理位置为 28°43′–28°48′N、116°11′–16°19′E, 小区地势平坦, 属鄱阳湖冲积平原带, 土壤肥沃, 有机质含量丰富, pH 为 5.8–6.5。境内气候温和, 日照充足, 雨量充沛, 属亚热带季风气候, 年平均气温 17.5 °C, 全年日照时数 1 700–2 000 h, 无霜期 276 d, 年平均降雨量为 1 520 mm。康山垦殖场位于余干县西北部, 鄱阳湖南岸, 康山大堤内, 地理位置为 28°51′–28°54′N、115°22′–115°35′E。属亚热带季风气候, 温和湿润, 四季分明, 阳光充足, 雨量充沛, 土壤肥沃。场区环境优美, 空气清新, 沿鄱阳湖洲滩, 冬季有数以万计的白天鹅、白鹤、大雁等珍禽候鸟觅食栖息。

1.2 样品采集

根据长期野外观测, 在鄱阳湖越冬的白鹤, 每年的 10 月下旬飞来, 11 月中旬已全部到达, 12 月至翌年 1 月成小群活动, 2 月下旬到 3 月初, 逐渐集成大群北返, 至 3 月底全部北迁, 越冬期达 150 d 左右。在鄱阳湖越冬期间, 停留在稻田或藕田人工生境取食的白鹤, 直至稻田或藕田食物耗尽方才离开。根据白鹤越冬习性, 利用非损伤采样技术, 于 2021 年 12 月 20 日和 2021 年 12 月 23 日分别在江西省上饶市余干县康山垦殖场稻田和江西南昌高新区鲤鱼洲五星白鹤小区藕田采集白鹤粪便样品。为确保样本具有代表性, 在采集之前, 用双筒望远镜观察白鹤集中取食区域, 在稻田和藕田分别选择集群较大的群体 3 个, 确保采样地点为白鹤觅食时段周围 50 m

范围内没有其他鸟类物种存在及活动, 待白鹤取食结束离开取食地后, 立即前往觅食地点进行采集。根据白鹤留下的足迹或取食坑, 确定为白鹤觅食地点。每集群采取 3 份样本, 每样地各采取 9 份样本, 共 18 份样本, 样本编号分别为 KSD1a、KSD1b、KSD1c、KSD2a、KSD2b、KSD2c、KSD3a、KSD3b、KSD3c 和 WXO1a、WXO1b、WXO1c、WXO2a、WXO2b、WXO2c、WXO3a、WXO3b 和 WXO3c。佩戴消毒手套并用镊子采集白鹤新鲜粪便样品, 去除接触地面的部分后, 迅速将样品放入 10 mL 的无菌 EP 管中, 置于 –80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.3 白鹤食物来源分析

在康山垦殖场稻田和五星白鹤小区藕田采集白鹤粪便样品时, 根据白鹤留下的取食坑, 采集白鹤觅食地周围的植物, 分析白鹤在稻田和藕田的食物来源。结果发现白鹤在稻田以散落的稻谷为食, 在藕田则以莲藕的块茎为食。

1.4 DNA 提取和 PCR 扩增

本研究采用粪便微生物基因组 DNA 提取试剂盒(Solarbio)提取粪便样品中的细菌基因组 DNA, 提取方法严格按照试剂盒制造商的具体操作步骤进行, 1%琼脂糖凝胶电泳检验粪便样品总 DNA 的提取质量, –20 °C 冷冻保存备用。利用通用引物 338F (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′) 和 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)^[18] 作为本研究的扩增引物, PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共循环 32 次; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。同一样本 PCR 产物经回收、纯化后等量混样, 通过百迈客生物科技有限公司进行建库, 利用 MiSeq PE250 平台(Illumina 公司)进行测序。

1.5 测序数据分析

利用 Trimmomatic v0.33 对原始 DNA 序列进行过滤处理, 去除嵌合体, 得到优化序列; 使

用 Usearch 软件对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类、获得分类操作单元数 (operational taxonomic units, OTUs); 使用 R 语言工具绘制主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 和线性判别效果分析 [line discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe] 图; 使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 样品测序信息概况

通过提取白鹤粪便样品并发现微生物总 DNA 经过 1% 凝胶电泳检测质量较好, PCR 扩增后得到 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区的基因片段均约为 300 bp, 回收扩增产物后进行高通量测序, 18 个样品测序共获得肠道细菌 2 001 502 对 reads, 双端 reads 质控、拼接后产生 1 663 870 条 clean reads, 每个样品至少产生 15 737 条 clean reads, 平均产生 92 437 条 clean reads。

2.2 肠道微生物群落的 α 多样性分析

根据人工生境 (藕田和稻田) 中白鹤肠道微生物 OTU 数量, 对其进行 α 多样性指数分析。Ace 指数和 Chao1 指数用以表征群落丰富度, Shannon 指数和 Simpson 指数则用来衡量群落的多样性。如表 1 所示, 每组样品的 Coverage 均达到 99.9% 以上, 表明检测结果可靠。比较藕田和稻田白鹤肠道微生物群落 α 多样性指数发现, 处于稻田的白鹤肠道细菌 Ace、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数的平均值均高于藕田, 但 4 种指数在两者间均无显著性差异。

2.3 肠道微生物的 β 多样性

2.3.1 层级聚类分析

通过使用不加权算术平均组对法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 算法构建的层级聚类分析 2 种不同人工生境下鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落组成的差异性。由图 1A 可知, 同一人工生境的白鹤粪便样品微生物细菌群落较好聚在一起, 表明样品重复性较好。

