

道路距离及三种干燥处理对藏羚羊粪样中皮质醇含量影响的研究

李东岭¹, 王深圳¹, 连新明^{2,3*}, 颜培实^{1*}

- (1. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095;
2. 中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810008;
3. 青海省动物生态基因组学重点实验室, 青海 西宁 810008)

[摘要] 通过测定藏羚羊粪样中皮质醇含量, 分析青藏公路对藏羚羊应激的影响以及不同干燥时间处理对激素含量的影响。结果表明: 粪样经过 4 h 干燥处理, 皮质醇含量显著高于干燥处理 2 h 和 6 h ($P < 0.05$)。藏羚羊距离道路小于 150 m 时, 其粪样中皮质醇含量显著增高 ($P < 0.05$)。研究结果表明, 藏羚羊对青藏公路产生了一定程度的应激, 并且应激程度随道路距离而不同, 提示今后道路设计过程中, 需考虑其对藏羚羊等野生动物的影响。

[关键词] 藏羚羊; 皮质醇; 道路距离; 粪样

[中图分类号] S811.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-5228(2018)07-0056-04

doi:10.3969/j.issn.1673-1182.2018.07.011

近年来, 道路修建和运营对野生动物带来的影响正成为保护生物学的热点^[1-3]。研究发现, 道路分割了动物栖息地^[4], 将动物生活的大面积区域分裂成小区域, 造成种群隔离^[5-6]; 修建和运营过程对于幼小的野生动物(鸟类除外)会直接导致动物的死亡, 对于大型野生动物会面临不能顺利通过公路以及及时采食的危险^[7], 此外动物警戒时间增加, 觅食时间减少^[8-9]。因此, 如何处理好道路修建与动物保护的关系引起了人们的广泛关注。

皮质醇等糖皮质激素常被用来衡量动物是否处于应激状态^[10]。应激状况下通过皮质醇来维持血压稳定以此来维持正常的生理机能。皮质醇水平越高, 动物受到环境应激越大。传统的皮质醇测量往往是保定动物采集血液样本进行测量, 但是该方法显然不适合大型野生动物的采集, 尤其针对国家级保护动物。利用非损伤方法采集动物唾液、尿液和粪便等样品测定的皮质醇含量更能反映出动物正常状态下的应激水平^[11-12]。对于野外生活环境下的野生动物, 由于野外条件的限定, 收集到的新鲜粪样很

难及时抽提测定, 并且粪样经过干燥, 会增大提取率并减少纤维类食物引起含水量增加对激素提取物造成的影响^[13]。粪样处理的方法主要有冷冻干燥法和烘箱干燥法两种。烘箱干燥与冷冻干燥相比具有操作简单、耗时短等优点^[14], 但干燥的最佳时间需要进一步研究^[15]。

本试验收集新鲜的藏羚羊粪便, 来研究不同道路距离对藏羚羊应激水平的影响, 同时探讨不同干燥处理是否对激素测定产生影响, 从而为野生动物栖息地内的道路建设以及当地野生动物保护提供指导与建议。

1 材料与方法

1.1 动物及调查区域

本试验选择区域是可可西里自然保护区的五道梁附近, 该区域位于青藏公路的“中段”。可可西里自然保护区位于青藏高原的西北部, 该地主要保护藏羚羊、藏原羚、野牦牛等高原珍稀野生动物。试验研究动物为藏羚羊, 是国家一级保护动物。选择该

[收稿日期] 2017-08-26 **修改日期:** 2017-12-19

[基金项目] 青海省应用基础研究项目(2017-ZJ-724); 中央高校基本科研业务费专项资金(KYZ201536); 青海省重点实验室建设专项(2017-ZJ-Y23)

[作者简介] 李东岭(1992-), 男, 河南驻马店人, 硕士研究生, 主要从事野生动物保护研究。E-mail: 1130476827@qq.com

* **[通讯作者]** 连新明(1980-), 男, 山东临沂人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事应用动物行为学与保护生物学研究。

