

## 研究报告

## 野猪肠道菌群多样性分析及其益生菌的分离筛选

林淑华<sup>#1</sup>, 谭娟娟<sup>#1</sup>, 杨贝莹<sup>1</sup>, 曹华斌<sup>1</sup>, 王志鹏<sup>1</sup>, 刘玉洁<sup>1</sup>, 黄鹏<sup>2</sup>,  
龙纯鹰子<sup>1</sup>, 严琿<sup>2</sup>, 张锦华<sup>\*1</sup>

1 江西农业大学 动物科学技术学院, 江西 南昌 330045

2 江西省野生动植物保护中心, 江西 南昌 330006

林淑华, 谭娟娟, 杨贝莹, 曹华斌, 王志鹏, 刘玉洁, 黄鹏, 龙纯鹰子, 严琿, 张锦华. 野猪肠道菌群多样性分析及其益生菌的分离筛选[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 757-770.

LIN Shuhua, TAN Juanjuan, YANG Beiyang, CAO Huabin, WANG Zhipeng, LIU Yujie, HUANG Peng, LONG Chunyingzi, YAN Hui, ZHANG Jinhua. Diversity of gut microbiota in wild boars and isolation and screening of probiotics[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 757-770.

**摘要:**【背景】近些年来, 由于对野生动物保护和生态环境的改善, 野猪的数量呈现逐年增长的趋势, 甚至在部分地区早已溢出保护的数量, 对农业生产造成了一定的影响。野猪抗病性和环境适应性强、肠道微生物较为丰富, 具有改良家猪品质的潜在价值, 但是国内对野猪肠道菌群的研究与开发均鲜有报道。【目的】探究野猪肠道菌群多样性, 同时依据野猪杂食性和抗病性强的特点从野猪肠道中分离益生性能良好的菌株。【方法】分别采集了野猪、外三元杂交猪和新美系商品猪粪便样品各 5 份, 通过菌群多样性分析对比野猪与商品猪肠道菌群组成的差异。从野猪肠道内容物分离筛选具有纤维素酶活力的芽孢杆菌并检验其耐酸、产酶等益生性能。【结果】野猪和外三元猪的肠道菌群  $\alpha$  多样性均高于新美系, 总体上野猪肠道菌群丰富度最高; 在门水平上, 厚壁菌门(*Firmicutes*) 在野猪肠道中丰度最高, 拟杆菌门(*Bacteroidota*) 和梭杆菌门(*Fusobacteriota*) 分别在外三元猪和新美系猪肠道中丰度最高。在属水平上, 野猪肠道中丰度普遍较高的有 *unclassified\_f\_Lachnospiraceae*、*UCG-005*、*Prevotellaceae\_NK3B31\_group* 和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*) 等。 $\beta$  聚类分析结果显示 3 组样品中野猪的肠道样品间菌群的相似性最低, 从野猪肠道分离得的多株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 展现出良好的纤维素酶和淀粉酶活力, 具有一定的耐酸能力。【结论】野猪的肠道菌群丰富度高于商品猪, 野猪肠道中分得的多株贝莱斯芽

资助项目: 国家自然科学基金(32360880); 江西省自然科学基金重点项目(20212ACB205005); 江西农业大学创新训练项目(202210410111)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360880), the Key Program of Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212ACB205005), and the Innovation Training Program of Jiangxi Agricultural University (202210410111).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: zhangjh1122@jxau.edu.cn

Received: 2024-08-30; Accepted: 2024-11-15; Published online: 2024-12-09

孢杆菌具有开发为益生菌制剂的潜力。

关键词：野猪；肠道菌群；纤维素酶；贝莱斯芽孢杆菌

## Diversity of gut microbiota in wild boars and isolation and screening of probiotics

LIN Shuhua<sup>#1</sup>, TAN Juanjuan<sup>#1</sup>, YANG Beiyong<sup>1</sup>, CAO Huabin<sup>1</sup>, WANG Zhipeng<sup>1</sup>, LIU Yujie<sup>1</sup>, HUANG Peng<sup>2</sup>, LONG Chunyingzi<sup>1</sup>, YAN Hui<sup>2</sup>, ZHANG Jinhua<sup>\*1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

2 Jiangxi Provincial Wildlife Protection Center, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**Abstract:** **[Background]** In recent years, efforts have been made to protect wildlife and improve the eco-environment. Accordingly, the number of wild boars has been increasing year by year, and it has even exceeded the number of protection in some areas, which has caused a certain impact on agricultural production. Wild boars have strong disease resistance, environmental adaptability, and rich gut microbiota, demonstrating a potential value of improving the quality of domestic pigs. However, there are few reports on the research and development of gut microbiota of wild boars in China. **[Objective]** To explore the diversity of gut microbiota in wild boars and isolate strains with good probiotic performance from the gut based on the omnivorous habit and disease resistance of wild boars. **[Methods]** Five feces samples were collected from wild boars, foreign three-way cross hybrid pigs, and commercial pigs of new American pig lines, respectively. *Bacillus* strains with cellulase activity were isolated from the guts of wild boars and tested for their probiotic properties such as acid tolerance and enzyme production. **[Results]** The alpha diversity of gut microbiota in wild boars and foreign three-way cross hybrid pigs was higher than that in the pigs of new American pig lines, and the richness of gut microbiota was the highest in wild boars. At the phylum level, *Firmicutes*, *Bacteroidota*, and *Fusobacteriota* had the highest abundance in the guts of wild boars, foreign three-way cross hybrid pigs, and pigs of new American pig lines, respectively. At the genus level, unclassified\_f\_Lachnospiraceae, UCG-005, *Prevotellaceae\_NK3B31\_group*, and *Ruminococcus* had high abundance in the guts of wild boars. The  $\beta$  diversity clustering analysis results showed that the similarity of gut microbiota between the wild boar samples was the lowest among the three groups of samples. Several strains of *Bacillus velezensis* isolated from the guts of wild boars exhibited high cellulase and amylase activities and acid tolerance. **[Conclusion]** The richness of gut microbiota in wild boars is higher than that in commercial pigs, and several strains of *B. velezensis* isolated from the guts of wild boars have the potential to be developed as probiotic preparations.

**Keywords:** wild boar; gut microbiota; cellulase; *Bacillus velezensis*

野猪属于偶蹄目猪形亚目猪科，因其多产的高繁殖性、极强的攻击性和日粮的高度可塑性而广泛分布于亚欧大陆。随着社会经济和生态环境的改变、人们对野生动物的保护，近些年来野猪的数量在全世界范围内呈现出逐年增长的趋势，甚至在部分地区早已溢出保护数量，对农业生产造成了一定的影响<sup>[1]</sup>。2023年8月最新调整的《有重要生态、科学、社会价值的陆生野生动物名录》显示，野猪已被调出了新“三有”名录<sup>[2]</sup>。但野猪的抗病性和环境适应性具有改良家猪品质的潜在优势，尤其野猪肠道菌群与其杂食性特点相关性的研究极具科研价值<sup>[3]</sup>。近年来，作为畜禽日粮的优质蛋白质原料如豆粕、鱼粉等价格上涨、供应日益紧张，严重制约了我国饲料业和畜牧业发展，开发新型动物饲料、畜禽饲料蛋白减量替代创新势在必行<sup>[4]</sup>。纤维素生物质在地球上分布最广、含量最丰富，但是其由纤维素、半纤维素和木质素通过氢键、共价键紧密结合而形成的生物质结构非常牢固，难以被破坏，因此人类对纤维素资源的开发不到2%<sup>[5-7]</sup>。野猪作为长期生活在野外自然环境中的杂食性动物，其食谱不仅有肉类、谷物类等，还有浆果、草类等富含植物纤维的食物<sup>[8]</sup>。目前，研究者们从家猪中分离鉴定益生菌的报道较多，而对野猪的肠道菌群分析和益生菌菌株分离鉴定的报道均较少<sup>[9]</sup>。为研究野猪和商品猪的肠道菌群差异性，本试验试图采集野猪的肠道粪便、大规模猪场的新美系仔猪粪便和小型猪场的外三元仔猪粪便进行菌群多样性分析。依据菌群分析结果，从野猪粪便中分离筛选具有纤维素酶活力的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)并对其相关益生性能进行检测，为研究野猪肠道微生物、纤维素资源的开发利用提供数据基础，为后续研制猪用微生态制剂提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 品

