

研究报告

朱鹮肠道微生物多样性与产酶活性

王华健¹, 兰阿峰^{*1,2,3,4}, 郭素芬^{1,2,3,4}, 段文斌⁵, 王琦^{1,2,3,4}, 牛克胜⁵

1 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001

2 陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所, 陕西 汉中 723001

3 陕西理工大学秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室(培育), 陕西 汉中 723001

4 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001

5 陕西汉中朱鹮国家级自然保护区管理局, 陕西 洋县 723300

王华健, 兰阿峰, 郭素芬, 段文斌, 王琦, 牛克胜. 朱鹮肠道微生物多样性与产酶活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4125-4140.

WANG Huajian, LAN Afeng, GUO Sufen, DUAN Wenbin, WANG Qi, NIU Kesheng. Intestinal microbial diversity and enzyme activities of crested ibis[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4125-4140.

摘要:【背景】朱鹮是我国国家一级保护动物, 属于世界上最濒危的鸟类之一。对朱鹮肠道微生物的多样性和产胞外酶活性进行分析, 可为朱鹮种群数量恢复提供思路。【目的】了解朱鹮肠道微生物的多样性, 测定其产胞外酶活性。【方法】采用纯培养的方法获得朱鹮肠道微生物, 通过革兰氏染色和生理生化鉴定, 结合 16S rRNA 基因扩增和序列分析对细菌进行鉴定。使用水解圈法筛选产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶的菌株。【结果】从人工喂养的朱鹮新鲜粪便中共分离到 296 株细菌, 共计 2 个门 11 个属。变形菌门(*Proteobacteria*) 236 株, 占分离总数的 79.73%, 分别为: 埃希氏菌属(*Escherichia*) 137 株, 占分离总数的 46.28%; 哈夫尼亚菌属(*Hafnia*) 39 株, 占分离总数的 13.18%; 变形菌属(*Proteus*) 28 株, 占分离总数的 9.46%; 柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*) 23 株, 占分离总数的 7.77%; 气单胞菌属(*Aeromonas*) 6 株, 占分离总数的 2.03%; 肠杆菌属(*Enterobacter*) 1 株, 占分离总数的 0.34%; 志贺菌属(*Shigella*) 1 株, 占分离总数的 0.34%; 克雷伯菌属(*Klebsiella*) 1 株, 占分离总数的 0.34%。厚壁菌门(*Firmicutes*) 60 株, 占分离总数的 20.27%, 分别为: 肠球菌属(*Enterococcus*) 33 株, 占分离总数的 11.15%; 库特氏菌属(*Kurthia*) 14 株, 占分离总数的 4.73%; 芽孢杆菌属(*Bacillus*) 13 株, 占分离总数的 4.39%。优势菌群为变形菌门(*Proteobacteria*)中的埃希氏菌属(*Escherichia*), 占细菌总数的 46.28%。经过生理生化鉴定, 每个菌株生理生化鉴定出的种属与各自的 16S rRNA 基因鉴定出的种属相一致。产酶活力分析结果显示有 238 株产蛋白酶、25 株产脂肪酶、24 株产淀粉酶、15 株产纤维素酶, 分别占分离总数的 80.41%、8.45%、8.11%和 5.07%。【结论】朱鹮肠道微生物分离出的细菌可分为 2 门 11 属,

资助项目: 陕西省科技厅项目(2015SZS-15-09)

This work was supported by the Project of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (2015SZS-15-09).

*Corresponding author. E-mail: lanafeng@snut.edu.cn

Received: 2022-12-15; Accepted: 2023-02-06; Published online: 2023-03-10

优势菌群为变形菌门(*Proteobacteria*)中的埃希氏菌属(*Escherichia*), 占细菌总数的 46.28%; 产酶活性分析显示, 80.41%的菌株具有产蛋白酶能力。

关键词: 朱鹮; 肠道微生物; 纯培养; 16S rRNA 基因; 产胞外酶

Intestinal microbial diversity and enzyme activities of crested ibis

WANG Huajian¹, LAN Afeng^{*1,2,3,4}, GUO Sufen^{1,2,3,4}, DUAN Wenbin⁵, WANG Qi^{1,2,3,4}, NIU Kesheng⁵

1 College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

2 Vitamin D Research Institute, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

3 Qinba State Key Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

4 Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

5 Shaanxi Hanzhong Crested Ibis National Nature Reserve, Yangxian 723300, Shaanxi, China

Abstract: [Background] The crested ibis (*Nipponia nippon*) is a national protected animal in China and one of the most endangered birds in the world. In this study, we analyzed the microbial diversity and extracellular enzyme activity in the gut of crested ibis, aiming to provide ideas for restoring the population of crested ibis. **[Objective]** To reveal the intestinal microbial diversity and extracellular enzyme activities of crested ibis. **[Methods]** The intestinal microorganisms of crested ibis were isolated by the pure culture method. The bacteria were identified by Gram-staining, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA gene sequencing. The strains producing amylase, protease, cellulase, and lipase were screened out by the hydrolysis circle method. **[Results]** A total of 296 strains of bacteria were isolated from the fresh excreta of artificially breeding Crested Ibis, belonging to 11 genera of 2 phyla. The 236 isolates of *Proteobacteria* accounted for 79.73% of the total isolates, including 137 (46.28%) isolates of *Escherichia*, 39 (13.18%) isolates of *Hafnia*, 28 (9.46%) isolates of *Proteus* sp., 23 (7.77%) isolates of *Citrobacter* sp., 6 (2.03%) isolates of *Aeromonas*, 1 (0.34%) isolate of *Enterobacter*, 1 (0.34%) isolate of *Shigella*, and 1 (0.34%) isolate of *Klebsiella*. The rest isolates (60, 20.27%) belonged to *Firmicutes*, including 33 (11.15%) isolates of *Enterococcus*, 14 (4.73%) isolates of *Kurthia*, 13 (4.39%) isolates of *Bacillus*. The dominant genus was *Escherichia* of *Proteobacteria*, with the isolates accounting for 46.28% of the total. The physiological and biochemical properties of each strain were consistent with the result of identification based on 16S rRNA gene sequence. The enzyme production experiments showed that 238, 25, 24, and 15 strains produced protease, lipase, amylase, and cellulase, accounting for 80.41%, 8.45%, 8.11%, and 5.07%, respectively. **[Conclusion]** The bacteria isolated from the intestine of crested ibis belonged to 11 genera of 2 phyla, among which *Escherichia* of *Proteobacteria* was dominant with the isolates accounting for 46.28% of the total, and 80.41%

of the strains had the ability of producing protease.

