

研究报告

多培养基联合探究朱鹮肠道微生物多样性

兰阿峰^{1,2}, 李玲义¹, 王华健¹, 郭素芬^{*1,3}, 王琦^{1,2,3}

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 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

3 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723001

兰阿峰, 李玲义, 王华健, 郭素芬, 王琦. 多培养基联合探究朱鹮肠道微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1673-1696.

LAN Afeng, LI Lingyi, WANG Huajian, GUO Sufen, WANG Qi. Application of multiple culture media in characterization of microbial diversity in the crested ibis gut[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1673-1696.

摘要:【背景】肠道微生物与宿主健康密切相关。作为我国一级保护动物, 朱鹮的肠道微生物组成结构的研究对于其种群数量的恢复具有重要意义。【目的】研究朱鹮肠道微生物多样性, 以期阐明朱鹮肠道可培养微生物多样性, 发掘朱鹮肠道潜在有益微生物资源。【方法】采用了三大类十八小类培养基对成年健康朱鹮的肠道细菌进行了分离, 结合 16S rRNA 基因扩增和序列分析对分离获得的细菌进行鉴定分析。【结果】共分离得到了 1 245 株细菌, 经鉴定为 3 门 22 属 82 种, 在门水平上, 变形菌门(*Proteobacteria*)作为优势菌门, 占分离总数的 71.00%, 在纲水平上, 变形菌纲(*Proteobacteria*)和芽孢杆菌纲(*Bacilli*)为优势菌群, 分别占分离总数的 71.00%和 27.23%, 在属水平上, 埃希氏菌属(*Escherichia*)为优势菌属, 占分离总数的 46.75%。第一类为基础培养基, 共包含九小类培养基, 总计获得 561 株纯化细菌, 其中包括放线菌门(*Actinomycetota*)的细菌。主要为埃希氏菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)的细菌; 第二类为添加粪便上清培养基, 共含六小类培养基, 总计获得 539 株纯化细菌, 主要是假单胞菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)、梭菌属(*Clostridium*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*); 第三类为添加鱼肉培养基, 共包含三小类培养基, 总计获得 145 株纯化细菌, 主要为气单胞菌属(*Aeromonas*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、哈夫尼菌属(*Hafnia*)和肥杆菌属(*Obesumbacterium*)。此外, 三大类培养基在各分类水平上都体现了不同的选择性。所有培养基中, 除了 MRS 以及 MRS 筛选培养基的优势菌门是厚壁菌门(*Firmicutes*)外, 其他培养基所获得的优势门都是变形菌门。本研究还发现 96 株肠球菌属的细菌中, 有 82 株细菌所属种被报道具有益生作用, 占分离总数的 6.59%; 此外有 62 株为潜在新菌, 占分离总数的 4.98%, 其中基础培养基和粪便上清培养基中的新菌率相对较高。【结论】采用多培养基联合探究朱鹮肠道微生物多样性, 丰富了朱鹮肠道中的微生物种类, 为后期朱鹮肠道微生物资源挖掘奠定

资助项目: 陕西省重点研发计划(2023-YBNY-091); 陕西省教育厅科技计划(20JS024)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2023-YBNY-091), and the Science and Technology Program of Shaanxi Provincial Department of Education (20JS024).

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

Received: 2024-07-22; Accepted: 2024-08-31; Published online: 2024-10-31

了坚实基础,也为后期开发有益微生物积累了丰富且稀有的菌种资源。

关键词: 朱鹮; 肠道微生物; 16S rRNA 基因; 多培养基联合; 微生物多样性

Application of multiple culture media in characterization of microbial diversity in the crested ibis gut