E-mail: lianxinming@nwipb.cas.cn

颜培实(1960-), 男, 黑龙江宁安人, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽温热环境研究。E-mail: yanps@hotmail.com

区域原因有两点:其一,该地区是三江源自然保护区和可可西里自然保护区的交汇处,每年的六、七月藏羚羊会成群的从越冬地迁往繁殖地,随后八月份带羔羊回迁,该地是其迁移的主要地段也是数量出现较多的地段^[16]其二,该区域是青藏公路沿线放牧较少的地区之一,可以减少放牧对动物行为的影响,从而将道路作为外界环境影响的主要因素。

该区域平均海拔约4 600 m左右,气候寒冷,常冬无夏,7月平均气温为5.5℃。全年最低气温是1月,为-24.8℃^[17]。该地植被稀少,空气稀薄,自然环境极其恶劣。

1.2 试验方法

在青藏公路以2 994~3 005 km路段路标作为调查路段,沿着公路行进过程中,看见道路两侧出现藏羚羊群,就停车观察,并记录藏羚羊所在的位置。于2015年8月16~22日进行调查,每次调查时间为9:00~11:00,15:00~17:00。这是因为藏羚羊活动会受时间的影响,为了减少试验误差,每天采样的时间需要大体一致,调查过程中一共采集262份粪样,其中150 m以内有26份;150~300 m有51份;300~450 m有77份;450~600 m有84份;600 m以上有24份。为了减少试验误差,试验过程中,在藏羚羊不受干扰的条件下,待其离开,再收集粪样。将采集的粪样装入保鲜袋中,做好标记,同时用GPS定位,记录距公路的垂直距离,粪样装入车载冰箱中冷冻保存,并及时地运回实验室保存,以备测定。研究表明:样品的新鲜程度会影响激素含量的变化^[14]。为了确保试验的准确性,实验采集的是新鲜粪样,其判断标准是粪便的表面是否湿润。

粪便激素的前期处理,参照王慧平等^[18]、Khan等^[19]、Terio等^[20]的方法,并作改进。方法如下:将-20℃冷冻保存的粪便样品干燥处理(60℃),烘干时间分别为2 h、4 h、6 h,研磨后称取0.3 g左右的粪样,置于15 mL离心管中,加入90%乙醇10 mL,用涡旋振荡仪轻轻震荡1 min,置于水浴锅中60℃水浴20 min。然后以4 000 r/min离心机离心10 min,取出上清液,沉淀中再加入5 mL同浓度的乙醇,方法同上。将两次上清液合并,水浴蒸干,然后加入1 mL甲醇,漩涡震荡1 min,摇匀分装回收,并放置-20℃冰箱中冷冻待测。粪便样品的激素测定:使用上海酶联生物科技有限公司生产的皮质醇试剂盒,测定上述待测样品。测定具体方法如下:(1)室温下平衡20 min后取出所需板条,剩余板条放入4℃冰箱并用密封袋密封保存;(2)标准孔分

别加入不同浓度的标准品50 μL,加入顺序按照从低到高的顺序加入;样本孔加入待测样本50 μL;空白孔不加待测样本。除空白孔外,标准孔和样本孔分别加入过氧化物酶标记的抗体100 μL,并用封膜板封住反应孔,37℃恒温箱温育60 min。(3)弃去废液,用旧纸排干,每孔加入洗涤剂350 μL,静置1 min后,弃去洗涤液,并排干,重复此操作5次。每孔分别加入底物A液和B液50 μL,在37℃条件下避光孵育15 min。每孔加入终止液50 μL,在15 min内,用酶标仪在450 nm波长处测定各个孔的OD值。在试验过程中每个样本重复两次,以便减少试验误差。

1.3 数据处理及统计学分析

所有统计分析在IBM SPSS20.0和Excel 2010中进行,使用Kolmogorov-Smirnov检验,所有数据符合正态分布。采用单因素方差分析三种烘干时间之间的差异显著性;以及不同道路距离的粪样中皮质醇激素含量的差异显著性,试验数据均以“平均值±标准误”表示。