Keywords: crested ibis; gut microorganisms; pure culture; 16S rRNA gene; production of extracellular enzymes

朱鹮 (*Nipponia nippon*) 隶属于鹮形目 (*Pelecaniformes*) 鹮科 (*Threskiornithidae*), 我国国家一级保护动物。20 世纪中期, 由于气候变化、栖息地丧失、人类滥用农业化学品和对朱鹮的过度捕杀, 使得该鸟类个体数量急剧下降并一度被认为在野外灭绝^[1]。据不完全统计, 全球朱鹮种群数量已由 1981 年发现时的 7 只增加到现在的 7 000 余只^[2]。但从数量和分布上看, 朱鹮的分布区域仍比较集中, 种群还具有脆弱性^[3], 鉴于朱鹮保护取得的显著成效, 朱鹮的濒危等级由 2001 年的极危降为濒危^[4], 而根据世界自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 对于濒危物种的划分来看, 朱鹮现阶段并未摆脱濒危的等级^[5]。

目前, 肠道微生物逐渐成为研究热点, 越来越多的研究显示肠道微生物参与宿主营养吸收、能量调节、肠道发育、生理和免疫调节的功能^[6-7]。因此, 肠道微生物对宿主生存、繁殖^[8]和适应性^[9]都会产生影响。

当前对肠道微生物的研究以高通量测序技术为主, 但高通量测序技术存在自身的缺陷, 只是对菌株的单一片段进行测序, 获得菌株的分类地位, 无法获得单一的菌株, 也就无法进行后续研究。对于发现新菌或者更深入研究时, 纯培养技术往往更占优势。因此, 本研究采用纯培养技术分离朱鹮肠道微生物, 通过优化培养基配方、培养条件等因素, 分离出更多未培养的菌株, 结合分离菌株的产胞外酶能力, 以期为提高对朱鹮种群恢复提供更多的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集

在陕西省汉中市洋县朱鹮保护站采集到新鲜的朱鹮粪便样本, 取样方法见参考文献[10]。取样后迅速放置于 4 °C 冰箱备用, 2 d 内处理完^[11]。每只朱鹮采样量不低于 10 g, 在试验中准确称取 0.5 g 混匀样本用于试验, 其余样本放于 4 °C 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

2×Taq PCR Master Mix (with dye) 购自上海笛医生物科技有限公司; 分子试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 培养基材料购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 生化鉴定试剂购自广东环凯微生物科技有限公司。

超净工作台, 武汉爱斯佩科学仪器有限公司; 生化培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 热循环仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 凝胶紫外成像仪, Uvitec 公司; 电泳仪, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 恒温培养振荡器, 上海智诚分析仪器制造有限公司。

1.1.3 培养基

BHI 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 牛心浸粉 17.5 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 磷酸氢二钠 2.5 g, 琼脂 18 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 7.4, 用于培养对营养较为严格的细菌。

MRS 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉粉 8.0 g, 酵母浸粉 4.0 g, 磷酸氢二钾 2.0 g, 柠檬酸氢二铵 2.0 g, 乙酸钠 5.0 g, 硫酸镁 0.2 g, 硫酸锰 0.04 g, 琼脂 14.0 g, 吐温 80 1.0 g, 超纯水定

容至 1 000 mL, pH 6.5, 用于培养乳酸菌。

TSA 培养基: 胰蛋白胨 15.0 g, 大豆胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 7.3, 用于培养各类大多数细菌。

高氏一号培养基: 硝酸钾 1.0 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 可溶性淀粉 20.0 g, 琼脂 15 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 7.3, 用于培养放线菌。

产淀粉酶培养基: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉粉 3.0 g, 氯化钠 5.0 g, 可溶性淀粉 20.0 g, 琼脂 15 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 7.2, 用于筛选产淀粉酶的细菌。

产纤维素酶培养基^[12]: 蛋白胨 10.00 g, 牛肉粉 3.00 g, 氯化钠 5.00 g, 羧甲基纤维素钠 10.00 g, 刚果红 0.04 g, 琼脂 15 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 7.0, 用于筛选产纤维素酶的细菌。

产蛋白酶培养基^[13]: 酪蛋白 20.0 g, 琼脂 18.0 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 7.4, 用于筛选产蛋白酶的细菌。

产脂肪酶培养基^[14]: 蛋白胨 10.00 g, 牛肉粉 3.00 g, 氯化钠 5.00 g, 溴甲酚紫 0.04 g, PVA-橄榄油乳化剂 120 mL, 琼脂 15 g, 超纯水定容至 1 000 mL, pH 8.0, 用于筛选产脂肪酶的细菌。

上述培养基用 1 mol/L NaOH 调节到相应的 pH, 煮沸后分装, 除 BHI 培养基采用 115 °C 灭菌 20 min 外, 其余培养基均采用 121 °C 灭菌 15 min, 冷却至 60 °C 左右, 在超净工作台分装至直径 9 mm 的无菌培养皿中备用。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离与纯化及形态学鉴定

在无菌的条件下, 将朱鹮粪便样本混匀, 分别取 0.5 g 混匀样本放入 250 mL BHI、MRS、TSA、高氏一号液体培养基中, 37 °C 静置培养 24 h 后, 取对应菌液 1 mL 于 9 mL 无菌生理盐

水中, 10 倍比梯度稀释。经预实验后, 确定在 10^{-6} 浓度下, 最适合分离纯化。吸取 10^{-6} 浓度菌液分别涂布于 BHI、MRS、TSA、高氏一号固体培养基上, 37 °C 培养 12–16 h。使用甘油悬液冷冻法保藏菌种。通过革兰氏染色^[15]对菌株进行初步鉴定, 用生理生化鉴定管对菌株进行生理生化鉴定。

1.2.2 肠道细菌的 16S rRNA 基因扩增与鉴定

使用细菌 DNA 提取试剂盒对上述菌株的基因组进行提取后, 利用细菌的 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTCGCT CAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3')^[16]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix (with dye) 25 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 92 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 36 个循环; 72 °C 10 min。分别取 2 μ L 上述 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶紫外成像仪检测, 将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

测序结果使用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列相似度比对, 寻找相似度最高的序列, 确定细菌的分类水平, 以 97% 的相似度确定是否为潜在新菌种, 小于 97% 为潜在新菌种^[17]。

采用 MEGA 11.0^[18]软件中的 compute pairwise distances 计算遗传距离, 采用邻接法(neighbor joining method)对测序获得的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, bootstrap 自展 1 000 次检验系统发育树拓扑结构置信区间。

1.2.3 菌株产酶能力测定

将所有分离出的肠道细菌穿刺接种到相应筛选培养基上, 每种细菌在不同的筛选培养基上接种于 3 个不同的位置, 37 °C 培养 48 h。通过观察培养基上是否出现水解圈来确定对应菌

株是否产对应的胞外酶, 测量并记录水解圈直径(D)和菌落直径(d), 通过 D/d 的比值来比较各个菌株产酶能力大小。

对于产纤维素酶和产蛋白酶培养基, 若菌落周围出现无色透明环则记为阳性, 无透明环则为阴性; 对于产淀粉酶培养基, 在加入卢戈氏碘液后, 若菌落周围出现无色透明环则记为阳性, 无透明环则为阴性; 产脂肪酶培养基, 若菌落出现黄色水解圈则记为阳性, 无水解圈则为阴性。

1.2.4 统计学分析

使用 SPSS 21.0 中的单因素方差分析检验试验结果中 D/d 是否具有统计学意义, 齐方差时使用 S-N-K 检验, 异方差时使用 Dunnet's T3 检验, 进行显著性分析, $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 细菌分离与纯化及形态学鉴定结果

对朱鹮粪便样本中的微生物进行分离纯化

后, 最终得到 296 个纯化菌株。经过革兰氏染色后, 革兰氏阳性菌有 60 株, 占分离总数的 20.27%; 革兰氏阴性菌有 236 株, 占分离总数的 79.73%。部分菌株的菌落特征与显微特征见图 1。对上述分离得到的菌株进行生理生化鉴定, 选择每个种序列最长的菌株作为代表菌株^[19], 生理生化鉴定结果见表 1。经生理生化鉴定后, 各项指标与对应的 16S rRNA 基因鉴定结果保持一致。

2.2 16S rRNA 基因系统发育分析

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取上述细菌的基因组, PCR 扩增 16S rRNA 基因后, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 检测结果均为阳性, 所有扩增产物均在 1 500 bp 处有明亮且单一的电泳条带, 为可测序样本。PCR 扩增产物经测序和 BLAST 比对分析后, 可分为变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*) 2 门, 11 属(表 2), 整理序列并提交 NCBI 中的 GenBank 数据库并获得登录号(OP755752–OP756047)。