2.3.2 主坐标分析

通过使用主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 进一步探讨人工生境白鹤肠道微生物群落组成的差异性 (图 1B)。PCoA 分析解释了白鹤肠道细菌群落总变异的 67.84%, 其中 PC1 解释了细菌群落总变异的 58.07%, PC2 解释了细菌群落总变异的 9.77%。2 种人工生境的白鹤肠道细菌群落组间差异显著 ($R^2=0.312$, $P<0.05$)。

2.4 肠道微生物群落组成

2.4.1 门水平分类分析

对 2 种不同人工生境 18 份白鹤粪便样品进行细菌分类鉴定 (图 2), 检测的细菌分属于 13 个门。其中, 藕田白鹤粪便样品中共检测出 13 个门。其优势菌门为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*), 相对丰度从高到低依次为 91.83%、5.37%、1.20% 和 0.95%; 稻田白鹤粪便样品中共检测出 13 个门。优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门, 其相对丰度从高到低依次为 85.53%、4.49%、4.38% 和 2.48% (图 2A)。

表 1 人工生境白鹤粪便样品细菌的序列信息和多样性指数

Table 1 Sequence information and diversity indices of bacteria from fecal samples of *Siberian cranes* in artificial habitats

| Samples | OTUs | Ace | Chao1 | Shannon | Simpson | Coverage |
|---------|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|------------------|
| WXO | 163.11±29.17 | 173.87±26.63 | 179.95±29.55 | 2.99±0.29 | 0.74±0.05 | 0.999 4±0.000 40 |
| KSD | 169.44±20.91 | 178.82±19.71 | 182.66±19.62 | 3.17±0.42 | 0.78±0.05 | 0.999 9±0.000 03 |

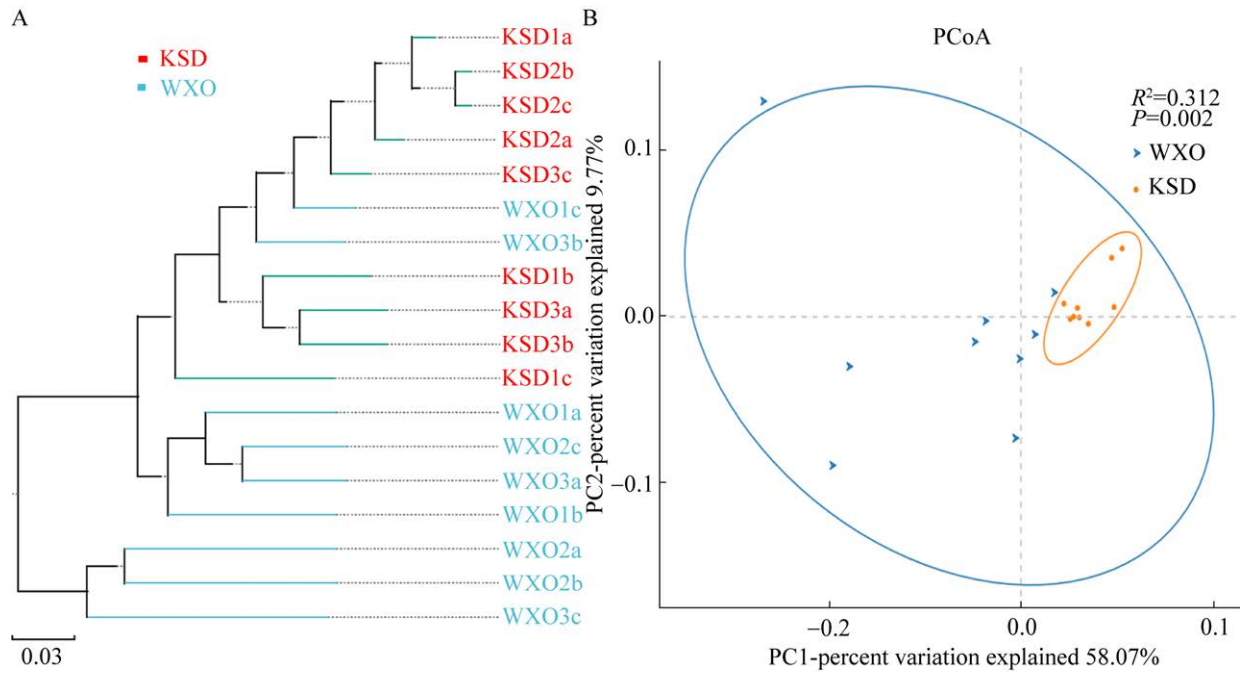


图 1 白鹤肠道微生物群落结构层级聚类(A)和 PCoA 聚类分析(B)

Figure 1 Hierarchical clustering of the gut microbial community structure of *Siberian cranes* by UPGMA (A) and PCoA clustering analysis (B).