2022年6-10月，分别从江西省某县大规模猪场采集新美系(长白和大白杂交)新生仔猪粪便5份，标记为X1-X5(X组)；从九江地区捕得15头小野猪，采集5份直肠粪便，标记为Y1-Y5(Y组)；从吉安小型猪场采集外三元仔猪粪便5份，分别标记为W1-W5(W组)，粪便用于DNA的提取和细菌分离。

### 1.2 培养基

纤维素培养基参照文献[10]并进行改良。纤维素固体培养基(g/L)：羧甲基纤维素钠 5.0，酵母粉 5.0，蛋白胨 0.5，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5，MgSO<sub>4</sub> 0.2，NaCl 5.0，琼脂 20.0；纤维素液体培养基(g/L)：同固体培养基，另加 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2，不加琼脂。

### 1.3 主要试剂和仪器

羧甲基纤维素钠、刚果红和可溶性淀粉，上海麦克林生化科技股份有限公司；药敏纸片，常德比克曼生物科技有限公司；2×Taq Master Mix 和 DL2000，南京诺唯赞生物科技有限公司；DNA 提取试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司。超净工作台，苏州净化设备有限公司；PCR 仪，中国东胜仪器有限公司；电泳仪，北京六一生物科技有限公司；凝胶成像仪，上海培清科技有限公司；QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统，Promega 公司。

### 1.4 基因组提取和测序

分别从15份样品取200 mg 粪便按照DNA提取试剂盒说明书提取DNA。利用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。利用引物338F和806R(表1)对微生物的V3-V4区进行PCR扩增。PCR反应体系(50 μL)：2×Taq Master Mix 25 μL，338F和806R引物(100 μmol/L)各

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列
Primer name	Sequence (5'→3')
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
27F	AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG
1492R	TACGACTTAACCCCAATCGC

2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。每个样本 3 个重复, 将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。参照电泳初步定量结果, 将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量。构建 PE 文库, 进行 Illumina 测序。

### 1.5 生物信息学分析

首先根据 overlap 关系将得到的 PReads 进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 将优化序列与 OTU 代表序列进行比对, 进行序列分类, 以相似度 97% 作为分类标准。区分样本后通过 ANOSIM 分析评估样本测序得到的物种情况, 随后进行 OTU 聚类分析和物种分类分析。基于 OTU 进行多样性指数分析和 OTU 聚类分析; 基于分类学信息, 在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。在上述分析的基础上, 对多样本的群落组成和系统发育信息进行多元分析和差异显著性检验等一系列深入的统计学和可视化分析。

### 1.6 产纤维素酶芽孢杆菌的筛选与鉴定

取 200 mg 新鲜野猪粪便加入 1 mL LB 液体培养基中, 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min 后, 将培养液在 LB 固体培养基上划线, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后可分离得单菌落, 挑取单菌落镜检观察其形态。

采用刚果红染色法和羧甲基纤维素酶法鉴定菌株的纤维素酶活力。纤维素酶活力初筛:

取 1  $\mu\text{L}$  菌液接种至 1 mL 纤维素液体培养基中, 另准备 1 mL 纤维素液体培养基作为空白对照, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 24 h 后加入 0.1% 的刚果红, 静置观察培养基颜色, 红色变淡即为产纤维素酶阳性。

采用纸片扩散法进行药敏试验。将培养好的菌液均匀地涂抹在 LB 固体培养基上并做好相应标记。用在酒精灯上灼烧灭菌的镊子夹取药敏纸片, 轻轻置于培养基表面对应位置, 贴紧铺平。将培养基置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 12 h 后观察抑菌情况。

分得的菌株使用 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物(即 27F 和 1492R, 见表 1)进行 PCR 扩增, PCR 反应体系及条件同 1.4。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序得的结果提交至 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 采用 BLAST 在 GenBank 数据库上进行 16S rRNA 基因序列的同源性比较分析。

### 1.7 产纤维素酶芽孢杆菌的益生性能检测

#### 1.7.1 纤维素酶活力检测

每个菌株取 1  $\mu\text{L}$  菌液点接至纤维素培养基上, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 12 h。取出培养基, 倾注 1 mmol/L 的 NaCl 溶液至覆盖表面, 10 min 后倾去溶液, 再加入 1 g/L 的刚果红染液覆盖菌落染色 30 min。以红色背景上的透明区域为产纤维素酶阳性, 测量透明区直径( $D$ )和菌落直径( $d$ ), 求平均值, 得出纤维素酶活力指数  $A_c(D/d)$ 。

#### 1.7.2 耐酸试验

取 60 mL LB 液体培养基分成 3 份, 其中 2 份用 0.1 mol/L HCl 调 pH 值为 4.0 和 2.0, 另一份为对照组。每个 pH 值的培养基取 1 mL 加入 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 10  $\mu\text{L}$  培养好的菌液, 每个菌每个 pH 值做 3 个重复, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、

120 r/min 培养 8 h, 然后取出菌液采用平板稀释法计数, 并结合对照组计算细菌的存活率。

### 1.7.3 产淀粉酶活力的检测

采用平板透明圈法。将直径 6 mm 的空白药敏纸片放到菌液中浸泡 5 min, 然后贴到 1% 淀粉 LB 琼脂培养基上, 每个菌做 3 个重复。于 37 °C 培养 12 h, 取出培养皿, 用吸管将革兰氏染液(碘液)加到平皿表面至恰好覆盖平皿。染色 5 min 后倾去染液, 测量贴纸片处的空白环直径( $D$ )和菌落直径( $d$ ), 求平均值, 得出淀粉酶活力指数  $A_a (D/d)^{[11]}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 肠道菌群多样性分析

#### 2.1.1 物种注释与评估

对野猪、外三元猪和新美系猪共 15 个样品进行测序, 得到 769 342 个原始序列, 优化后得到 697 311 个优化序列, 平均序列长度 414 bp, 得到 1 237 个 OTU。

通过 ANOSIM 分析对测序得到的样本物种情况进行评估。结果显示 3 组样品的组内差异均小于组间差异, 可用于统计分析(图 1)。

#### 2.1.2 肠道菌群 $\alpha$ 多样性分析

三组猪  $\alpha$  多样性指数可以观测群落内物种数量及分布情况(图 2), 结果显示 X 组与另外 2 组在 Chao1、Shannon、ACE、Coverage 等多样性指数上均存在显著差异, 即野猪组和外三元组肠道菌群多样性和丰度均显著高于新美系组。而 Y 组与 W 组之间只在 Coverage 指数上存在显著差异( $P < 0.01$ )。