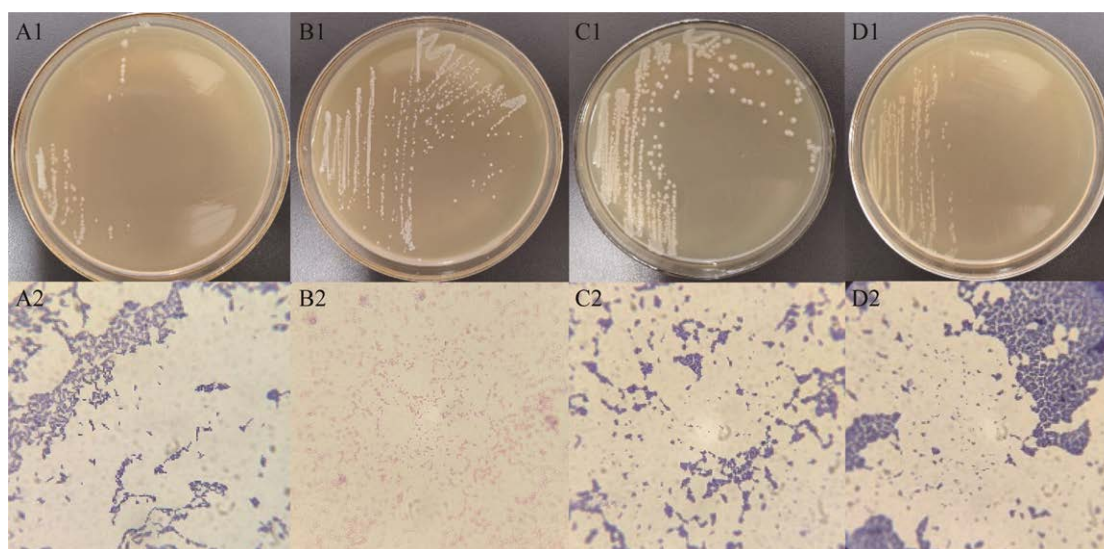


图 1 部分菌种的菌落特征与显微特征(100×) A1–D1: 菌落图; A2–D2: 对应的显微图

Figure 1 Colony characteristics and microscopic characteristics (100×) of some species. A1–D1: The colony diagram; A2–D2: The corresponding micrograph.

表 1 部分细菌的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification of some bacteria

菌株编号 Strain No.	甘露醇 Mannitol	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose	七叶苷 Aescin	硫化氢 H ₂ S	尿素 Urea	苯丙氨酸 Phenylalanine	明胶 Gelatin	枸橼酸 Citric acid	过氧化酶 Peroxidase	接触酶 Catalase	硝酸盐还原 Nitrate reduction	M-R	V-P
AB107	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
AT99	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
ABA32	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
ABA34	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
ABA37	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
AB054	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
A2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
B3	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
AT82	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
AT94	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
AT105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
AT89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
AT81	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
AT168	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
AT214	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
AT11	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
AB015	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
AM029	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
AM038	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
AM074	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
AG128	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
AG124	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
AB105	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

上述 296 株细菌的 16S rRNA 基因多样性序列比对结果见表 2, 其中, 变形菌门(*Proteobacteria*) 236 株, 占分离总数的 79.73%, 分别为: 埃希氏菌属(*Escherichia*) 137 株, 占分离总数的 46.28%; 哈夫尼亚菌属(*Hafnia*) 39 株, 占分离总数的 13.18%; 变形菌属(*Proteus*) 28 株, 占分离总数的 9.46%; 柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*) 23 株, 占分离总数的 7.77%; 气单胞菌属(*Aeromonas*) 6 株, 占分离总数的 2.03%; 肠杆菌属(*Enterobacter*) 1 株, 占分离总数的 0.34%; 克雷伯菌属(*Klebsiella*) 1 株, 占分离总

数的 0.34%; 志贺菌属(*Shigella*) 1 株, 占分离总数的 0.34%。厚壁菌门(*Firmicutes*) 60 株, 占分离总数的 20.27%, 其中肠球菌属(*Enterococcus*) 33 株, 占分离总数的 11.15%; 库特氏菌属(*Kurthia*) 14 株, 占分离总数的 4.73%, 芽孢杆菌属(*Bacillus*) 13 株, 占分离总数的 4.39%。经序列比对, 未培养菌有 225 株, 占分离总数的 76.01%。

基于代表菌株的 16S rRNA 基因构建的系统发育树见图 2。由图 2 可知, 系统发育树可分为两大支, 厚壁菌门(*Firmicutes*)与变形菌门

表 2 朱鹮肠道细菌可培养细菌 16S rRNA 基因多样性序列比对

Table 2 Sequence alignment of 16S rRNA gene diversity of culturable bacteria in the gut of crested ibis

细菌类群 Strain group	克隆数量 Clone number	代表克隆 Representative clones	相似菌株 Similar strains	相似度 Identify (%)
<i>Escherichia</i>	136	AB107	Uncultured organism clone ELU0013-T78-S-NI_000598 (HQ743023)	99.86
	1	AG128	<i>Escherichia fergusonii</i> strain MSP11b (MG984083.1)	96.67
<i>Hafnia</i>	27	AT94	Uncultured bacterium (AJ487023.1)	99.44
	12	AT168	<i>Hafnia alvei</i> strain 13-1275 (ON746755.1)	99.76
<i>Enterococcus</i>	12	ABA37	<i>Enterococcus hirae</i> strain 708 (CP055232.1)	100.00
	11	ABA30	Uncultured bacterium clone a2 (ON745455)	99.72
	9	AT81	Uncultured organism clone ELU0020-T93-S-NI_000045 (HQ745899.1)	99.93
	1	AT214	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU4888 (MF424888.1)	99.36
<i>Proteus</i>	13	AB054	Uncultured organism clone ELU0080-T380-S-NI_000270 (HQ776505.1)	99.79
	11	AT105	Uncultured beta proteobacterium clone OUT-11 BBA (JN981931.1)	99.79
	4	AB001	Uncultured bacterium clone CR_68 (JX457190)	99.40
<i>Citrobacter</i>	17	AT82	Uncultured bacterium clone aaa97d11 (DQ816685.1)	99.28
	5	AT11	Uncultured bacterium clone 218002-280 (JQ940873.1)	99.47
	1	AM074	Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone LHE104 (JX093178.1)	99.62
<i>Kurthia</i>	14	AM029	<i>Kurthia gibsonii</i> strain TY-06 (MN960342.1)	99.20
<i>Bacillus</i>	8	ABA32	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain cqs2 (MN826517.1)	100.00
	2	ABA34	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone S-35 (JF411336)	99.93
	2	ABA2	<i>Bacillus velezensis</i> strain KKLW (CP054714.1)	99.71
	1	B3	<i>Bacillus halotolerans</i> strain S-5 (CP101718.1)	99.93
<i>Enterobacter</i>	1	AB105	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain IPBCC 19.1426 (MN428803.1)	98.70
<i>Aeromonas</i>	6	AG124	<i>Aeromonas</i> sp. strain J16OP4 (MN519543.1)	99.17
<i>Klebsiella</i>	1	AB015	<i>Klebsiella aerogenes</i> strain ZM_BH_PB36 (OK642718.1)	97.16
<i>Shigella</i>	1	AM038	<i>Shigella sonnei</i> strain PartP-Ssonnei-RM8376 (CP064376.1)	99.71