LAN Afeng^{1,2}, LI Lingyi¹, WANG Huajian¹, GUO Sufen^{*1,3}, WANG Qi^{1,2,3}

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

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

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

Abstract: [Background] The gut microorganisms are closely associated with host health. As a first-class protected species in China, investigating the composition and structure of the gut microbiota in crested ibises holds significant importance for the restoration of their population. **[Objective]** To investigate the microbial diversity (cultivable microorganisms) in the gut of crested ibis (*Nipponia nippon*) and explore the beneficial microbial resources. **[Methods]** We used eighteen subtypes of culture media belonging to three main types to isolate gut bacteria from healthy adult crested ibises. The isolated bacteria were identified and analyzed by 16S rRNA gene amplification and sequence analysis. **[Results]** A total of 1 245 bacterial strains were isolated and identified as 82 species belonging to 22 genera of three phyla. The dominant phylum was *Proteobacteria*, with the isolates accounting for 71.00% of the total isolates. *Proteobacteria* and *Bacilli* were the dominant classes, with the isolates accounting for 71.00% and 27.23%, respectively. *Escherichia* was the dominant genus, with the isolates accounting for 46.75% of the total isolates. Basic media constituted the first type, including nine subtypes, on which 561 bacterial strains were isolated, primarily including *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, and *Streptomyces* belonging to *Actinomycetota*. The media supplemented with fecal supernatant constituted the second type, including six subtypes, on which 539 bacterial strains were isolated, predominantly including *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vagococcus*, *Clostridium*, *Exiguobacterium*, and *Lysinibacillus*. The media supplemented with fish were the third type, including three subtypes, on which 145 bacterial strains were isolated, predominantly including *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Hafnia*, and *Obesumbacterium*. The three main types of media exhibited different selectivity toward microorganisms at various taxonomic levels. The dominant phylum isolated by MRS and MRS selective media was *Firmicutes*, while that isolated by other media was *Proteobacteria*. Among the 96 strains of *Enterococcus*, 82 strains were reported to have probiotic effects, accounting for 6.59% of the total isolates. Additionally, 62 strains were identified as potential new species, accounting for 4.98% of the total isolates, and they were mainly isolated by the basic media and the media supplemented with fecal supernatant. **[Conclusion]** We employed multiple culture media to investigate the microbial diversity in the crested ibis gut. The findings enriched the variety of microorganisms found in the crested ibis gut,

lay a solid foundation for the future exploration of gut microbial resources in the crested ibis, and accumulate a wealth of rare strain resources for the development of beneficial microorganisms.

Keywords: crested ibis; gut microorganisms; 16S rRNA gene; multiple medium combination; microbial diversity

朱鹮(*Nipponia nippon*), 作为国家保护动物, 其肠道微生物的研究对于了解其健康状况、提高保护措施和改善饲养条件具有重要意义。动物的肠道内存在大量微生物, 研究表明, 这些肠道微生物在维持宿主生理稳态、免疫调节、系统发育和代谢调节等方面发挥着关键作用^[1-4]。因此, 肠道微生物对于宿主的生存、饮食和发育尤为重要, 而通过饮食、微生物移植等方法可以调节肠道微生物的组成^[5-9]。研究朱鹮肠道微生物的组成结构, 有助于揭示朱鹮的消化机制、幼雏发育不良的潜在原因以及饲料利用效率低的原因, 还能帮助理解朱鹮异常生理状态, 这些信息将为提高朱鹮的食物转化率、改善发育不良个体以及疾病防控提供科学依据^[10]。

自然界中存在着大量种类繁多, 功能丰富的微生物, 它们是地球的各类资源的生产者、分解者和消费者。尽管传统的纯培养技术已经分离出许多微生物, 但也仅占有所有微生物总数的 1%^[11], 仍有超过 99% 的微生物无法被培养。在实验室的条件下, 由于无法完全模拟出微生物原本的生存环境, 大部分微生物处于一种未培养(viable but non-culturable, VBNC)状态, 无法用传统的方法分离出^[12]。尽管大量微生物无法被培养, 纯培养技术仍然不可被近些年新兴的分子技术完全取代, 因为即便知道某个微生物具有独特的代谢途径或是很强的生物功能, 倘若无法分离纯化, 就无法验证其功能和代谢途径, 想要造福于人类也就无法实现。食品、药品的研发离不开单一菌株, 因此, 如何在体外获得更多的单一菌株成为当今的一大难题。