2 结果与分析

2.1 干燥时间对皮质醇激素含量的影响

干燥时间分别为2 h、4 h、6 h,试验结果见图1。样品在不同干燥时间下的含水率分别为21%、8%、3%,计算浓度时需换算成绝干样品。试验结果表明,干燥处理4 h与干燥处理2 h和干燥处理6 h相比,差异显著($P < 0.05$)。这说明干燥时间不同对激素含量是有一定的影响,在使用烘箱干燥法要仔细考虑干燥时间。

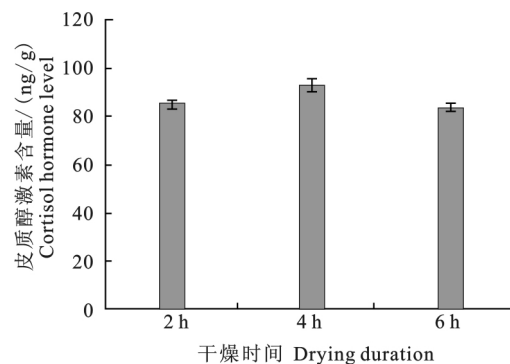


图1 干燥时间对藏羚羊粪样中皮质醇激素含量的影响
Fig. 1 The effect of drying time on the cortisol hormone levels in the Tibetan antelope

2.2 道路距离对皮质醇激素含量的影响

道路距离主要是指藏羚羊到青藏公路的垂直距离。将采集到的粪样按距离分为四个组,分别是0

~150 m, 150~300 m, 300~450 m, 450~600 m 和 600 m 以上, 试验结果见图 2。试验结果表明, 道路距离在 150 m 以内与 150 m 以外相比, 藏羚羊粪样中的皮质醇激素含量, 差异显著 ($P < 0.05$)。这说明, 150 m 以内藏羚羊所受的环境应激越大。

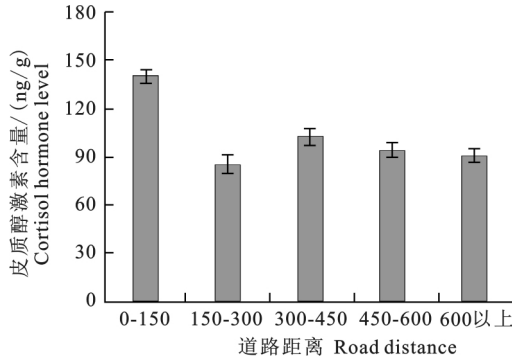


图 2 道路距离对藏羚羊粪样中皮质醇激素含量的影响
Fig. 2 The effect of road distance on the cortisol hormone levels in Tibetan antelope

3 讨 论

超低温冷冻干燥法虽然测定结果较为精准^[21], 但干燥时间过长, 并且对试验仪器要求较高^[14]。烘一箱干燥法具有耗时短、操作简单等优点, 但是干燥时间和干燥温度不同, 可能会导致试验结果的偏差。研究发现, 使用烘箱在 71 °C 干燥猎豹粪样 3 d 后测定其皮质醇含量明显降低^[22]。本试验将粪样干燥的烘箱温度设为 60 °C, 以确保顺利干燥粪样中游离水的同时能够减少皮质醇的降解。通过对比干燥 2 h、4 h 和 6 h 的 3 个处理时长的结果表明, 干燥 4 h 的粪样中皮质醇的含量最高, 且与其他两个处理组差异显著 ($P < 0.05$)。这可能是由于粪样干燥 2 h 时间太少, 此时样品的含水率为 21%, 粪样不易研磨, 导致所有粪样无法混匀。这与于小杰等^[23]对大熊猫粪团表层和内部的类固醇激素含量的研究结果一致, 即粪样中皮质醇激素的分布是不均匀的藏羚羊主要采食禾本科植物^[24], 干燥处理 4 h 后可完全干燥, 此时样品的含水率为 8%。当干燥 6 h 后, 激素含量会下降。这可能是由于干燥时间过长, 部分微生物能在加热期间降解激素^[19]。