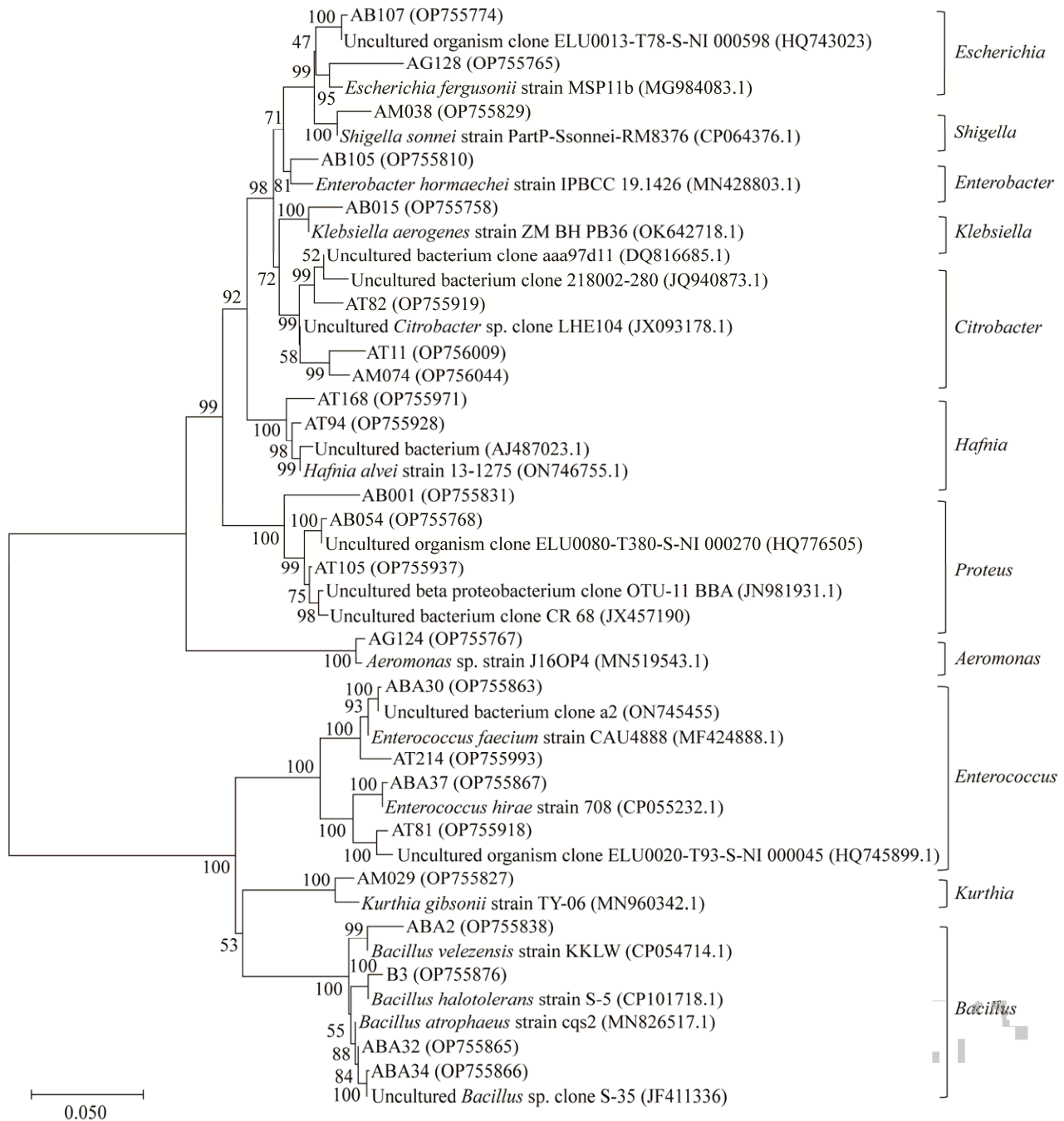


图 2 基于朱鹮肠道细菌 16S rRNA 基因序列构建的部分代表性分离菌株与相近种之间的系统发育树 括号内的编号为序列的 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示构建系统树 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 标尺 0.050 为遗传距离

Figure 2 Phylogenetic tree between representative isolates and related species of crested ibis based on 16S rRNA gene sequence of intestinal bacteria. Numbers in brackets are GenBank accession numbers of sequences; The number on the branch point represents the percentage of the node formed when the system tree is constructed for 1 000 calculations; The scale 0.050 is the genetic distance.

(*Proteobacteria*) 各占一支。在变形菌门(*Proteobacteria*)的分支中,以 AB107 为代表的未培养细菌和以 AG128 为代表的可培养细菌与埃希氏菌属(*Escherichia*)聚在一起,以 AM038 为代表的可培养细菌与志贺菌属(*Shigella*)聚在一起,以 AB105 为代表的可培养细菌与肠杆菌属(*Enterobacter*)聚在一起,以 AB015 为代表的可培养细菌与克雷伯菌属(*Klebsiella*)聚在一起,以 AT11、AT82、AM074 为代表的未培养细菌与柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)聚在一起,以 AT94、AT168 为代表的未培养细菌与哈夫尼亚菌属(*Hafnia*)聚在一起,以 AB054、AT105、AB001 为代表的未培养细菌与变形菌属

(*Proteus*)聚在一起,以 AG124 为代表的未培养细菌与气单胞属(*Aeromonas*)聚在一起;在厚壁菌门(*Firmicutes*)的分支中,以 AM029 为代表的未培养细菌与库特菌属(*Kurthia*)聚在一起,以 ABA30、AT81、AT214 为代表的未培养细菌和以 ABA37 为代表的可培养细菌与肠球菌属(*Enterococcus*)聚在一起,以 ABA34 为代表的未培养细菌和以 ABA32、ABA2、B3 为代表的可培养细菌与芽孢杆菌属(*Bacillus*)聚在一起。

2.3 肠道细菌产酶筛选

经蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶 4 种筛选培养基筛选后,部分筛选结果如图 3 所示。

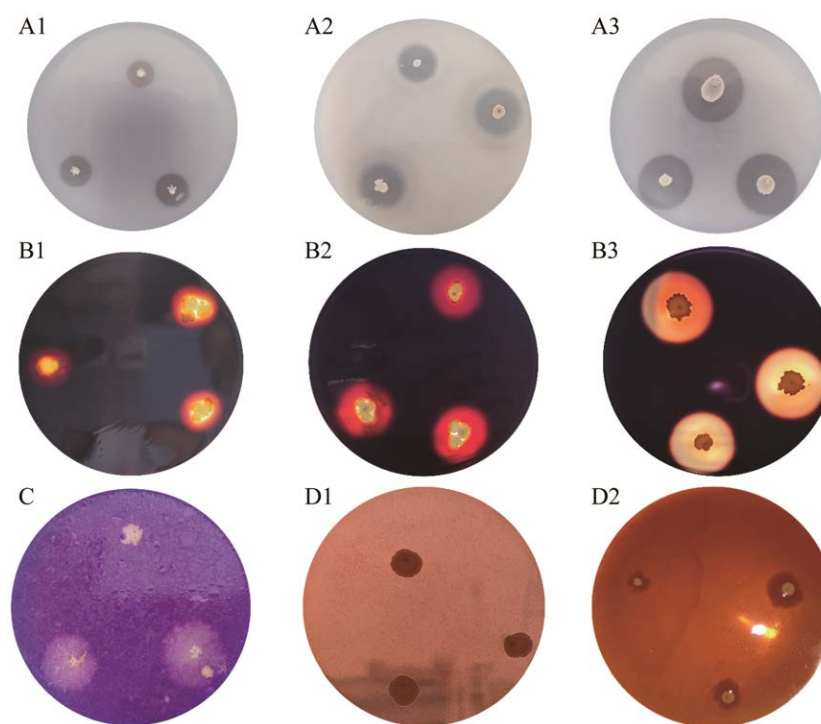


图 3 部分菌株产胞外酶筛选图 A: 产蛋白酶菌株图; A1-A3: 产胞外酶能力差异, 由小到大排列。B: 产淀粉酶菌株图; B1-B3: 产胞外酶能力差异。C: 产脂肪酶菌株 AM029。D: 产纤维素酶菌株, 由小到大排列

Figure 3 Screening results of representative strains producing extracellular enzymes. A: The protease producing strains; A1-A3: The difference in extracellular enzyme production capacity, which are arranged from small to large. B: The amylase producing strains; B1-B3: The difference in the ability to produce extracellular enzymes. C: Lipase producing strain AM029. D: The cellulase producing strains, which are arranged from small to large.