#### 2.1.3 肠道菌群组成分析

在 OTU 组成水平上, 野猪和外三元猪肠道菌群组成相似性较高, 共有 282 个 OTU, 3 组猪肠道共有 70 个 OTU, 另外野猪独有 OTU 有 497 个。

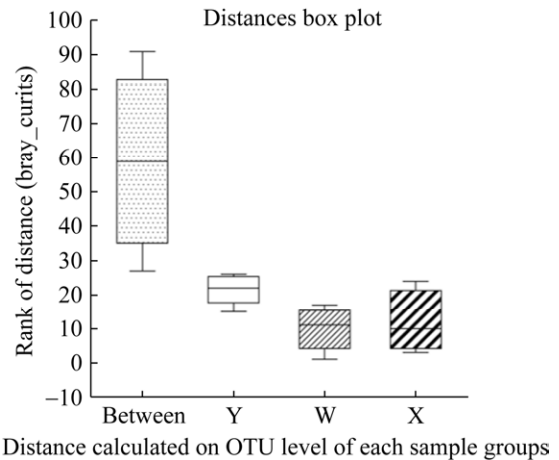


图 1 三组猪肠道样品 ANOSIM 分析图 X 轴上 Between 对应的箱子代表组间差异的距离值, Y、W 和 X 分别代表 Y(野猪)组、W(外三元)组和 X(新美系)组的组内差异; Y 轴刻度表示距离值的大小。  
Figure 1 ANOSIM analysis graph of three sets of porcine intestinal samples. The boxes corresponding to Between on the X-axis represent the distance values of inter group differences, while Y, W, and X represent the intra group differences of Y (wild boar) group, W (external ternary) group, and X (New American series) group; The Y-axis scale indicates the size of the distance value.

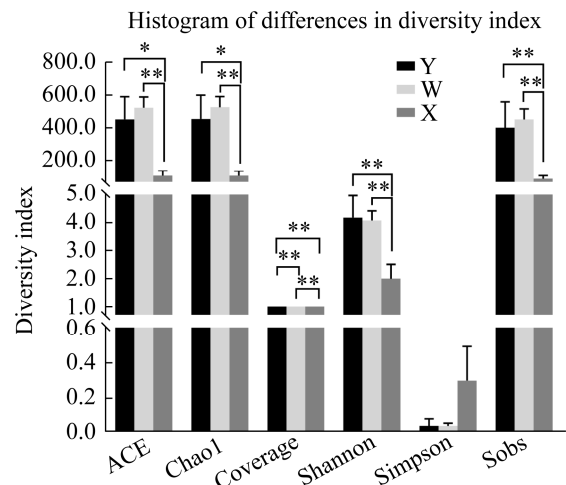


图 2 三组猪肠道样品菌群多样性指数差异柱状图  
Figure 2 Histogram of differences in diversity indices of bacterial flora among three groups of porcine intestinal samples. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

根据3组粪便样品的物种丰度图表和物种注释表得出,在门水平上(图3A),厚壁菌门(*Firmicutes*)在野猪中相对丰度最高(平均丰度0.75);拟杆菌门(*Bacteroidota*)在外三元猪中相对丰度最高(平均丰度0.54);梭杆菌门(*Fusobacteriota*)在新美系猪中相对丰度最高(平均丰度0.58)。在属水平上(图3B),野猪肠道中相对丰度最高的是 *unclassified\_f\_Lachnospiraceae*,

其次是 *UCG-005*、普雷沃氏菌 *NK3B31* (*Prevotellaceae\_NK3B31\_group*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等。新美系中梭杆菌属(*Fusobacterium*)丰度占比极大,其次是拟杆菌属(*Bacteroides*);在外三元中丰度普遍更高的有 *norank\_f\_Muribaculaceae*、*unclassified\_f\_Prevotellaceae*、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和 *CAG-873*。

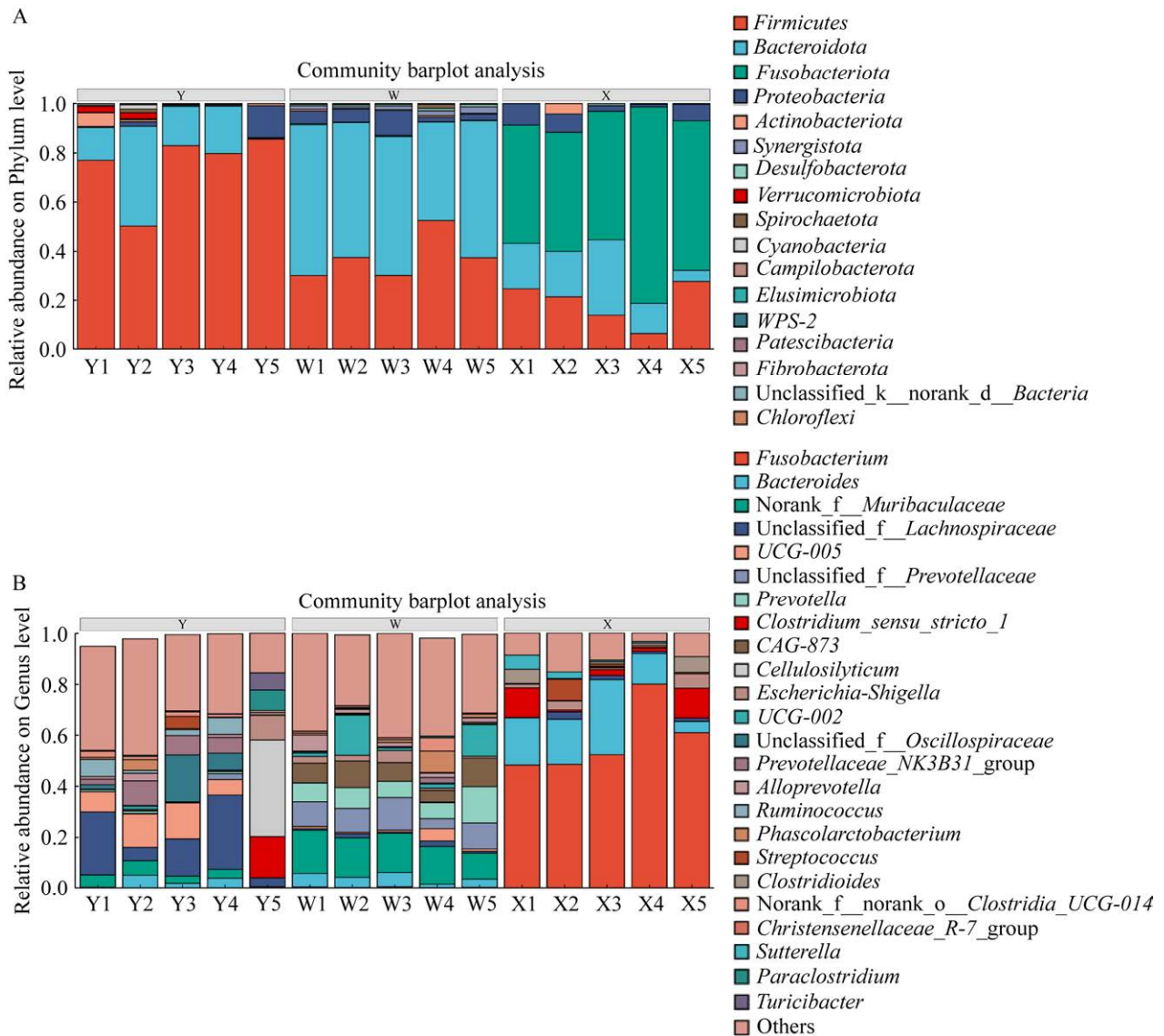


图3 三组猪肠道样品物种丰度柱状图 A: 门水平物种丰度柱状图; B: 属水平物种丰度柱状图。

Figure 3 Histogram of species abundance of three sets of porcine intestinal samples. A: Histogram of species abundance at the phylum level; B: Histogram of species abundance at the genus level.