野生动物皮质醇激素水平受道路距离的影响。道路距离 600 m 以上的范围受到道路的干扰较小, 此时可以认为动物处于正常的生理状态。从图 2 可知, 皮质醇含量在 600 m 以上距离时, 激素含量较低。距离道路 150 m 内的藏羚羊粪样中的皮质醇含量最高, 且与其他距离粪样中的皮质醇含量差异

达到显著水平, 这说明 150 m 以内, 藏羚羊所承受的环境压力较大。这与李晓晓等^[25]的研究结果一致, 即道路会让动物表现类似应对捕食风险的行为, 距离道路越近, 捕食风险越大, 藏羚羊表现警戒行为的比例越高。从收集的粪样所做的位置标志可以发现, 藏羚羊在不同道路距离出现的频率高低。150~600 m 收集到 212 份粪样而在 150 m 以内和 600 m 以上一共收集到 50 份粪样, 这表明藏羚羊在距公路 150~600 m 范围内出现的频率较高。这与连新明等^[8]所发现的藏羚羊平均活动范围距道路 580 m 相一致。藏羚羊距离公路较近出现的频率较少, 这是因为藏羚羊生性胆小, 受人类活动干扰会远离道路。同时道路会阻碍动物在道路间的活动, 其阻碍能力与动物的运动能力、道路宽度、交通量三个因素有关^[26]。野生动物其生理状况和行为活动存在一一对应关系, 在未来的野生动物动物研究中, 可以测定其生理反应来推测动物的行为活动。

4 结 论

本试验中, 干燥处理 4 h 粪样中皮质醇含量较高。在使用烘箱干燥处理时, 要考虑干燥时间对皮质醇含量的影响。此外, 道路距离对藏羚羊应激也会产生影响, 在以后自然保护区的道路修建中要注意规划, 减少对动物应激的影响。

参考文献:

- [1] 宗跃光, 周尚意, 彭萍, 等. 道路生态学研究进展[J]. 生态学报, 2003, 23(11): 2 396-2 405.
- [2] FORMAN R T T. Horizontal Processes, Roads, Suburbs, Societal Objectives, and Landscape Ecology[M]//Landscape Ecological Analysis. New York: Springer New York, 1999: 35-53.
- [3] 殷宝法, 于智勇, 杨生妹, 等. 青藏公路对藏羚羊、藏原羚和藏野驴活动的影响[J]. 生态学杂志, 2007, 26(6): 810-816.
- [4] 裘丽, 冯祚建. 青藏公路沿线白昼交通运输等人类活动对藏羚羊迁徙的影响[J]. 动物学报, 2004, 50(4): 669-674.
- [5] MUMME R L, SCHOECH S J, WOOLFENDEN G E, et al. Life and Death in the Fast Lane: Demographic Consequences of Road Mortality in the Florida Scrub-Jay[J]. Conservation Biology, 2000, 14(2): 501-512.
- [6] KACZENSKY P, KNAUER F, KRZE B, et al. The impact of high speed, high volume traffic axes on brown bears in Slovenia[J]. Biological Conservation, 2003, 111(2): 191-204.
- [7] 殷宝法, 淮虎银, 张镜铨, 等. 青藏铁路、公路对野生动物活动的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(12): 3 917-3 923.
- [8] 连新明, 李晓晓, 徐图. 可可西里四种有蹄类动物对道路的回避距离及保护建议[J]. 生态学杂志, 2012, 31(1): 81-86.
- [9] CLEVENGER A P, CHRUSZCZ B, GUNSON K E. High-