经蛋白酶筛选培养基筛选出 238 株细菌产蛋白酶, 占菌株总数的 80.41%; 经脂肪酶筛选培养基筛选出 25 株细菌产脂肪酶, 占菌株总数的 8.45%, 经淀粉酶筛选培养基筛选出 24 株细菌产淀粉酶, 占菌株总数的 8.11%, 经纤维素酶筛选培养基筛选出 15 株细菌产纤维素酶, 占菌株总数的 5.07%。部分筛选结果见表 3。

根据朱鹮肠道可培养细菌的 16S rRNA 基因多样性序列比对结果, 在 11 个属中各挑选 1 个代表菌株, 共挑选出 23 个代表菌株用于分析,

由于产脂肪酶的代表菌株只有 2 个, 因此额外选择了 1 个产脂肪酶的细菌以进行显著性分析。

产纤维素酶的细菌主要分布在库特氏菌属和志贺氏菌属, 产淀粉酶的细菌主要分布在芽孢杆菌属、变形菌属和克雷伯菌属, 产蛋白酶的细菌主要分布在埃希氏菌属、芽孢杆菌属、变形菌属、柠檬酸杆菌属、哈夫尼亚菌属、克雷伯菌属、库特氏菌属和志贺氏菌属, 产脂肪酶的细菌主要分布在芽孢杆菌属、克雷伯菌属、库特氏菌属和志贺氏菌属。

表 3 朱鹮肠道部分细菌产胞外酶筛选结果

Table 3 Screening results of extracellular enzymes produced by some bacteria in the gut of crested ibis

菌株号 Strain No.	纤维素酶 Cellulase	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	脂肪酶 Lipase	分类水平 Classification level
AB107	—	—	+	—	<i>Escherichia coli</i>
AT99	—	—	—	—	<i>Enterococcus faecalis</i>
ABA32	—	+	+	+	<i>Bacillus atrophaeus</i>
ABA34	—	+	+	—	<i>Bacillus</i> sp.
ABA37	—	—	—	—	<i>Enterococcus hirae</i>
AB054	—	+	+	—	<i>Proteus mirabilis</i>
ABA2	—	—	+	—	<i>Bacillus velezensis</i>
B3	—	—	—	+	<i>Bacillus halotolerans</i>
AT82	—	—	+	—	<i>Citrobacter braakii</i>
AT94	—	—	+	—	<i>Hafnia paralvei</i>
AT105	—	—	+	—	<i>Proteus vulgaris</i>
AB001	—	—	—	—	<i>Proteus terrae</i>
AT81	—	—	—	—	<i>Enterococcus gallinarum</i>
AT168	—	—	—	—	<i>Hafnia alvei</i>
AT214	—	—	—	—	<i>Enterococcus faecium</i>
AT11	—	—	+	—	<i>Citrobacter freundii</i>
AB015	—	+	+	+	<i>Klebsiella aerogenes</i>
AM029	+	—	+	+	<i>Kurthia gibsonii</i>
AM038	+	—	+	+	<i>Shigella sonnei</i>
AM074	—	—	—	—	<i>Citrobacter portucalensis</i>
AG128	—	—	—	—	<i>Escherichia fergusonii</i>
AG124	—	—	—	—	<i>Aeromonas veronii</i>
AB105	—	—	+	—	<i>Enterobacter hormaechei</i>

+: 该菌株具有产消化酶的能力; —: 该菌株无产消化酶的能力

+: The strain has the ability to produce digestive enzymes; —: The strain has no ability to produce digestive enzymes.

产胞外酶细菌的能力和种类各不相同, 如图 4 所示, 在所有代表菌株中, 筛选出 3 株具有产纤维素酶能力的代表菌株, 产酶能力如图 4A 所示; 筛选出 4 类具有产淀粉酶能力的代表菌株, 如图 4B 所示, 其中以 ABA34 为代表的菌株产酶能力最强; 筛选出 13 类具有产蛋白酶能力的代表菌株, 如图 4C 所示, 其中以

ABA32、AB054 为代表的菌株产酶能力最强 ($D/d > 4.0$); 筛选出 5 类具有产脂肪酶能力的代表菌株, 如图 4D 所示, 其中以 AM029 为代表的菌株产酶能力最强。