将样品中相对丰度小于 0.05 的物种合并, 得到肠道菌群属水平的 $\beta$ 层级聚类分析图(图4)。结果显示, 野猪 Y 组、外三元 W 组和新美系 X 组这 3 组猪肠道菌群按组聚类趋势明显。另外, Y 组中的 Y5 与 X 组的样品在一个聚类分支上, 形成差异的主要原因为 Y5 样品中相对丰度较高的解纤维素菌属 (*Cellulosilyticum*) 和 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*。同时, 野猪组样品组间相似性低于新美系组和外三元组组间相似性的结论也再一次得到证实。

#### 2.1.4 肠道菌群差异分析

对分组的样本进行组间相似性分析, 检验组间差异的显著性, 进一步可采用监督学习的方法对样本划分的分组进行线性判别和分类建

模, 同时发掘对组间区分影响比较关键的一些物种变量。

LEfSe 是一种用于发现高维生物标识和揭示基因组特征的差异分析方法。可以直接对门纲目科属种的各级分类水平同时进行统计检验和差异分析, 寻找分组间稳健的差异物种, 即标志物种。由图 5 可知, 厚壁菌门(*Firmicutes*) 在组间存在差异, 并且在 Y 组中被显著富集。而厚壁菌门下的梭菌纲(*Clostridia*) 在 Y 组的相对丰度显著高于其他组。*Clostridia* 纲下, r1: o\_*Lachnospirales*、v1: o\_*Oscillospirales*、u1: o\_*Monoglobales*、j1: o\_*Clostridia\_vadinBB60\_group*、e2: o\_*unclassified\_c\_Clostridia* 和 i1: o\_*Clostridia\_UCG-014* 等目均在 Y 组显著富集。

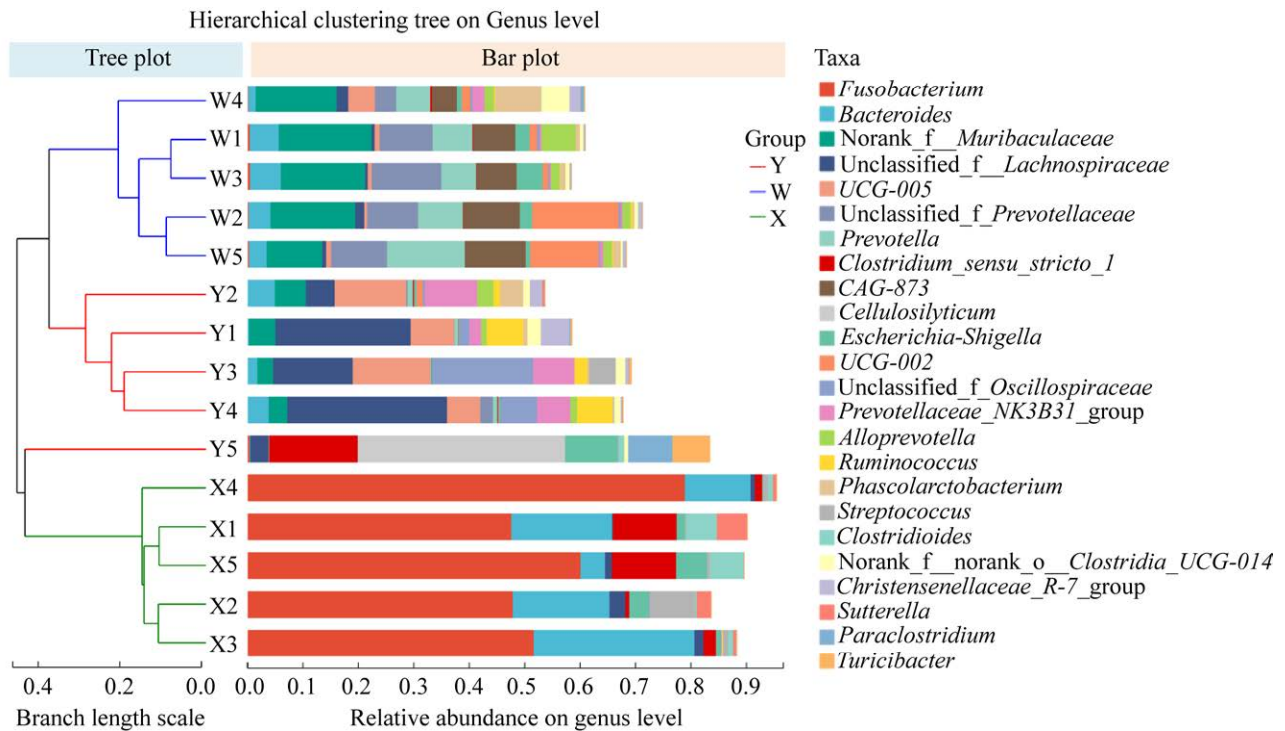


图 4  $\beta$  多样性层级聚类分析 图左侧的相似度树状图分支长度代表样本间距离, 距离越小, 相似性越高。

Figure 4  $\beta$  diversity hierarchy cluster analysis. The lengths of the branches of the similarity dendrogram on the left side of the figure represent the inter-sample distances, the smaller the distance, the higher the similarity.