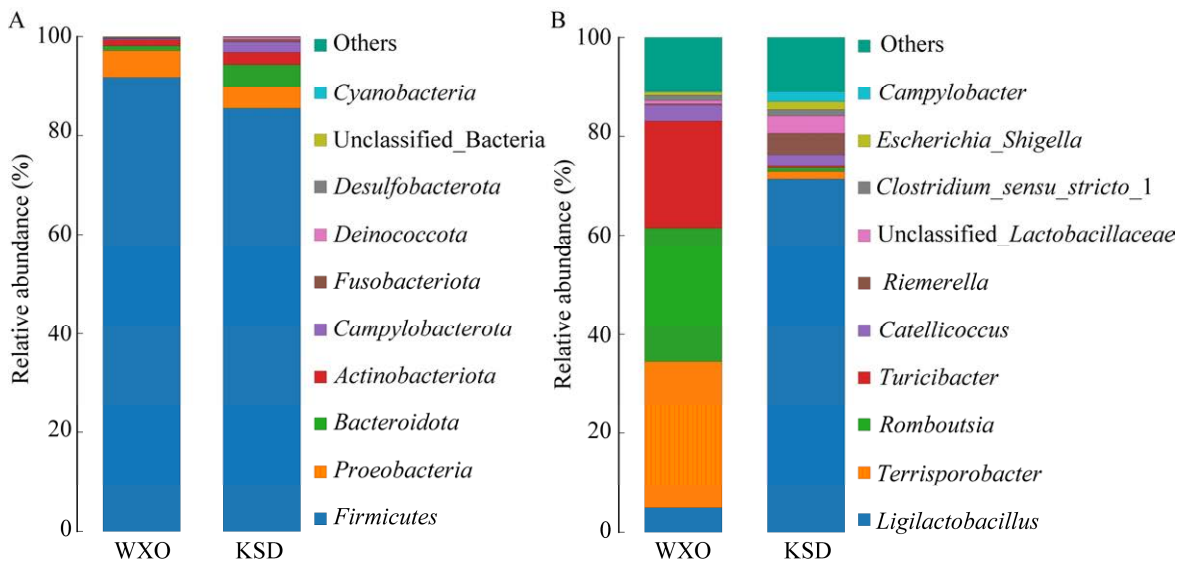


图 2 白鹤肠道细菌的门(A)和属(B)组成

Figure 2 Composition of the phylum (A) and genera (B) of gut bacteria of *Siberian cranes*.

2.4.2 属水平分类分析

18 份白鹤粪便样品共检测到 126 个属。其中，藕田白鹤粪便样品中共检测出 125 个属，相

对丰度高于 1% 的属有 6 个，均为已知属，分别为土孢杆菌属 (*Terrisporobacter*)、罗布西亚属 (*Romboutsia*)、苏黎世杆菌属 (*Turicibacter*)、乳酸

杆菌属(*Ligilactobacillus*)、球菌属(*Catelicoccus*)和梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*), 相对丰度从高到低依次为 29.64%、26.94%、21.63%、4.87%、3.25%和 1.11%。稻田白鹤粪便样品中共检测出 126 个属, 相对丰度高于 1% 的属有 8 个, 包括 7 个已知属和 1 个未知属。已知属分别为乳酸杆菌属、里氏杆菌属(*Riemerella*)、球菌属、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、埃希氏-志贺菌属(*Escherichia_Shigella*)、土孢杆菌属和梭菌属, 其相对丰度从高到低依次为 71.26%、4.38%、2.18%、2.05%、1.63%、1.51%和 1.27% (图 2B)。

2.5 肠道微生物群落差异菌种分析

通过从门水平到属水平上应用 LEfSe 分析比较藕田和稻田白鹤肠道微生物群落差异类群, 结果显示(图 3), 稻田白鹤肠道微生物相对丰度显著高于藕田白鹤的有 1 个门[弯曲杆菌门

(*Campylobacterota*)], 2 个纲[杆菌纲(*Bacilli*)和弯曲杆菌纲(*Campylobacteria*)], 2 个目[乳杆菌目(*Lactobacillales*)和弯曲杆菌目(*Campylobacterales*)], 2 个科[乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)和弯曲杆菌科(*Campylobacteraceae*)]和 4 个属[里氏杆菌属(*Riemerella*)、乳酸杆菌属(*Ligilactobacillus*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)和 unclassified *Lactobacillaceae*]。藕田白鹤肠道细菌相对丰度显著高于稻田白鹤的有 1 个纲[梭菌纲(*Clostridia*)], 2 个目[丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)和消化链球菌目(*Peptostreptococcales_tissierellales*)], 2 个科[丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*)和消化链球菌科(*Peptostreptococcaceae*)]和 3 个属[苏黎世杆菌属(*Turicibacter*)、罗布西亚属(*Romboutsia*)和土孢杆菌属(*Terrisporobacter*)]。

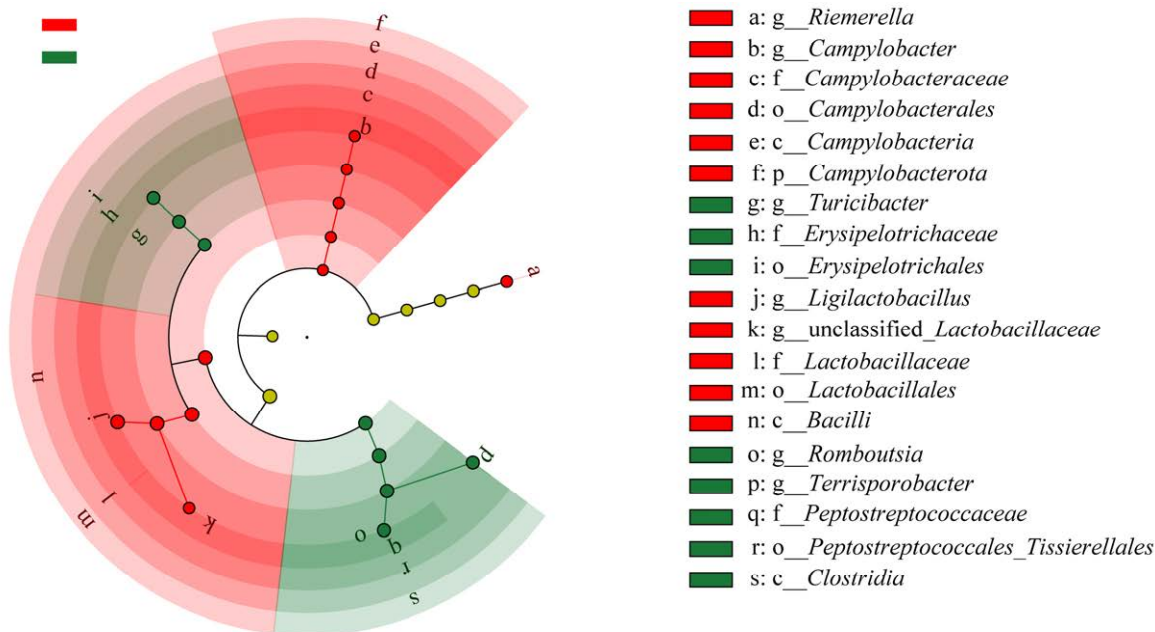


图 3 白鹤肠道微生物群落的 LEfSe 分析

Figure 3 LEfSe analysis of gut microbial community of *Siberian cranes*. From the inside to the outside, it is phylum, class, order, family, and genera; The size of the small circle represents the relative abundance of the species under the classification level; Species with no significant differences are marked in yellow, and species with significant differences are marked with coloring.