目前对微生物的筛选主要是通过现有的培

养基进行分离纯化, 但大多数基础培养基的营养浓度都相对较高, 自然界中的微生物通常生活在资源贫乏的环境中, 在高浓度培养基上, 适应能力强或生长迅速的微生物可能会抑制生长速度较慢的微生物^[13]。由于生存环境的改变, 例如某些特殊的理化条件、生长因子、营养条件等, 当缺少该部分条件时, 部分微生物将无法生存, 从而无法被有效分离^[14]。因此, 对于这些生长缓慢、对环境有着特殊要求、难以在一般人工环境下生长的细菌, 可以采取改变培养基组成或培养环境条件等方法对这些细菌进行有效分离。

本研究旨在探究不同培养基对朱鹮肠道微生物的分离效果的影响。为此, 我们设计了三类培养基, 一类是 LB 等基础培养基, 一类是通过向基础培养基中添加粪便上清液的改良培养基, 一类是根据朱鹮食性设计的添加鱼肉的培养基。采用纯培养的方法进行微生物的分离和纯化, 并通过 16S rRNA 基因序列的分子手段进行肠道细菌物种鉴定, 以揭示朱鹮肠道微生物的多样性, 发掘潜在新菌, 并探讨分离菌株作为益生菌的潜在应用。

1 材料与方法

1.1 样品

在陕西省汉中市洋县朱鹮保护站无菌采集到 10 只(分别为 5 只雌性、5 只雄性)新鲜的成年健康朱鹮粪便样本^[15]。取样后迅速处理样品, 剩余样品置于 4 °C, 2 d 内处理完^[16]。采样时每只朱鹮采样量不得少于 10.0 g, 在实验中, 准确称取 2.0 g 样品并将其混匀, 剩余样本放于 4 °C 保存备用^[17]。鲫鱼、泥鳅、黄粉虫由陕西

省汉中市洋县朱鹮保护站提供。

1.2 主要试剂和仪器

2×*Taq* PCR Master Mix (with dye), 上海笛医生物科技有限公司; 引物和 DNA 提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 培养基成分, 天津市申泰化学试剂有限公司。

超净工作台, 上海智城分析仪器制造有限公司; 生化培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; PCR 仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.3 培养基

所用培养基分为三大类十八小类。第一大类是文献[17]中提到的脑心浸液肉汤培养基(Brain-Heart Infusion Broth, BHI)、MRS 德氏乳杆菌培养基(de Man, Rogosa and Sharpe, MRS)、胰酪大豆胨琼脂培养基(tryptose soya agar, TSA)、高氏一号培养基、LB 培养基^[18]和牛肉膏蛋白胨培养基(beef extract peptone medium, BE)^[19]等基础培养基, 以及高氏一号、MRS 筛选和 LB 寡营养此类针对性培养基, 即九小类。

针对性培养基配方如下:

高氏一号筛选培养基(g/L): KNO₃ 1.00, K₂HPO₄ 0.50, FeSO₄ 0.01, MgSO₄·7H₂O 0.50, NaCl 0.50, 可溶性淀粉 20.00, 琼脂 15.00, 重铬酸钾 0.04, pH 7.3±0.2。

MRS 筛选培养基(g/L): 蛋白胨 10.00, 牛肉粉 8.00, 酵母浸粉 4.00, K₂HPO₄ 2.00, C₆H₁₄N₂O₇ 2.00, CH₃COONa 5.00, MgSO₄·7H₂O 0.20, MnSO₄ 0.04, 琼脂 15.00, 吐温-80 1.00, 溴甲酚绿 0.04, pH 6.5±0.2。