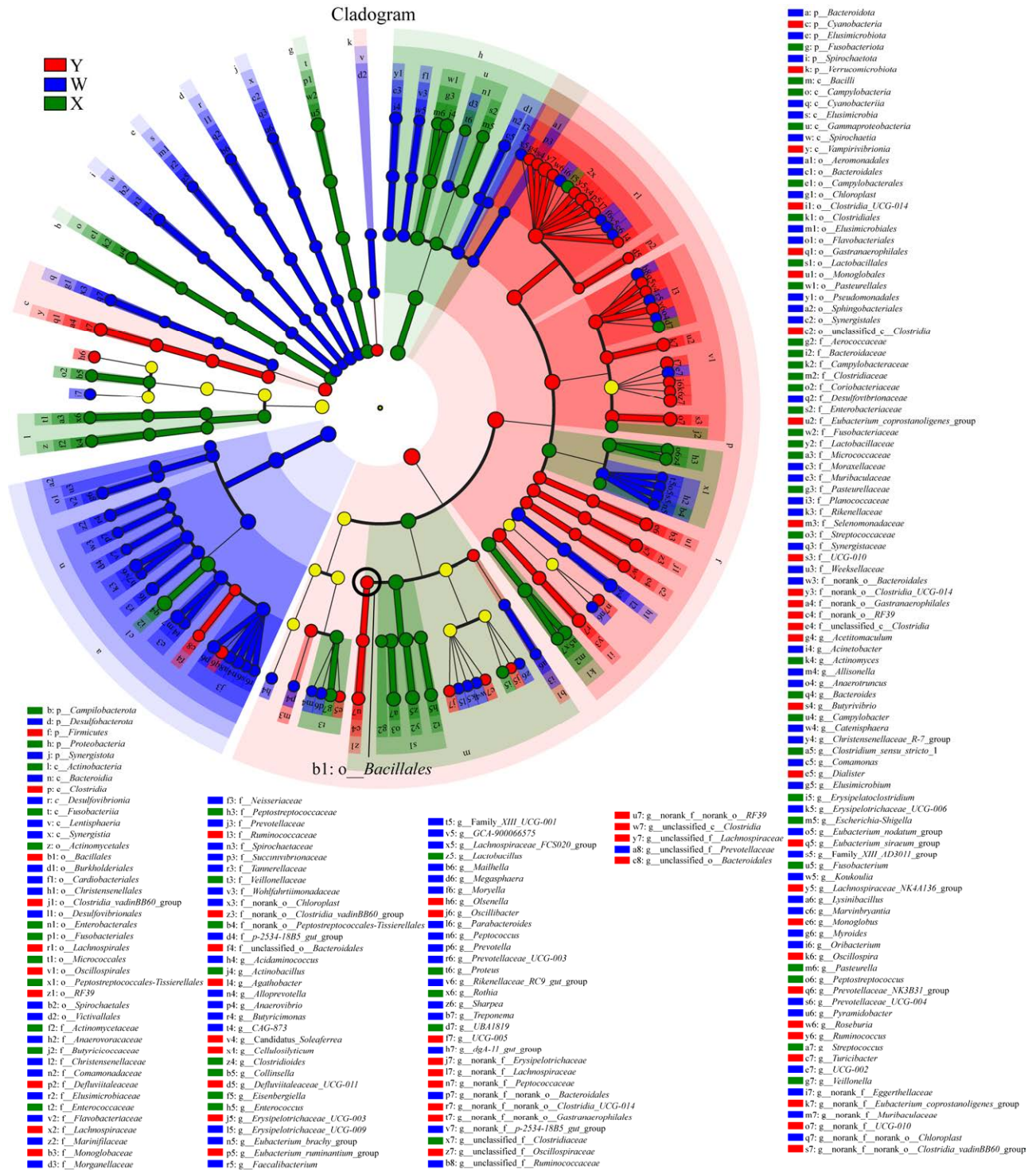


图5 LEfSe 多级物种层级树图 不同颜色的圆点表示该微生物类群在对应组中富集且与其他组存在组间差异；淡黄色圆点则表示该微生物类群在各组中均无显著差异。

Figure 5 LEfSe multilevel species diagram. Dots of different colours indicate that the microbial group is enriched in the corresponding group and differs from the other groups; Yellowish dots indicate that the microbial group is not significantly different in any of the groups.



另外,芽孢杆菌纲(*Bacilli*) (在 X 组富集)下的芽孢杆菌目(*Bacillales*) (b1: o\_\_*Bacillales*)在 Y 组显著富集,这暗示了野猪肠道中丰富的芽孢杆菌菌群。

## 2.2 益生芽孢杆菌的分离鉴定结果

为寻找新型益生芽孢杆菌,从野猪肠道中分离纯化得到 26 株芽孢杆菌,经过产纤维素酶活力初筛并剔除分离自同一粪便样品、形态相似的菌株后共得到 6 株芽孢杆菌,分别为菌株 8-2、9-2、10-1、11-1、11-3 和 12-2。其中挑取菌株 8-2 的单菌落后镜检显示菌株不纯,并且无法通过平板划线分离(图 6A)。将菌株 8-2 进行药敏试验,发现甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim, TMP)、红霉素(erythromycin, EM)和氯霉素(chloramphenicol, CAP)可以形成双抑菌环(图 6B),用接种环在内抑菌环侧的菌膜上挑取菌种接种于 LB 培养基中培养,分别命名为菌株 TMP8-2、CAP8-2 和 EM8-2。以菌株 9-2、10-1、11-1、11-3、12-2、TMP8-2、CAP8-2 和 EM8-2 的总 DNA 为模板扩增出 16S rDNA 片段,测序得到的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库,GenBank 登录号为 PQ659034–PQ659040。这些序列在 GenBank 通过 BLAST 与已知 16S rRNA 基因序列进行同源比较([https://blast.ncbi.](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

[nlm.nih.gov/Blast.cgi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)),结合菌株菌落形态和革兰氏染色结果对菌株进行鉴定。鉴定结果显示 8 株菌中菌株 11-3 和 12-2 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),菌株 9-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其余 5 株均为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。将 5 株 *B. velezensis* 的 16S rRNA 基因序列片段与 NCBI 数据库中相似性最高的模式菌株序列进行比对并构建系统发育树。菌株 EM8-2 虽然和菌株 TMP8-2 与菌株 CAP8-2 同样是分离自菌株 8-2,但与其他 *B. velezensis* 分为 2 支(图 7A)。选取 6 株代表菌株的 16S rRNA 基因序列与相似模式菌株序列构建系统发育树(图 7B),显示鉴定结果可信度高,发育树分支可信度都大于 90%。

## 2.3 菌株益生性能检测结果

### 2.3.1 纤维素酶活力检测结果

分得的所有菌株通过纤维素酶活力检测评定其纤维素酶活力大小。贝莱斯芽孢杆菌都展现出良好的纤维素酶活力,纤维素酶指数  $A_c(D/d)$  处于 1.67–1.86 之间,其中菌株 8-2 为 1.85,菌株 10-1 和菌株 11-1 为 1.86。菌株 9-2 也有一定的纤维素酶活力,纤维素酶指数  $A_c(D/d)$  为 1.67。

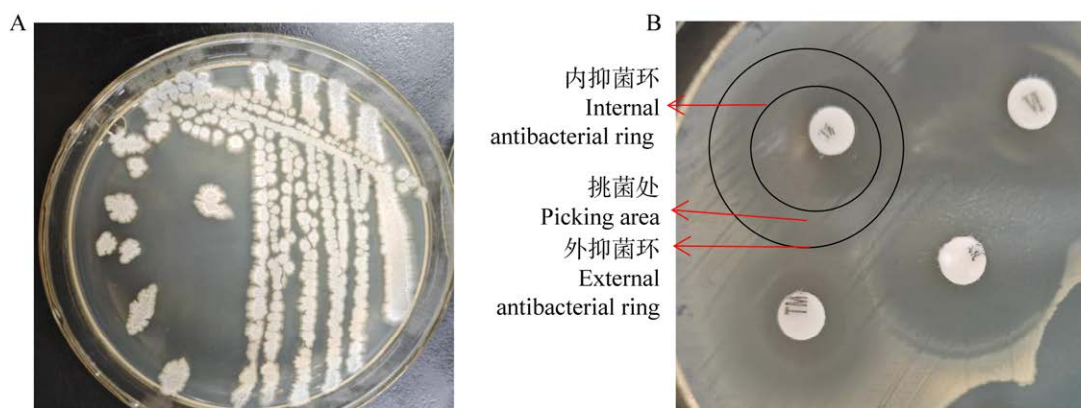


图 6 菌株 8-2 菌落形态(A)和药敏试验示意图(B)

Figure 6 Colony morphology of strain 8-2 (A) and schematic diagram of drug sensitivity test (B).