在产纤维素酶的代表菌株中, 菌株 AM029 与 AM038 和 AM015 产酶能力之间差异性显著; 在产淀粉酶的代表菌株中, 以 ABA34 和

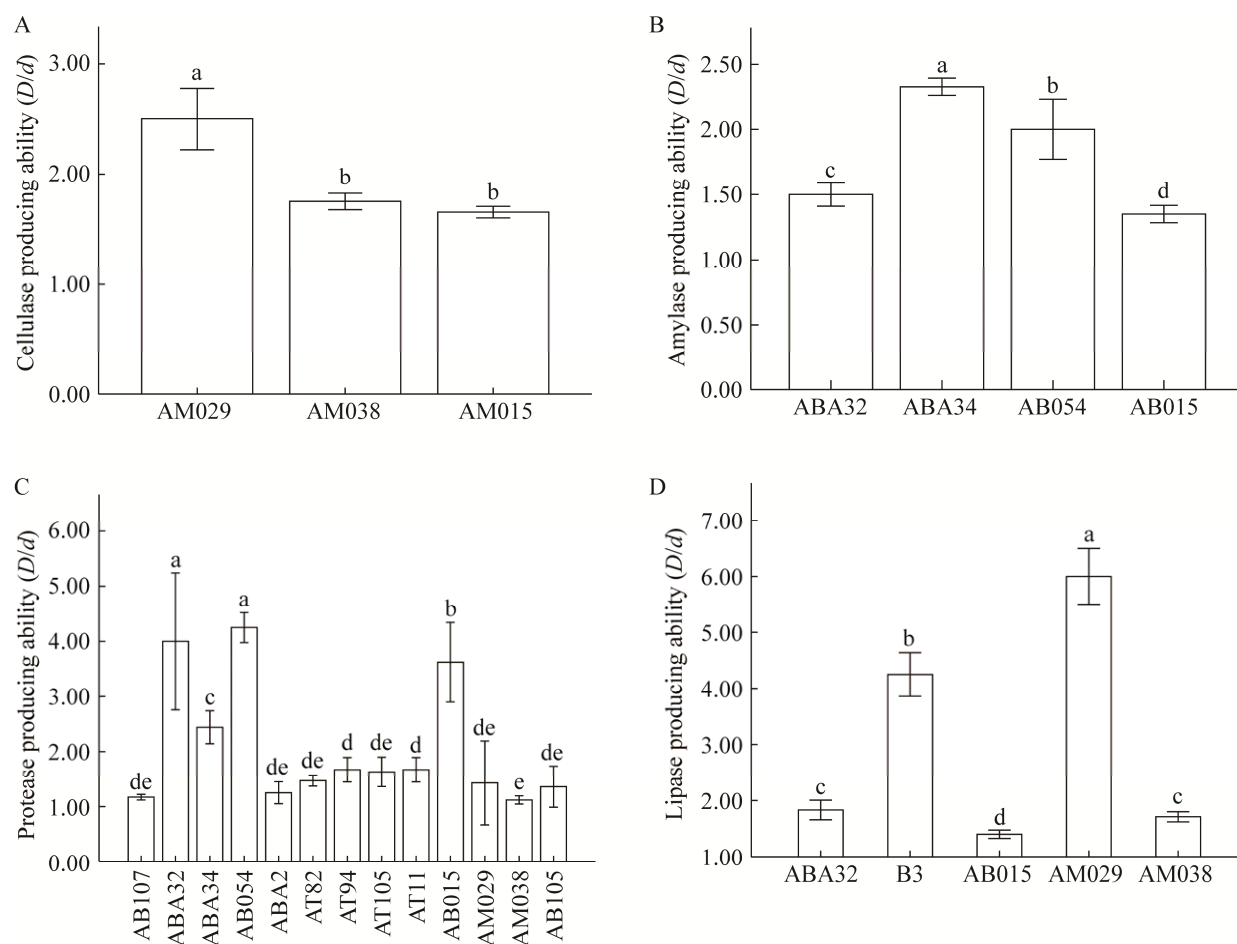


图 4 朱鹮肠道部分代表性细菌产胞外酶分析结果 A: 产纤维素酶的菌株及其活力. B: 产淀粉酶的菌株及其活力. C: 产蛋白酶的菌株及其活力. D: 产脂肪酶的菌株及其活力. D/d : 降解圈直径与菌落直径之比; D : 降解圈直径; d : 菌落直径. 不同小写字母代表存在显著性差异

Figure 4 Analysis of extracellular enzymes produced by some representative bacteria in the gut of crested ibis. A: Strains producing cellulase and their cellulase producing ability. B: Strains producing amylase and their amylase producing ability. C: Strains producing protease and their protease producing ability. D: Strains producing lipase and their lipase producing ability. D/d : The ratio of the diameter of the degradation circle D to the diameter of the colony (d); D : Degradation zone diameter; d : Colony diameter. Different lowercase letters represent significant difference.

AB054 为代表的菌株产酶能力差异性显著；在产蛋白酶代表菌株中，以 ABA32 和 AB054 为代表的菌株与以 AB015 为代表的菌株产酶能力之间差异性显著；在产脂肪酶代表菌株中，以 AM029 和 B3 为代表的菌株产酶能力之间差异性显著，以 B3 为代表的菌株与以 ABA32、AB015、AM038 为代表的菌株产酶能力之间差异性显著。

朱鹀肠道部分可培养细菌产胞外酶种类和能力分析如图 5 所示。其中，在变形菌属中，以 AB001、AB054 和 AT105 为代表的三类菌株，AB054 和 AT105 所代表菌株都具有产蛋白酶的能力，以 AB054 所代表菌株产消化酶的综合能力最强，可以产生淀粉酶及蛋白酶且产蛋白酶能力最强($D/d=4.25$)，而以 AT105 为代表的菌株仅可产蛋白酶，以 AB001 为代表的菌株无产消化酶能力；在芽孢杆菌属中，以 ABA32、ABA34、ABA2 为代表的菌株和 B3 都具有产消化酶的能力，其中以 ABA32 为代表的菌株产消化酶能力最强，可以产淀粉酶、蛋白酶、脂肪

酶，而产蛋白酶的能力最强($D/d=4.0$)，以 ABA34 为代表的菌株可产淀粉酶和蛋白酶，以 ABA2 为代表的菌株可产蛋白酶，B3 可产脂肪酶；在柠檬酸杆菌属中，以 AT82、AT11 为代表的两类菌株和 AM074 中，以 AT82 和 AT11 所代表的菌株仅有产蛋白酶的能力，以 AT11 所代表的菌株产蛋白酶能力最强($D/d=1.67$)；在克雷伯菌属中，AB015 产消化酶综合能力最强，可以产生淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶且产蛋白酶的能力最强($D/d=3.6$)；在库特氏菌属中，以 AM029 为代表的菌株可产淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶，其中产纤维素酶的能力最强($D/d=2.5$)；在志贺氏菌属中，AM038 可以产纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶，其中产纤维素酶的能力最强($D/d=1.75$)；在哈夫尼亚菌属中，以 AT94 和 AT168 为代表的两类菌株中，仅有以 AT94 为代表的菌株可以产生一种消化酶即蛋白酶，而以 AT168 为代表的菌株无产消化酶的能力；在肠杆菌属中，以 AB105 为代表的菌株仅可产蛋白酶；在气单胞菌属中，以 AG124 为代表的菌株

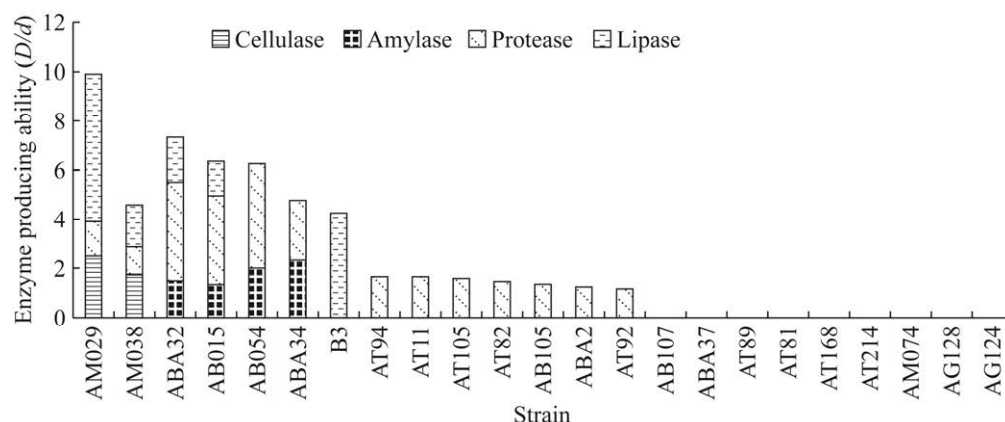


图 5 朱鹀肠道部分代表性细菌产胞外酶种类和能力分析 D/d : 降解圈比值; D : 降解圈直径; d : 菌落直径

Figure 5 Analysis of extracellular enzyme producing species and ability of some representative bacteria in the gut of Crested Ibis. D/d : The ratio of the diameter of the degradation circle D to the diameter of the colony (d); D : Degradation zone diameter; d : Colony diameter.

无产消化酶的能力; 在埃希氏菌属中, 以 AB107、AG128 为代表的两类菌株均无产消化酶的能力; 在肠球菌属中, 以 ABA30、ABA37、AT81 为代表的 3 类菌株和 AT214 均无产消化酶的能力。

综上所述, 在朱鹮肠道分离的菌株中, 有高达 84.80% 的菌株具有产胞外酶的能力, 尤其是 ABA32、AB015、AM029 这三类菌株产胞外酶能力最强, 可作为研发朱鹮肠道细菌对宿主健康影响的功能菌株。

3 讨论

鸟类肠道中存在多种共生菌, 在健康动物中, 菌群和宿主间存在着一种平衡, 以维持稳定的状态, 从而保障宿主的健康。但这种平衡也会被外界因素打乱, 例如年龄、环境、食物的改变。

肠道微生物群可以通过改善宿主免疫能力从而对宿主健康产生积极影响。有研究表明, 生物与其肠道微生物一起进化, 微生物群落可以在环境压力下增加宿主对不利环境的适应度, 如存活率、表型可塑性和繁殖性能^[20]。同时, 越来越多的证据表明, 肠道微生物对于宿主的健康、营养、代谢、免疫等有重大影响^[21]。