2.6 基于 OTU 的白鹤肠道菌群相关性网络分析

为评估 2 组微生物群落种间的关系, 根据秩和检验得到基于 OTU 水平的差异物种绘制种间相关性网络图(图 4)。藕田和稻田的白鹤肠道微生物群落均形成了各自独特的微生物网络。稻田白鹤肠道微生物网络中包含 35 个节点和 311 条边, 其中正相关 83.54%, 负相关 16.46%, 其网络中的节点主要属于厚壁菌门和变形菌门, 占所有节点的 71.73%, 也是细菌群落的优势菌门。藕田白鹤肠道微生物网络包含 36 个节点和 168 条边, 其中正相关 86.02%, 负相关 13.98%, 其网络中的节点主要属于厚壁菌门和变形菌门, 占所有节点的 72.22%, 亦是细菌群落的优势菌门。

表明稻田白鹤肠道微生物网络比藕田更为复杂, 微生物间的联系更加紧密。

2.7 PICRUSt 功能预测

PICRUSt 可以根据 16S rRNA 基因 V3-V4 区扩增片段测序数据对样品中的微生物功能类别相对丰度进行基于数据库的功能预测。通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)代谢途径的组成及差异分析, 可以观测不同分组的样品之间微生物群落的功能基因在代谢途径上的差异和变化, 是研究群落样本为适应环境变化发生的代谢功能改变的有效手段, KEGG 代谢途径将生物代谢通路分为 3 个 level, 分别是 level 1、level 2 和 level 3, level 1 和 level 2 的结果如图 5 所示。

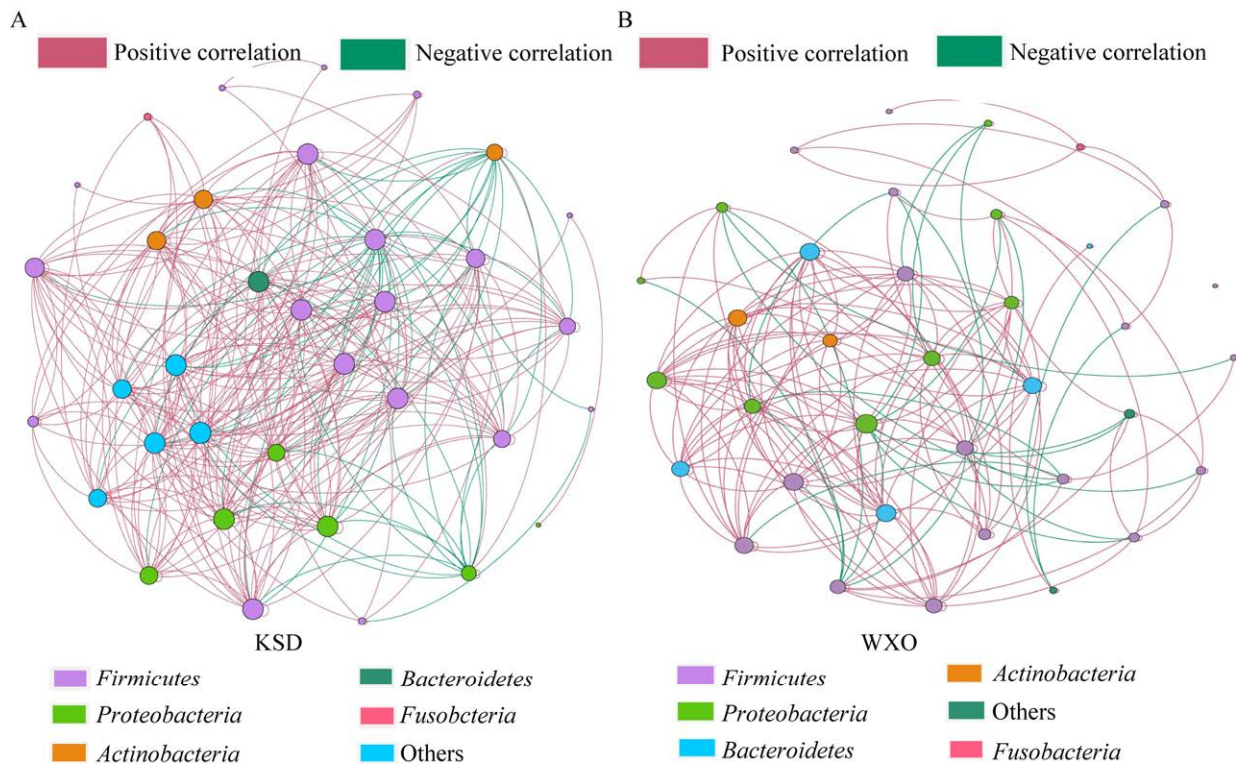


图 4 白鹤肠道微生物群落的相关性网络图

Figure 4 Correlation network analysis of gut microbial community of *Siberian cranes*. A: Gut microbial community of *Siberian cranes* in Kangshan reclamation farm. B: Gut microbial community of *Siberian cranes* in Wuxing farm. The node size is proportional to the relative abundance of each OTU; Links between nodes present a strong correlation between the source and the target OTU (Spearman's correlation >0.8 or ≤ 0.8); Different node colors indicate different phylum to which the OTU belongs; Line color indicates direction, as shown in the legend.