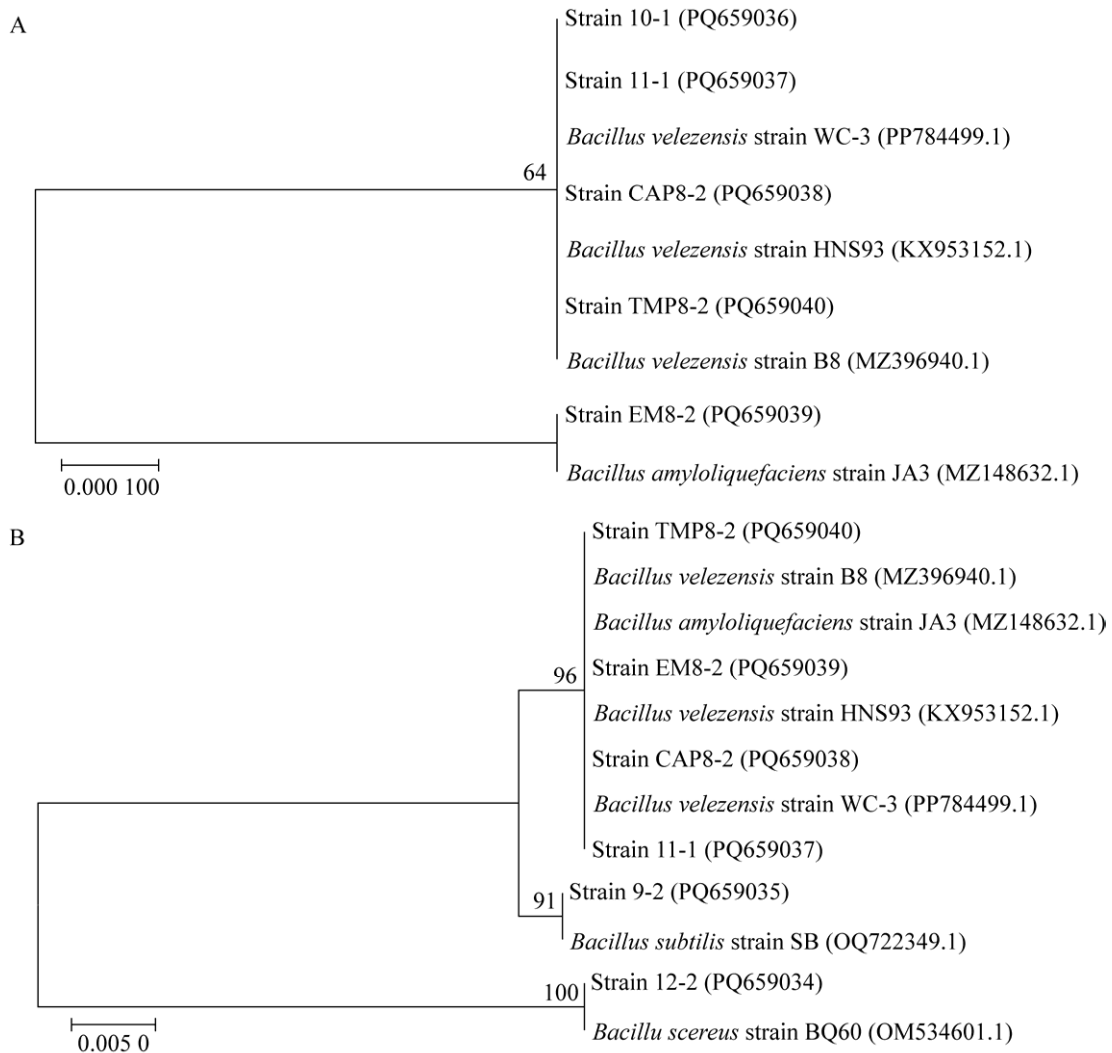


图 7 基于 16S rRNA 基因序列构建的贝莱斯芽孢杆菌(A)和产纤维素酶芽孢杆菌(B)的系统发育树分支点上的数字是自展值,代表进化树分支可信度的百分比;标尺 0.000 100 和 0.005 0 表示 0.01%和 0.50%的序列分歧。

Figure 7 Phylogenetic trees of *Bacillus velezensis* (A) and cellulase-producing *Bacillus* (B) based on 16S rRNA gene sequence. The numbers on the branching points are self-expansion values representing the percentage of evolutionary tree branching confidence; the scales 0.000 100 and 0.005 0 indicate 0.01% and 0.50% sequence divergence.

### 2.3.2 耐酸试验结果

菌株 8-2、9-2、10-1、11-1、11-3 和 12-2 这 6 株菌在 pH 4.0 的环境下培养 8 h 后活菌数均有较大程度降低,其中菌株 11-3 耐酸能力较强,仍有 5%存活率,菌株 8-2 耐酸能力最弱,只有 0.2%存活率。

### 2.3.3 产淀粉酶活力测定结果

产淀粉酶活力测定结果显示,所有菌株的淀粉酶活力比值  $A_a (D/d)$  均处于 1.65–2.33 之间。相较于其他菌株,菌株 9-2、10-1、11-3 和 12-2 都有较好的产淀粉酶能力,淀粉酶活力比值  $A_a (D/d)$  均在 2 以上,菌株 11-3 淀粉酶活力

比值最高, 为 2.33。

### 3 讨论

动物肠道微生物多样性与机体的健康息息相关, 肠道菌群除了协助宿主营养吸收和能量摄取外, 还可调控新陈代谢、促进肠道发育、参与免疫调控及增强抵抗力等<sup>[12]</sup>。在饮食、药物、应激和病原微生物等因素的影响下, 可以引起微生物多样性的改变并促进特定细菌类群的扩张, 从而引起肠道微生态失衡, 甚至导致疾病发生<sup>[13]</sup>。

近期, 野猪作为抗微生物药物耐药性储存库而备受关注。因其觅食习惯和行为, 容易接触自然疫源性病原体, 也因其抗病强的特点成为抗菌药耐药性病原的贮存宿主, 有学者认为野猪可能是检测自然环境中沙门氏菌(*Salmonella*)存在、流行和抗菌药耐药性的合适哨点<sup>[14]</sup>。然而少有文献研究报道野猪肠道微生态价值。野猪栖息环境复杂多样、食谱广泛, 这必然导致其肠道菌群丰富多样。在当今, 我国已经进入全面禁抗时代, 益生菌作为抗生素的替代物不仅可以调节和改善肠道微生态平衡, 还可以参与调节宿主免疫反应, 有助于宿主建立肠道健康屏障。了解野猪肠道微生物群组成和功能差异是分析微生物群对健康影响的前提条件, 有助于寻找更多潜在的益生菌菌株。本试验通过对 3 组猪的肠道菌群进行分析, 结果证明, 野猪和小型猪场散养的外三元猪肠道菌群多样性远高于大规模猪场的新美系猪。Chen 等<sup>[15]</sup>通过比较建立的猪整合基因目录发现, 相较于杜洛克猪, 野猪在属水平上具有更高的肠道微生物组  $\alpha$  多样性; 但在物种水平上未观察到这种差异。Kim 等<sup>[16]</sup>发现, 不同年龄段的猪粪便样本的多样性特征相似, 即随着猪年龄的增长, 机体微生物多样性受到粪便中细