- way Mitigation Fencing Reduces Wildlife-Vehicle Collisions [J]. *Wildlife Society Bulletin*, 2001, 29(2):646-653.
- [10] 黄英, 胡德夫, 金学林, 等. 川金丝猴粪样内皮质醇激素保存时效的研究[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(4):196-200.
- [11] 刘丙万, 蒋志刚. 粪样在野生动物研究中的作用[J]. *动物学研究*, 2002, 23(1):71-76.
- [12] 马凯, 吴存哲, 尹峰, 等. 贮存温度和时间对大熊猫粪便样品皮质醇浓度的影响[J]. *兽类学报*, 2014, 34(2):188-192.
- [13] CAVIGELLI S A. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*[J]. *Animal Behaviour*, 1999, 57(4):935-944.
- [14] 崔媛媛, 胡德夫, 张金国, 等. 野生动物粪样内类固醇激素保存方法研究进展[J]. *特产研究*, 2008, 30(2):60-63.
- [15] 张肖, 丁长青. 粪便类固醇激素检测准确性的影响因素[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(5):143-151.
- [16] WANG M Z, ZHAO-YI X U, YANG C Y, et al. Effect of Qinghai-Tibet Railway Construction on Plateau Eco-environment[J]. *Environmental Protection in Transportation*, 2002.
- [17] 李炳元. 青海可可西里地区自然环境[M]. 北京:科学出版社, 1996.
- [18] 王慧平, 高云芳, 张新利, 等. 川金丝猴粪尿中类固醇性激素抽提方法比较[J]. *兽类学报*, 2005, 25(3):297-301.
- [19] KHAN M Z, ALTMANN J, ISANI S S, et al. A matter of time; evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis[J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2002, 128(1):57-64.
- [20] TERIO K A, BROWN J L, MORELAND R, et al. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah[J]. *Zoo Biology*, 2002, 21(3):215-222.
- [21] 崔媛媛, 胡德夫, 张金国, 等. 不同干燥方法对大熊猫粪样中类固醇激素影响初探[C]//首届两岸三地大熊猫保护教育学术研讨会, 2009:122-128.
- [22] TERIO K A, CITINO S B, BROWN J L. Fecal cortisol metabolite analysis for non-invasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*) [J]. *Journal of Zoo & Wildlife Medicine Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 1999, 30(4):484.
- [23] 于小杰, 胡德夫, 唐勇清, 等. 大熊猫粪团表层和内部类固醇激素含量比较[J]. *经济动物学报*, 2010, 14(4):187-189.
- [24] 曹伊凡, 苏建平, 连新明, 等. 可可西里自然保护区藏羚羊的食性分析[J]. *兽类学报*, 2008, 28(1):14-19.
- [25] 李晓晓. 可可西里同域分布藏羚与藏原羚生境选择研究[D]. 南京:南京农业大学, 2011.
- [26] GOOSEM M. Effects of tropical rainforest roads on small mammals: edge changes in community composition[J]. *Wildlife Research*, 2000, 27(2):151-163.

Effects of Road Distances and Three Drying Treatments on the Cortisol Level in Fecal Samples of Tibetan Antelope

LI Dongling¹, WANG Shenzhen¹, LIAN Xinming^{2,3*}, YAN Peishi^{1*}

(1. *College of Animal Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing, Jiangsu 210095 China;*

2. *Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810008 China;*

3. *Qinghai Provincial Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Xining, Qinghai 810008 China)*

Abstract: The purpose of this research was to examine the effects of Qinghai-Tibetan highway (QTH) on the stress of Tibetan antelope and different drying treatments on cortisol hormone of feces for the Tibetan antelope. Field surveys were made and fresh faeces were collected in the Kekexili National Nature Reserve in August 2015. These results indicate that drying feces samples 4 hours had a higher cortisol level than drying 2 hours and 6 hours ($P < 0.05$). The cortisol levels were significantly higher within the area of 0~150 m than of 150 m and over from QTH ($P < 0.05$). In conclusion, the Tibetan antelope has a certain degree of stress to QTH, which differs by distances. It also indicates the effects of road on wild animals like Tibetan antelope should be taken into account in road design in the future.

Key words: Tibetan antelope; cortisol; road distance; fecal samples