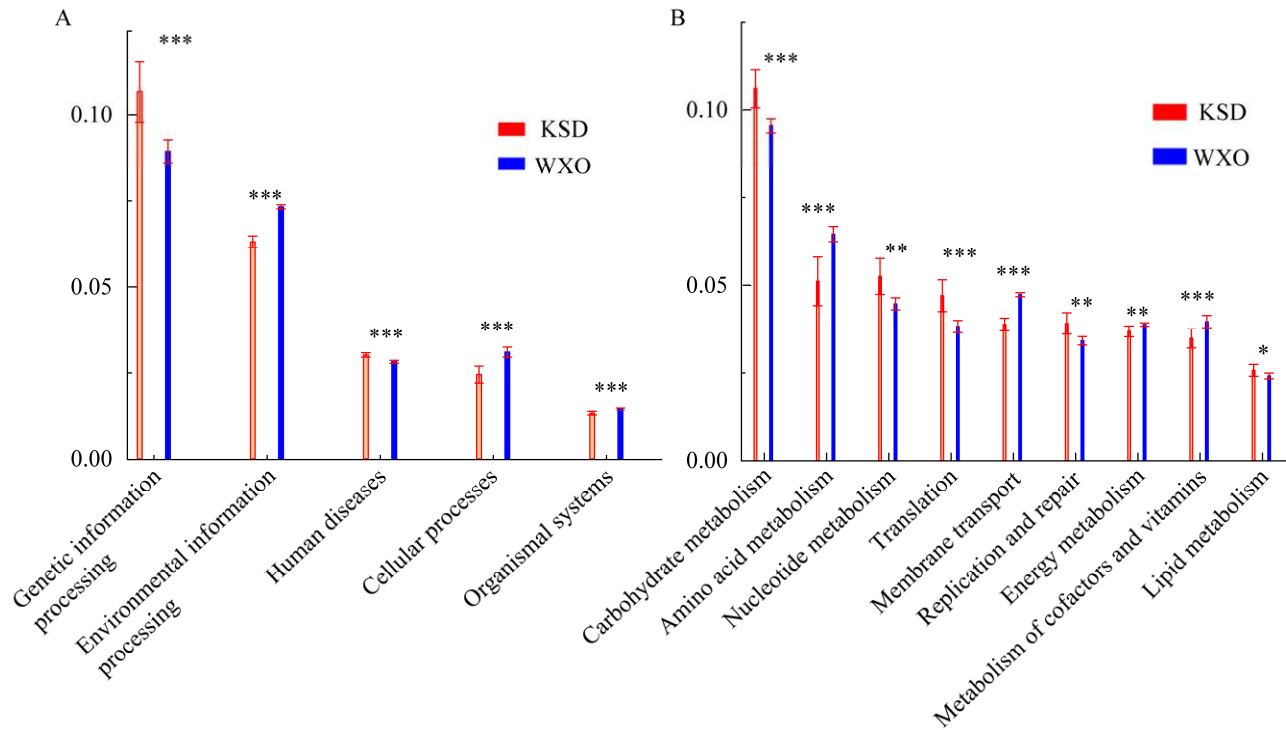


图 5 KEGG 代谢途径差异分析柱状图

Figure 5 Histogram for differential analysis of gut microbial genes of KEGG metabolic pathways at level 1 (A) and level 2 (B). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

在 level 1 水平上, 2 组白鹤肠道菌群基因与 6 类代谢通路相关, 其中有 5 类代谢通路具有显著性差异。稻田白鹤中的基因信息处理(genetic information processing)和人类疾病(human diseases)的功能基因丰度显著高于藕田白鹤, 而环境信息处理(environmental information processing)、细胞过程(cellular processes)和生物体系统(organismal systems)等 3 类功能基因的丰度则显著低于藕田白鹤。

在 level 2 水平上, 2 组白鹤肠道菌群基因与 10 类代谢通路相关, 其中有 9 类代谢通路具有显著性差异。稻田白鹤肠道微生物中的碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、翻译(translation)、复制修复(replication and repair)、脂代谢(lipid metabolism)等 5 类功能基因的丰度显著高于藕

田白鹤, 而氨基酸代谢(amino acid metabolism)、膜转运(membrane transport)、能量代谢(energy metabolism)和辅助因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)等 4 类功能基因的丰度则显著低于藕田白鹤。

3 讨论

肠道微生物群落多样性的维持对于动物的生命活动具有十分重要的意义^[19]。本研究采用细菌 16S rRNA 基因高通量测序技术对 2 种不同人工生境的白鹤肠道微生物结构组成进行了分析。结果表明, 2 种不同人工生境白鹤肠道微生物的 Ace、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数均无显著性差异。本研究中基于 PCoA 分析不同人工生境的白鹤肠道微生物结构组成, 发现稻田白鹤和藕田白鹤肠道微生物群落组间差异显著

($R^2=0.312$, $P<0.05$)。迁徙候鸟有着复杂的迁徙周年生活史, 不同种群候鸟在混群觅食时, 因共享环境中的水、空气、土壤等媒介, 或者无意识的粪食促进肠道微生物的转移, 导致肠道微生物的种间交互传播^[20]。何文韵等^[21]的研究发现, 康山垦殖场人工生境中有养殖水塘、稻田等类型多样的微生境, 候鸟多样性高于五星白鹤小区。作者在野外采样观察也发现, 康山垦殖场与白鹤同域觅食鸟类数量显著高于五星白鹤小区藕田白鹤。因此, 认为同域的候鸟种类和数量越多, 鸟类肠道微生物进行种间交互作用的可能性和交互作用的程度可能也越大。这可能是导致 2 种不同人工生境的白鹤肠道微生物差异显著的重要原因。