菌成分丰度的影响较低。因此本试验可以基本排除 3 组猪年龄差异对肠道菌群多样性指数带来的影响。

从 3 组猪肠道菌群的组成来看, 野猪中相对丰度最高的是 *Firmicutes*, 另外 LEfSe 多级物种层级树图显示, *Bacillales* 在野猪肠道中的相对丰度高于另外 2 组, 这说明野猪肠道中丰富的芽孢杆菌资源对于分离益生芽孢杆菌有较大优势。在属水平上, 新美系的 *Fusobacterium* 相对丰度最高, 平均相对丰度高达 57.8%, 新美系猪的多样性低可能受其高丰度的 *Fusobacterium* 影响。Kostic 等<sup>[17]</sup>利用 FISH 技术发现 *Fusobacterium* 在结直肠癌中富集。*Fusobacterium* 在腹泻仔猪中的丰度也明显高于同窝的健康仔猪<sup>[18-19]</sup>。从肠道微生态角度来说, 规模化养殖商品猪腹泻等肠道疾病高发的病因可能与肠道菌群多样性偏低、*Fusobacterium* 相对丰度偏高有关。外三元猪和野猪肠道中有较多未分类的菌属富集, 如在外三元中丰度较高的 *norank\_f\_Muribaculaceae*、*unclassified\_f\_Prevotellaceae*、*norank\_f\_Eubacterium\_coprostanoligenes\_group*、*norank\_f\_Ruminococcaceae*, 以及野猪中丰度较高的 *unclassified\_f\_Lachnospiraceae*, 而新美系猪肠道中未分类菌属较少, 潜在未发现微生物概率也是最低的(*coverage* 指数最高)。说明野猪和散养外三元猪肠道中仍有许多未分类和鉴定的菌种, 肠道菌群鉴定、分类及建库的工作还需要进一步完善。

益生菌制剂由于其无药物残留、无毒副作用等特点作为抗生素替代品受到市场青睐<sup>[20]</sup>, 并且可以调节肠道微生态环境, 防治动物肠道疾病, 提高动物的抗病能力和生产性能<sup>[21]</sup>。本着探究野猪肠菌群、开发纤维素生物质资源的目的, 本试验依据菌群多样性分析结果, 采用刚果红染色法和羧甲基纤维素酶法尝试从芽孢杆

菌资源丰富的野猪肠道中分离具有纤维素酶活力的芽孢杆菌。最后分得的多株贝莱斯芽孢杆菌展现了较高的纤维素酶活力。贝莱斯芽孢杆菌作为一类产芽孢的革兰氏阳性杆菌，其作为益生菌制剂的研究报道较少。因为有着 99% 的 DNA-DNA 系统发育相似度，贝莱斯芽孢杆菌的一些成员先前被归类为枯草芽孢杆菌和淀粉芽孢杆菌<sup>[22]</sup>。近年来，由于贝莱斯芽孢杆菌基因组稳健性，以及用于农业管理植物病害的可能性，这些菌株受到了很多关注<sup>[22]</sup>。但是其作为微生物添加剂的潜力仍未被发掘。

据报道，*B. velezensis* 具有产生不同结构形式的抗菌物质的能力<sup>[23]</sup>。*B. velezensis* 产生的杆菌素和达菲菌素具有很强的抗菌作用<sup>[24]</sup>。杆菌素对有害藻类铜绿微囊藻具有约为 99% 的杀灭率，可用作靶向生物防治剂<sup>[25]</sup>。Guo 等<sup>[26]</sup>使用牛津杯方法对 *B. velezensis* ANSB01E 菌株的抗菌特性的评估表明，该菌株对各种致病细菌均具有抗菌特性，例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和沙门氏菌属 (*Salmonella*)。多株 *B. velezensis* 菌株在立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、黄曲霉毒素 B1 和玉米赤霉烯酮等的防治中都展现了良好的效果<sup>[26-30]</sup>。关于 *B. velezensis* 作为添加剂的生物安全方面，有研究报道通过喂食鲢鱼 *B. velezensis* AP193 可以稳定它们的肠道微生物群并改善池塘水质<sup>[31]</sup>。从仔猪肠道分得的 *B. velezensis* 菌株 Y1 用作家禽饲料中的益生菌时对生长性能和鸡蛋质量都展现出了良好效果<sup>[32]</sup>。这些都表明 *B. velezensis* 在动物饲料行业中具有巨大的潜力。

本试验分离的多株 *B. velezensis* 均有良好的纤维素酶活力，同时都具有较高的产淀粉酶活力。在本试验的 8 株菌中，*B. velezensis* 虽然在耐酸、淀粉酶活力方面略低于 *B. subtilis* 和

*B. cereus*，但是在产纤维素酶方面展现出明显优势，具有开发为益生菌候选菌株的潜力。另外，*B. velezensis* 8-2 中有 2 种及以上菌株无法通过平板划线分离，但是通过药敏试验分离得到 3 株 *B. velezensis*，其中 *B. velezensis* EM8-2 与其他 *B. velezensis* 的亲缘关系均较远，这种情况在微生物的研究中较少发现，多株 *B. velezensis* 的这种共生关系有待研究。

在动物饲料“禁抗”的背景下，从环境中发掘具有益生性能的新型菌株并研发微生物态制剂用于抗生素替代是非常有意义的。本研究利用微生物生态学原理，通过对不同饲养环境、不同品种的 3 组猪群肠道菌群组成差异分析，结合野猪的生活习性，从野猪的肠道分离筛选获得的益生 *B. velezensis*，具有较好的耐酸、产纤维素酶和淀粉酶等益生效果，其抑菌作用也在进一步地研究。自然界中还存在许多未鉴定和分类的菌种，野猪肠道微生物群这个领域还有很多问题有待研究。

## 4 结论

肠道菌群的开发和利用有利于促进养殖业的发展，有利于推进实现农业农村部“饲料禁抗、养殖减抗、产品无抗”绿色生产目标。发掘野猪肠道菌群中的新型菌株，对于发现新型益生菌株和深入了解肠道菌群作用机制具有深远意义。本研究通过比较野猪、散养外三元猪和规模化养殖新美系猪肠道菌群多样性，发现野猪肠道菌群表现出比商品猪和地方猪更高的多样性和丰富度，并且野猪肠道菌群组成非常不稳定、组间相似性低。这些结果说明野猪肠道有着丰富的微生物资源，具有探索新型益生菌株和新菌株的优势。依据微生物多样性分析结果和野猪杂食性特点，本试验从野猪肠道中分离出的多株 *B. velezensis* 表现出良好的产