有报道显示, 从隐士朱鹮 (*Geronticus eremita*) 肠道中分离得到 1 234 株细菌, 分为 5 门 37 属, 其中, 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 为优势菌门, 占分离总数的 40%; 其次是变形菌门 (*Proteobacteria*), 占分离总数的 32%; 放线菌门 (*Actinobacteria*) 占分离总数的 19%, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 占分离总数的 7%, 梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 占分离总数的 2%^[22]。本研究与文献^[22]的主要差异为采用的培养基类型及培养条件设置, 从而导致部分特定条件的细菌无法被分离。同时, 文献^[22]中的日粮为切碎的老鼠、

牛心和 1 日龄的小鸡, 日粮组成比较丰富, 而在本研究中, 朱鹮的日粮仅为活泥鳅, 日粮组成比较单一, 可能是导致本次分离的可培养细菌种类偏少的原因之一。本研究探讨的朱鹮肠道微生物的产胞外酶活力在查阅的文献中未提及。有研究从山齿鹑 (*Colinus virginianus*) 的盲肠和泄殖腔中分别分离出 69 株和 71 株细菌, 在盲肠中, 50 株为厚壁菌门, 11 株为变形菌门, 6 株为放线菌门, 2 株为拟杆菌门; 在泄殖腔中, 47 株为厚壁菌门, 19 株为放线菌门, 5 株为变形菌门^[23]。由于朱鹮是国家保护动物, 无法对不同部位进行取样, 在取样方面有所限制, 因此, 本研究采用粪便样本, 可能会使分离出的细菌在门的水平上相对较少; 也有可能存在样品储存、培养基未针对朱鹮肠道菌群优化调整等因素, 造成可培养细菌的多样性较低。有研究从野生高山兀鹫 (*Gyps himalayensis*) 肠道中分离得到了 119 株细菌, 分为 6 个属, 分别是埃希氏菌属 (*Escherichia*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、莫拉氏菌属 (*Moraxella*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、类梭菌属 (*Paenibacillus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*)^[19]。本研究分离得到的细菌种类与文献^[19]相比, 均有埃希氏菌属 (*Escherichia*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*), 但文献^[19]中还分离得到条件致病菌奥斯陆莫拉氏菌 (*Moraxella osloensis*) 与索氏类梭菌 (*Paenibacillus sordellii*), 这在本研究中未分离得到。产生这种差异的原因可能是因为兀鹫是食腐性鸟类, 而本研究的养殖朱鹮主要以新鲜的泥鳅为食。

较高丰度的厚壁菌门可以帮助宿主肠道的发育以及对能量的需求^[24], 肠球菌属属于乳酸菌, 作为当前的研究热点, 部分肠球菌菌株已被用于各类药物、食品上, 同时也可以制成微生态制剂^[25]。在本次研究中发现了 4 株肠球菌,

其中海氏肠球菌^[26]和屎肠球菌^[27]均具有益生作用,这些益生菌在朱鹮肠道中的作用机理尚不明晰,可以作为日后的研究重点。

由于园区对朱鹮仅饲喂活泥鳅,泥鳅为高蛋白低脂肪食物,而根据朱鹮的食谱显示,野生朱鹮的食谱较宽泛,除了活泥鳅,也会以小昆虫和野果为食,而这些食物会含有一定量的淀粉和纤维素。人工养殖的朱鹮最终目的是放归大自然,因此在本研究中使用蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶这4类培养基进行筛选。

本研究所分离的可产胞外酶细菌中,有238株产蛋白酶、25株产脂肪酶、24株产淀粉酶、15株产纤维素酶,分别占分离总数的80.41%、8.45%、8.11%和5.07%。泥鳅作为成年朱鹮的主要食物,其含有丰富的蛋白质^[28],在朱鹮肠道细菌中,有一半以上的细菌可以产生蛋白酶,这正好符合了朱鹮的食性,蛋白酶可以有效分解泥鳅中的蛋白质,为宿主提供营养;而脂肪酶的含量相对较少,这可能是因为泥鳅中的脂肪含量远少于蛋白质^[29],从而导致可以分解利用脂肪的细菌无法定殖。本研究筛选出24株产淀粉酶的细菌,占菌株总数的8.11%;15株产纤维素酶的细菌,占菌株总数的5.07%。朱鹮以泥鳅等鱼类作为主食,但也会摄入少量昆虫,因此可能会影响产淀粉酶与产纤维素酶的细菌在朱鹮肠道内的定殖。

本研究还分离得到志贺氏菌^[30]、蜂房哈夫尼亚菌^[31]两类致病菌,以及维氏气单胞菌^[32]、弗式柠檬酸杆菌^[33]两类条件致病菌。对于两类致病菌,应定期检查饲喂地点的环境卫生状况,必要时可进行消杀处理;对于两类条件致病菌,由于朱鹮偏好泥鳅这样的小鱼,这样的生活特性注定会受到维氏气单胞菌和弗式柠檬酸杆菌的威胁,而这两种条件致病菌在水体中广泛存在,因此应该定期检查人工湖的菌群

数量并进行持续监测,必要时人工投放相关制剂进行预防。

4 结论

本研究采用纯培养技术对朱鹮肠道微生物进行了多样性和产胞外酶活力研究。共分离得到296株细菌,经形态学鉴定与生理生化鉴定,结合16S rRNA基因分子生物学鉴定后,共分为2门11属。在门的分类上,变形菌门(*Proteobacteria*)为优势菌门,占细菌总数的79.73%;在属的分类上,埃希氏菌属(*Escherichia*)为优势菌属,占细菌总数的46.28%。其中,有238株产蛋白酶、25株产脂肪酶、24株产淀粉酶、15株产纤维素酶,分别占分离总数的80.41%、8.45%、8.11%和5.07%。在本研究的基础上,可以进一步了解朱鹮肠道可培养细菌的多样性,同时更深层次地挖掘这些菌株的产酶活力和益生功能,以提高朱鹮的人工喂养水平,为朱鹮种群更快地恢复提供理论支持。

REFERENCES

- [1] 王晓宇, 咎林森. 朱鹮保护分子生物学研究进展[J]. 陕西林业科技, 2021, 49(6): 90-94.
WANG XY, ZAN LS. Research progress of molecular biology in the conservation of crested ibis[J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 2021, 49(6): 90-94 (in Chinese).
- [2] LI XH, FU JY, ZHAI TQ, ZHANG YZ, BRUFORD MW, SUN YH, ZHAN XJ. Understanding recovery is as important as understanding decline: the case of the crested ibis in China[J]. Land, 2022, 11(10): 1817.
- [3] 闫鲁, 黄治学. 35年来朱鹮的保护经验与发展思路[J]. 野生动物学报, 2021, 42(3): 890-896.
YAN L, HUANG ZX. Thirty-five years conservation experience of crested ibis (*Nipponia nippon*) and future perspectives[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(3): 890-896 (in Chinese).
- [4] 张智, 丁长青. 中国朱鹮就地保护与研究进展[J]. 科技导报, 2008, 26(14): 48-53.
ZHANG Z, DING CQ. The *in situ* conservation of