本研究发现 2 种不同人工生境的白鹤肠道微生物群落组成主要为厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门这 4 种类群, 以往的研究同样表明厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门是大部分鸟类肠道微生物中的优势类群^[5,22]。Grond 等^[23]的研究发现鸟类肠道微生物的核心类群组成相同。本研究发现 2 种不同人工生境白鹤肠道在门水平上的优势类群相同, 且在共线性网络中, 大多数节点属于厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门, 推测人工生境变化对白鹤肠道微生物群落主要组成影响不大。4 种类群在 2 种人工生境中所占比例不同, 厚壁菌门是 2 种人工生境中占比最大的类群。厚壁菌门是肠道中最为主要的一类细菌, 能够帮助肠道中的复杂碳水化合物、脂肪酸和多糖的分解^[24]。Zhang 等^[25]的研究发现, 肠道中厚壁菌门的相对丰度较高可能与越冬期白头鹤的植物来源食物有关。本文中越冬白鹤以莲藕、稻谷等植物来源食物为主, 因而可能对 2 种不同人工生境白鹤肠道微生物群落中的厚壁菌门的相对丰度影响不大。

在属水平上, 不同人工生境白鹤肠道微生物

群落组成差异较大。本研究表明藕田白鹤肠道微生物占比最大的是土孢杆菌属(占比达 29.64%), 罗布西亚属和苏黎世杆菌属紧随其后; 稻田白鹤肠道微生物占比最大的是乳酸杆菌属(占比高达 71.26%), 其次是里氏杆菌属和弯曲杆菌属。本研究基于 LEfSe 分析亦发现, 藕田白鹤肠道微生物中土孢杆菌属、罗布西亚属和苏黎世杆菌属的相对丰度显著高于稻田白鹤, 而稻田白鹤肠道微生物中乳酸杆菌属、里氏杆菌属和弯曲杆菌属则显著高于藕田白鹤。本研究中处于藕田中的白鹤主要取食残留在底泥中的莲藕块茎, 而处于稻田中的白鹤则以散落的谷物为食, 而稻谷中淀粉含量显著高于莲藕中的淀粉($P<0.05$)^[26-27]。因而, 食物的改变也可能导致不同人工生境白鹤肠道微生物群落组间差异显著。以往研究表明, 土孢杆菌属^[28]、罗布西亚属^[29]和苏黎世杆菌属^[30]在维持宿主健康中扮演着重要角色, 其较高的丰度有利于宿主的生存。因此, 本研究结果表明, 处于藕田中的白鹤肠道中含有大量与肠道健康状况相关的微生物, 有利于维持其肠道生态平衡。里氏杆菌属^[31]和弯曲杆菌属^[32]是潜在致病菌, 可能导致宿主患病。这表明稻田白鹤可能遭受致病菌的侵袭, 需要给予更多的关注以及保护。有研究发现白头鹤和同域的家禽之间存在肠道潜在病原体的交互传播, 且两者的距离越近, 肠道潜在病原体交叉传播越容易^[33]。本研究在采样过程中, 发现稻田周边有较多家禽养殖, 白鹤与家禽在同一区域觅食, 这可能是导致稻田白鹤肠道里氏杆菌属和弯曲杆菌属显著高于藕田白鹤的原因。因此, 为了更好保护鄱阳湖越冬白鹤, 需要采取更多保护措施减少人类活动对白鹤的影响。

PICRUSt 软件广泛用于功能基因研究, 并将菌群多样性与宿主代谢情况联系起来^[34]。研究表明, PICRUSt 软件对肠道菌群功能基因预测的

准确度为 85%–90%^[35]。通过与 KEGG 数据库比对发现,白鹤肠道微生物编码的大多数基因与代谢相关。新陈代谢在 level 1 水平上丰度最高,全球和概览地图(global and overview maps)在 level 2 水平上丰度最高。在 level 2 水平上,2 组白鹤肠道菌群基因与 10 类代谢通路相关,其中有 9 类代谢通路具有显著性差异($P<0.05$),表现出不同人工生境白鹤肠道微生物群落在功能和代谢途径上的差异性,这可能为鄱阳湖越冬白鹤维持体内稳态、提高生态适应发挥重要作用。

4 结论

利用 16S rRNA 基因测序技术对鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物群落结构进行研究并确定了以厚壁菌门、变形菌门和放线菌门和拟杆菌门为主的核心菌群。藕田白鹤肠道微生物中土孢杆菌属、罗布西亚属和苏黎世杆菌属的相对丰度显著高于稻田白鹤,而稻田白鹤肠道中的里氏杆菌属和弯曲杆菌属的相对丰度显著高于藕田白鹤。2 种不同人工生境鄱阳湖越冬白鹤肠道微生物的多样性指数均无显著性差异,但基于 Binary-Jaccard 距离矩阵的 β 多样性分析发现 2 种人工生境的白鹤肠道微生物群落结构差异显著($R^2=0.312$, $P<0.05$)。基于 OTU 的白鹤肠道菌群相关性网络分析表明,稻田白鹤肠道微生物网络比藕田更为复杂,微生物间的联系更加紧密。基于 KEGG 代谢途径的组成及差异分析,白鹤肠道微生物编码的大多数基因与代谢相关,不同人工生境白鹤肠道微生物群落在功能和代谢途径上具有显著差异性($P<0.05$)。