纤维素酶活力,但是其最佳酶活条件有待探究,其他益生特性如抑菌、产蛋白酶等需要进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] 王道,李飞,李崇清,李腾飞,杨伶俐,杨瑞. 习水国家级自然保护区野猪活动特征和危害分析[J]. 野生动物学报, 2022, 43(2): 323-330.  
WANG X, LI F, LI CQ, LI TF, YANG LY, YANG R. Analysis on the activity rhythm and damage of wild boar (*Sus scrofa*) in Xishui national nature reserve[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2022, 43(2): 323-330 (in Chinese).
- [2] 周舒枫. 野猪移出名录 保护意识不减“三有”野生动物名录调整收录陆生野生动物 1 924 种[J]. 绿化与生活, 2023(8): 1-2.  
ZHOU SF. Wild boar's awareness of protection is not diminished when it is removed from the list. The list of "three haves" wild animals has been adjusted to include 1 924 species of terrestrial wild animals[J]. Greening and Life, 2023(8): 1-2 (in Chinese).
- [3] 唐玉花. 野猪资源的保护和利用研究[J]. 绿色科技, 2019, 21(6): 48-49.  
TANG YH. Study on protection and utilization of wild boar resources[J]. Journal of Green Science and Technology, 2019, 21(6): 48-49 (in Chinese).
- [4] 高峰,徐鹏. 家禽日粮豆粕减量替代技术研究进展[J]. 饲料工业, 2023, 44(20): 1-6.  
GAO F, XU P. Advance in technology of soybean meal reduction or substitution in poultry diets[J]. Feed Industry, 2023, 44(20): 1-6 (in Chinese).
- [5] LYND LR, WYMAN CE, GERNGROSS TU. Biocommodity engineering[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(5): 777-793.
- [6] BARUAH J, NATH BK, SHARMA R, KUMAR S, DEKA RC, BARUAH DC, KALITA E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products[J]. Frontiers in Energy Research, 2018, 6: 141.
- [7] MOON RJ, MARTINI A, NAIRN J, SIMONSEN J, YOUNGBLOOD J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites[J]. Chemical Society Reviews, 2011, 40(7): 3941-3994.
- [8] 杨光美. 贵州山地环境野猪空间分布、觅食地选择与危害特征研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2022.  
YANG GM. A study on spatial distribution, foraging site selection and damage characteristics of wild boar in mountainous environment of Guizhou province[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2022 (in Chinese).
- [9] 王翌,李森,李永锋,孙元,仇华吉. 野猪粪便中乳酸菌的分离鉴定及特性研究[J]. 中国农业科学, 2020, 53(14): 2964-2973.  
WANG Y, LI M, LI YF, SUN Y, QIU HJ. Identification and properties of lactic acid bacteria isolated from wild boar feces[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(14): 2964-2973 (in Chinese).
- [10] 杨艳红,张浩铂,姚心怡,贺禧,王哲. 高产纤维素酶芽孢杆菌的筛选、鉴定与发酵条件优化[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(2): 221-230.  
YANG YH, ZHANG HB, YAO XY, HE X, WANG Z. Screening, identification and fermentation condition optimization of *Bacillus* with high cellulase production[J]. Natural Product Research and Development, 2023, 35(2): 221-230 (in Chinese).
- [11] 孙昊岩,蒋立文,李珊珊,孙孟新,褚秀玲,苏建青. 一株鸡源芽孢杆菌的分离鉴定和益生性研究[J]. 家禽科学, 2018(1): 6-10.  
SUN HY, JIANG LW, LI SS, SUN MX, CHU XL, SU JQ. Isolation, identification and beneficial study of a *Bacillus* strain from chicken[J]. Poultry Science, 2018(1): 6-10 (in Chinese).
- [12] KÄHRSTRÖM CT, PARIENTE N, WEISS U. Intestinal microbiota in health and disease[J]. Nature, 2016, 535: 47.
- [13] WEISS GA, HENNET T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(16): 2959-2977.
- [14] NAVARRO-GONZALEZ N, MENTABERRE G, PORRERO CM, SERRANO E, MATEOS A, LÓPEZ-MARTÍN JM, LAVÍN S, DOMÍNGUEZ L. Effect of cattle on *Salmonella* carriage, diversity and antimicrobial resistance in free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51614.
- [15] CHEN CY, ZHOU YY, FU H, XIONG XW, FANG SM, JIANG H, WU JY, YANG H, GAO J, HUANG LS. Expanded catalog of microbial genes and metagenome-assembled genomes from the pig gut microbiome[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1106.
- [16] KIM HB, BOREWICZ K, WHITE BA, SINGER RS, SREEVATSAN S, TU ZJ, ISAACSON RE. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 153(1/2): 124-133.
- [17] KOSTIC AD, GEVERS D, PEDAMALLU CS, MICHAUD M, DUKE F, EARL AM, OJESINA AI, JUNG J, BASS AJ, TABERNERO J, BASELGA J, LIU C, SHIVDASANI RA, OGINO S, BIRREN BW, HUTTENHOWER C, GARRETT WS, MEYERSON M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma[J]. Genome Research, 2012, 22(2): 292-298.
- [18] 吴允正,陶天宇,张庆生,戴益民,曾秀,张玲,王娇,张锦华. 江西地区腹泻仔猪肠道致病菌谱的分析及梭杆菌的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(6): 1168-1177.  
WU YZ, TAO TY, ZHANG QS, DAI YM, ZENG X, ZHANG L, WANG J, ZHANG JH. Analysis of the pathogens of intestinal microflora in diarrhea piglets in Jiangxi Province and the isolation and identification of *Fusobacterium*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(6): 1168-1177 (in Chinese).
- [19] HAN CS, DAI YM, LIU BS, WANG LK, WANG JQ, ZHANG JH. Diversity analysis of intestinal microflora between healthy and diarrheal neonatal piglets from the same litter in different regions[J]. Anaerobe, 2019, 55: 136-141.
- [20] 廖灵通,李垚,孟玉玲,鲁东东,朱鹏飞,王蕾,李



- 丕武. 饲用益生菌的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2018, 39(6): 45-50.
- LIAO LT, LI Y, MENG YL, LU DD, ZHU PF, WANG L, LI PW. Recent advances in feeding probiotics[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2018, 39(6): 45-50 (in Chinese).
- [21] 郝生宏. 饲用枯草芽孢杆菌在畜禽健康养殖业中的应用进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(18): 65-67.
- HAO SH. Application progress of feed *Bacillus subtilis* in livestock and poultry healthy breeding industry[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015(18): 65-67 (in Chinese).
- [22] ADENIJI AA, LOOTS DT, BABALOLA OO. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(9): 3669-3682.
- [23] PEREIRA JQ, RITTER AC, CIBULSKI S, BRANDELLI A. Functional genome annotation depicts probiotic properties of *Bacillus velezensis* FTC01[J]. Gene, 2019, 713: 143971.
- [24] WU LM, WU HJ, QIAO JQ, GAO XW, BORRIS R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1395.
- [25] WU LM, WU HJ, CHEN LN, XIE SS, ZANG HY, BORRIS R, GAO XW. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7512-7520.
- [26] GUO YP, ZHOU JC, TANG Y, MA QG, ZHANG JY, JI C, ZHAO LH. Characterization and genome analysis of a zearalenone-degrading *Bacillus velezensis* strain ANSB01E[J]. Current Microbiology, 2020, 77(2): 273-278.
- [27] CHOWDHURY SP, UHL J, GROSCH R, ALQUÉRES S, PITTROFF S, DIETEL K, SCHMITT-KOPPLIN P, BORRIS R, HARTMANN A. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(9): 984-995.
- [28] YUAN J, RAZA W, SHEN QR, HUANG QW. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5942-5944.
- [29] SHU X, WANG YT, ZHOU Q, LI MH, HU H, MA YH, CHEN X, NI J, ZHAO WW, HUANG SW, WU LF. Biological degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by cell-free extracts of *Bacillus velezensis* DY3108 with broad pH stability and excellent thermostability[J]. Toxins, 2018, 10(8): 330.
- [30] KHALID F, KHALID A, FU YC, HU Q, ZHENG YF, KHAN S, WANG ZG. Potential of *Bacillus velezensis* as a probiotic in animal feed: a review[J]. Journal of Microbiology, 2021, 59(7): 627-633.
- [31] THURLOW CM, WILLIAMS MA, CARRIAS A, RAN C, NEWMAN M, TWEEDIE J, ALLISON E, JESCOVITCH LN, WILSON AE, TERHUNE JS, LILES MR. *Bacillus velezensis* AP193 exerts probiotic effects in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and reduces aquaculture pond eutrophication[J]. Aquaculture, 2019, 503: 347-356.
- [32] YE M, WEI CJ, KHALID A, HU Q, YANG R, DAI BH, CHENG HW, WANG ZG. Effect of *Bacillus velezensis* to substitute in-feed antibiotics on the production, blood biochemistry and egg quality indices of laying hens[J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 400.