- created ibis and relate research progress[J]. Science & Technology Review, 2008, 26(14): 48-53 (in Chinese).
- [5] RASMUSSEN PC. Threatened birds of Asia: the bird life international red data book[J]. The Auk, 2004, 121(2): 619-622.
- [6] 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.
- [7] WAITE DW, TAYLOR MW. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 673.
- [8] KAKUMANU ML, REEVES AM, ANDERSON TD, RODRIGUES RR, WILLIAMS MA. Honey bee gut microbiome is altered by In-hive pesticide exposures[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1255.
- [9] BLUMSTEIN DT, RANGCHI TN, BRIGGS T, de ANDRADE FS, NATTERSON-HOROWITZ B. A systematic review of carrion eaters' adaptations to avoid sickness[J]. Journal of Wildlife Diseases, 2017, 53(3): 577-581.
- [10] 史怀平, 杨增岐, 操胜. 健康朱鹮消化道正常菌群的分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(3): 69-74.
- SHI HP, YANG ZQ, CAO S. Isolation and Identification of normal flora in healthy *Nipponia nippon* enteron[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2008, 36(3): 69-74 (in Chinese).
- [11] HAQ H, 张沁怡, 黎烨, 陈明波, 薛海翌, 罗成松, 方行, 刘平平, 蒋宁成, 张婷, 熊娟, 田宝玉. 宠物犬肠道可培养细菌耐药性种类及其分布[J]. 福建农业科技, 2020(4): 9-16.
- HAQ H, ZHANG QY, LI Y, CHEN MB, XUE HZ, LUO CS, FANG X, LIU PP, JIANG NC, ZHANG T, XIONG J, TIAN BY. Types and distribution of the drug resistance of the culturable bacteria in the intestinal tract of pet dogs[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2020(4): 9-16 (in Chinese).
- [12] 何志伟, 董起钰, 刘锐, 李欣, 刘欣, 徐从武, 赵鑫祺, 万晴, 张忠. 白斑蛾蚋幼虫肠道可培养细菌的分离鉴定与产消化酶活性分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2021, 32(2): 224-229.
- HE ZW, DONG QY, LIU R, LI X, LIU X, XU CW, ZHAO XQ, WAN Q, ZHANG Z. Isolation and identification of culturable intestinal bacteria from *Clogmia albipunctata* larvae and analysis of their digestive enzyme-producing activities[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2021, 32(2): 224-229 (in Chinese).
- [13] 黄振东, 万晴, 薛志静, 张瑞玲, 张忠. 德国小蠊肠道可培养非厌氧细菌的分离、鉴定与产消化酶活性分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(4): 409-413.
- HUNAG ZD, WAN Q, XUE ZJ, ZHANG RL, ZHANG Z. Isolation and identification of culturable aerobic bacteria from the intestines of *Blattella germanica* and the activity of digestive enzymes produced by these bacteria[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2019, 30(4): 409-413 (in Chinese).
- [14] 张小龙, 曹娜, 张续, 黄振东, 谢晓晨, 丰硕, 万晴, 张瑞玲, 张忠. 普通卷甲虫肠道可培养细菌的分离、鉴定及产消化酶活性[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(3): 269-273, 277.
- ZHANG XL, CAO N, ZHANG X, HUANG ZD, XIE XC, FENG S, WAN Q, ZHANG RL, ZHANG Z. The digestive enzyme activities of culturable bacteria isolated from intestine of pill bug, *Armadillidium vulgare*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2020, 32(3): 269-273, 277 (in Chinese).
- [15] 王贺祥. 农业微生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 345-346.
- WANG HX. Agricultural Microbiology[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2003: 345-346 (in Chinese).
- [16] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [17] DRANCOURT M, BERGER P, RAOULT D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(5): 2197-2202.
- [18] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [19] 候建平, 郑思思, 龙鑫, 海佳怡, 王稳, 朱丽琳. 高山兀鹫肠道微生物的分离鉴定与耐药性分析[J]. 野生动物学报, 2021, 42(2): 460-469.
- HOU JP, ZHENG SS, LONG X, HAI JY, WANG W, ZHU LL. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of gut microbiota from Himalayan vulture (*Gyps himalayensis*)[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(2): 460-469 (in Chinese).

- [20] ZILBER-ROSENBERG I, ROSENBERG E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(5): 723-735.
- [21] NICHOLSON JK, HOLMES E, KINROSS J, BURCELIN R, GIBSON G, JIA W, PETTERSSON S. Host-gut microbiota metabolic interactions[J]. Science, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [22] SPERGSE J, LONCARIC I, TICHY A, FRITZ J, SCOPE A. The cultivable autochthonous microbiota of the critically endangered Northern bald ibis (*Geronticus eremita*)[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195255.
- [23] SU HW, McKELVEY J, ROLLINS D, ZHANG M, BRIGHTSMITH DJ, DERR J, ZHANG SP. Cultivable bacterial microbiota of northern bobwhite (*Colinus virginianus*): a new reservoir of antimicrobial resistance?[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99826.
- [24] POLANSKY O, SEKELOVA Z, FALDYNNOVA M, SEBKOVÁ A, SISAK F, RYCHLIK I. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 82(5): 1569-1576.
- [25] 鲁旭, 张影, 曾明. 益生性肠球菌安全性评价研究进展与监管[J]. 中国药事, 2019, 33(5): 555-560.
- LU X, ZHANG Y, ZENG M. Research progress and regulation of safety evaluation of probiotic *Enterococcus*[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2019, 33(5): 555-560 (in Chinese).
- [26] 贺曦, 徐淑琴, 马祥兆, 陈晓慧, 贺晓龙, 冶贵生. 藏羊源肠道海氏肠球菌的分离鉴定及益生特性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, 2021(22): 63-68, 150.
- HE X, XU SQ, MA XZ, CHEN XH, HE XL, YE GS. Isolation and identification of *Enterococcus hirae* from intestine of Tibetan sheep and its probiotic properties[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 2021(22): 63-68, 150 (in Chinese).
- [27] 雷喜玲, 叶金云, 陈丽仙, 李爱科, 王薇薇, 乔琳, 王丽. 屎肠球菌的作用机制及其在水产动物中的应用[J]. 饲料工业, 2022, 43(22): 9-15.
- LEI XL, YE JY, CHEN LX, LI AK, WANG WW, QIAO L, WANG L. Mechanism of *Enterococcus faecium* and its application in aquatic animals[J]. Feed Industry, 2022, 43(22): 9-15 (in Chinese).
- [28] 钦传光, 韩定献, 董先智, 黄开勋, 徐辉碧. 泥鳅及其提取物中营养成分的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 123-126.
- QIN CG, HAN D(S/X), DONG XZ, HUANG KX, XU HB. Study on nutrient compositions of loach and its extractives[J]. Food Science, 2002, 23(2): 123-126 (in Chinese).
- [29] 周美玉, 李达, 李安东, 韩财安, 黄根勇, 刘皖蒙. 野生和养殖大鳞副泥鳅营养成分比较分析[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(6): 134-138.
- ZHOU MY, LI D, LI AD, HAN CA, HUANG GY, LIU WM. Comparison of nutrient composition of wild and farmed *Paramisgurnus dabryanus*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61(6): 134-138 (in Chinese).
- [30] 邓征宇. 一株志贺氏菌分离株对肉鸡致病性试验[J]. 中国畜禽种业, 2021, 17(3): 69-70.
- DENG ZY. Pathogenicity test of a *Shigella* isolate to broilers[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2021, 17(3): 69-70 (in Chinese).
- [31] 杨志, 王康, 李冠宗, 孙玉林, 杨福梅, 孙旺, 周可, 代飞燕. 麝子源蜂房哈夫尼亚菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5072-5082.
- YANG Z, WANG K, LI GZ, SUN YL, YANG FM, SUN W, ZHOU K, DAI FY. Isolation, identification, and biological characterization of *Hafnia alvei* from a barking deer[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5072-5082 (in Chinese).
- [32] 张飘, 胡安东, 杨霞, 潘吉脉, 姜海波, 文明. 一株草鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及毒力基因分析[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(3): 848-855.
- ZHANG P, HU AD, YANG X, PAN JM, JIANG HB, WEN M. Isolation identification and virulence gene analysis of a grass carp *Aeromonas veronii*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(3): 848-855 (in Chinese).
- [33] 徐静, 冯永其, 段俊堂, 刘蓬. 1株灰鹦鹉源弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(12): 60-61.
- XU J, FENG YQ, DUAN JT, LIU P. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a *Citrobacter freundii* strain from gray parrot[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(12): 60-61 (in Chinese).