致谢

感谢余干县康山垦殖场和南昌五星白鹤保护小区对野外采样的支持。

参考文献

- [1] 皮宇, 高侃, 朱伟云. 动物宿主—肠道微生物代谢轴研究进展[J]. 微生物学报, 2017, 57(2): 161-169.
PI Y, GAO K, ZHU WY. Advances in host-microbe metabolic axis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(2): 161-169 (in Chinese).
- [2] KOHL KD. Diversity and function of the avian gut microbiota[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(5): 591-602.
- [3] CRESCI GA, BAWDEN E. Gut microbiome: what we do and don't know[J]. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 2015, 30(6): 734-746.
- [4] AZIZ Q, DORÉ J, EMMANUEL A, GUARNER F, QUIGLEY EM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions[J]. *Neurogastroenterology and Motility: the Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 2013, 25(1): 4-15.
- [5] WAITE DW, TAYLOR MW. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 223.
- [6] WAITE DW, TAYLOR MW. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 673.
- [7] 赵广红, 周立志, 董元秋, 宋响微. 安徽升金湖越冬白头鹤(*Grus monacha*)肠道菌群组成的时间变化[J]. 湖泊科学, 2017, 29(3): 670-677.
ZHAO GH, ZHOU LZ, DONG YQ, SONG YW. The temporal variations of gut microbiota composition in overwintering Hooded Crane (*Grus monacha*) at Lake Shengjin, Anhui Province[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2017, 29(3): 670-677 (in Chinese).
- [8] 周立志. 鸟类肠道微生态学及其研究热点[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2018, 42(6): 14-21.
ZHOU LZ. Avian gut microecology and its research hot spot[J]. *Journal of Anhui University (Natural Sciences Edition)*, 2018, 42(6): 14-21 (in Chinese).
- [9] 王娟, 高泽中, 蒋一婷, 万冬梅. 不同食性野生鸟类肠道微生物研究进展[J]. 生态学报, 2021, 41(20): 7939-7945.
WANG J, GAO ZZ, JIANG YT, WAN DM. Research advances in the intestinal microbes in wild birds with different feeding habits[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(20): 7939-7945 (in Chinese).

- [10] 刘倩, 宋文涛, 樊国印, 熊衍文, 陈海婴, 吴葵. 高通量测序在鸟类肠道微生物中的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(12): 1025-1028, 1043.
LIU Q, SONG WT, FAN GY, XIONG YW, CHEN HY, WU K. Recent advances in understanding of the avian gut microbiome *via* high-throughput sequencing[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2020, 36(12): 1025-1028, 1043 (in Chinese).
- [11] 胡振鹏. 白鹤在鄱阳湖越冬生境特性及其对湖水水位变化的响应[J]. 江西科学, 2012, 30(1): 30-35, 120.
HU ZP. The habitat characteristics of white cranes to live through the winter in Poyang Lake and the reaction for water level changing in the lake[J]. Jiangxi Science, 2012, 30(1): 30-35, 120 (in Chinese).
- [12] 邵明勤, 黄志强, 钟平华, 植毅进. 江西水鸟野外识别与科研设计指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2022.
SHAO MQ, HUANG ZQ, ZHONG PH, ZHI YJ. Field Identification and Research Design Guidance of Waterbird in Jiangxi Province[M]. Beijing: Higher Education Press, 2022 (in Chinese).
- [13] 王文娟, 王榄华, 侯瑾谨. 人工生境已成为鄱阳湖越冬白鹤的重要觅食地[J]. 野生动物学报, 2019, 40(1): 133-137.
WANG WJ, WANG LH, HOU JJ. Man-made habitats have become important foraging areas of Siberian cranes[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2019, 40(1): 133-137 (in Chinese).
- [14] 侯瑾谨, 王亚芳, 金斌松, 王榄华, 王文娟. 鄱阳湖越冬白鹤在农业用地的食物组成[J]. 动物学杂志, 2019, 54(1): 15-21.
HOU JJ, WANG YF, JIN BS, WANG LH, WANG WJ. Food composition of Siberian cranes in agricultural fields in the Poyang Lake, China[J]. Chinese Journal of Zoology, 2019, 54(1): 15-21 (in Chinese).
- [15] 孙志勇, 黄晓凤. 鄱阳湖越冬白鹤觅食地特征分析[J]. 动物学杂志, 2010, 45(6): 46-52.
SUN ZY, HUANG XF. Analysis on the characteristics of feeding habitat of the wintering Siberian crane in Poyang Lake[J]. Chinese Journal of Zoology, 2010, 45(6): 46-52 (in Chinese).
- [16] 邵明勤, 龚浩林, 戴年华, 植毅进, 徐宁, 卢萍. 鄱阳湖围垦区藕塘越冬白鹤的时间分配与行为节律[J]. 生态学报, 2018, 38(14): 5206-5212.
SHAO MQ, GONG HL, DAI NH, ZHI YJ, XU N, LU P. Study on time budgets and behavioral rhythm of wintering Siberian cranes in a lotus pond reclamation area in Poyang Lake[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(14): 5206-5212 (in Chinese).
- [17] 植毅进, 卢萍, 戴年华, 邵明勤, 曾健辉. 鄱阳湖滨藕塘生境中白鹤取食行为研究[J]. 生态学报, 2019, 39(12): 4266-4272.
ZHI YJ, LU P, DAI NH, SHAO MQ, ZENG JH. Foraging behaviour of Siberian cranes in lotus pond habitats surrounding Poyang Lake[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(12): 4266-4272 (in Chinese).
- [18] DENNIS KL, WANG YW, BLATNER NR, WANG SY, SAADALLA A, TRUDEAU E, ROERS A, WEAVER CT, LEE JJ, GILBERT JA, CHANG EB, KHAZAIE K. Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10-producing T cells[J]. *Cancer Research*, 2013, 73(19): 5905-5913.
- [19] 张碧云, 杨红玲, 汪攀, 孙云章. 鱼类肠道微生物与宿主免疫系统相互作用研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3046-3058.
ZHANG BY, YANG HL, WANG P, SUN YZ. Advances in the interactions between intestinal microorganisms and host immune system in fish[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3046-3058 (in Chinese).
- [20] ALM EW, DANIELS-WITT QR, LEARMAN DR, RYU H, JORDAN DW, GEHRING TM, SANTO DOMINGO J. Potential for gulls to transport bacteria from human waste sites to beaches[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 615: 123-130.
- [21] 何文韵, 邵明勤, 植毅进, 戴年华, 卢萍, 涂小云. 鄱阳湖三个垦殖场的水鸟多样性[J]. 生态学杂志, 2019, 38(9): 2765-2771.
HE WY, SHAO MQ, ZHI YJ, DAI NH, LU P, TU XY. Waterbird diversity in three reclamation regions of Poyang Lake[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(9): 2765-2771 (in Chinese).
- [22] ZHAO GH, ZHOU LZ, DONG YQ, CHENG YY, SONG YW. The gut microbiome of hooded cranes (*Grus monacha*) wintering at Shengjin Lake, China[J]. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(3): e00447.
- [23] GROND K, SANDERCOCK BK, JUMPPONEN A, ZEGLIN LH. The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds[J]. *Journal of Avian Biology*, 2018, 49(11): e01788.
- [24] FLINT HJ, BAYER EA, RINCON MT, LAMED R, WHITE BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(2): 121-131.
- [25] ZHANG NZ, ZHOU LZ, YANG ZQ, GU JJ. Effects of food changes on intestinal bacterial diversity of

- wintering Hooded Cranes (*Grus monacha*)[J]. Animals, 2021, 11(2): 433.
- [26] 徐清宇, 余静, 朱大伟, 郑小龙, 孟令启, 朱智伟, 邵雅芳. 基于主成分分析和聚类分析的不同水稻品种营养品质评价研究[J]. 中国稻米, 2022, 28(6): 1-8. XU QY, YU J, ZHU DW, ZHENG XL, MENG LQ, ZHU ZW, SHAO YF. Nutritional quality evaluation of different rice varieties based on principal component analysis and cluster analysis[J]. China Rice, 2022, 28(6): 1-8 (in Chinese).
- [27] 程婷婷, 惠小涵, 尚欣欣, 原新博, 柯卫东, 郭宏波, 左小容, 刘景玲. 10 个产地莲藕营养成分分析与品质综合评价[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 320-325. CHENG TT, XI XH, SHANG XX, YUAN XB, KE WD, GUO HB, ZUO XR, LIU JL. Nutrient composition analysis and quality comprehensive evaluation of lotus root in 10 producing areas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 320-325 (in Chinese).
- [28] WANG XB, SHANG YQ, WEI QG, WU XY, DOU HS, ZHANG HX, ZHOU SY, SHA WL, SUN GL, MA SC, ZHANG HH. Comparative analyses of the gut microbiome of two fox species, the red fox (*Vulpes Vulpes*) and Corsac fox (*Vulpes corsac*), that occupy different ecological niches[J]. Microbial Ecology, 2022, 83: 753-765.
- [29] RICABONI D, MAILHE M, KHELAIKIA S, RAOULT D, MILLION M. *Romboutsia timonensis*, a new species isolated from human gut[J]. New Microbes and New Infections, 2016, 12: 6-7.
- [30] YANG Q, LIANG Q, BALAKRISHNAN B, BELOBRAJDIC DP, FENG QJ, ZHANG W. Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: a narrative review[J]. Nutrients, 2020, 12(2): 381.
- [31] 任晓梅, 王小兰, 韩文龙, 张雪梅, 陈宗超, 李涛, 丁铲, 于圣青. 鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(4): 47-51.
- REN XM, WANG XL, HAN WL, ZHANG XM, CHEN ZC, LI T, DING C, YU SQ. Isolation, identification and biological characterization of *Riemerella Anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2018, 26(4): 47-51 (in Chinese).
- [32] COLE K, FARNELL MB, DONOGHUE AM, STERN NJ, SVETICH EA, ERUSLANOV BN, VOLODINA LI, KOVALEV YN, PERELYGIN VV, MITSEVICH EV, MITSEVICH IP, LEVCHUK VP, POKHILENKO VD, BORZENKOV VN, SVETICH OE, KUDRYAVTSEVA TY, REYES-HERRERA I, BLORE PJ, de LOS SANTOS FS, DONOGHUE DJ. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in Turkey poult[J]. Poultry Science, 2006, 85(9): 1570-1575.
- [33] WANG W, ZHOU LZ, FU R, CHENG L, YAN SF, MAHTAB N, SONG YW. Effects of foraging site distances on the intestinal bacterial community compositions of the sympatric wintering Hooded Crane (*Grus monacha*) and Domestic Duck (*Anas platyrhynchos domesticus*)[J]. Avian Research, 2021, 12: 20.
- [34] 阿日查, 斯木吉德, 王纯洁, 张剑, 陈浩, 刘波, 何利娜, 张晨, 崔银雪, 敖日格乐. 内蒙古锡林郭勒冬季放牧蒙古牛肠道微生物多样性和功能预测分析[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(10): 106-117. ARICHA, SIMUJIDE, WANG CJ, ZHANG J, CHEN H, LIU B, HE LN, ZHANG C, CUI YX, AORIGELE. Study on gut microbiome diversity and functional prediction of grazing Mongolian cattle in winter in Xilin Gol, Inner Mongolia[J]. Journal of China Agricultural University, 2020, 25(10): 106-117 (in Chinese).
- [35] LEY RE, TURNBAUGH PJ, KLEIN S, GORDON JJ. Human gut microbes associated with obesity[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022-1023.