LB 寡营养培养基(g/L): 蛋白胨 1.0, 酵母浸粉 0.5, NaCl 1.0, 琼脂 15.0, pH 7.1±0.2。

第二大类是在基础培养基的基础上添加浓度为 2%、4%、6% 的朱鹮粪便上清, 将其分别命名为 AG、BG、CG 和 AB、BB、CB, 即为

六小类, 制备方法为: 将 5.0 g 粪便加入 50 mL 超纯水中, 以 4 000 r/min 离心 20 min, 收集上层水相, 即为粪便上清液。

第三大类是依据朱鹮食性配制的添加鱼肉的培养基, 依据添加肉汤的比例不同将其分为 F、T、FS 三小类, 其制备方法为将 100.0 g 鲫鱼和 200.0 g 泥鳅加入 1.0 L 超纯水中, 煮制 30 min, 用纱布过滤得到鱼肉浸汤; 培养基中黄粉虫的处理: 直接将黄粉虫打碎后与琼脂一起加入培养基中。因为测得朱鹮粪便 pH 值为 7.3, 粪便上清添加培养基和鱼肉添加培养基的 pH 值均调整为 7.3。

上述培养基用 1 mol/L NaOH 和 HCl 调节至相对应 pH 值, 煮沸后分装, 121 °C 灭菌 15 min, 当培养基冷却至 60 °C 左右, 在超净工作台中心倒至直径 9 mm 的无菌培养皿中备用, 每种培养基 3 个重复。

1.4 细菌的分离纯化及形态学鉴定

在超净工作台将朱鹮粪便样本混匀, 取 2.0 g 样品于 18 mL 生理盐水中, 10 倍梯度稀释。预实验后, 确定最适合分离纯化浓度为 10⁻⁵^[17]。吸取 10⁻⁵ 浓度稀释液, 涂布于 1.3 所述三大类固体培养基上, 每种培养基 3 个重复, 37 °C 恒温培养 12–16 h。用甘油悬液冷冻法保藏菌种, 革兰氏染色^[20]对菌株进行初步鉴定。

1.5 肠道细菌的 16S rRNA 基因扩增与鉴定

按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取上述固体培养基所分离菌株的基因组 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTCGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[21]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×*Taq* PCR Master Mix (with dye) 25 μL, 模板 DNA 2 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 92 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C

90 s, 36 次循环; 72 °C 10 min^[17]。PCR 结束后分别取 2 μL 产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶紫外成像仪检测 PCR 阳性扩增产物, 并将其送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

将测序结果在 NCBI 数据库中的 BLAST 程序进行序列相似度比较, 确定细菌的分类水平, 以 98.65%的相似度界定是否为潜在新菌种^[22]。

采用 MEGA 11.0^[23] 软件中的 compute pairwise distances 计算遗传距离, 采用邻接 (neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树, bootstrap 自展 1 000 次检验系统发育树拓扑结构置信区间。

1.6 统计分析

使用 SPSS 21.0 中的单因素方差分析检验实验结果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, $P<0.05$ 时具有统计学意义^[17]。

2 结果与分析

2.1 朱鹮肠道可培养微生物的 16S rRNA 基因鉴定结果

本次研究从人工饲养朱鹮的新鲜粪便中分

离出了 1 245 株细菌, 共包含了 3 门 22 属 82 种。几种基础培养基包括 LB、BE、LB 寡营养、BHI、MRS、MRS 筛选、TSA、高氏一号、高氏一号筛选培养基中分别分离出了 84、79、36、89、33、82、119、19、20 株细菌; 在鱼肉添加培养基中, F、FS、T 培养基分别分离得到 37、22、86 株细菌; 在粪便上清添加培养基中, AG、BG、CG、AB、BB、CB 培养基分别分离得到 107、99、71、83、108、71 株细菌。

采用细菌 DNA 提取试剂盒提取上述培养基分离出的细菌基因组 DNA, 对细菌 16S rRNA 基因进行扩增得到 PCR 产物后, 1.0%琼脂糖凝胶电泳对其进行检测, 检测结果均为阳性, 且均在 1 500 bp 有单一明亮的电泳条带, 即为可测序样本^[17]。测序结果经比对分析, 结果表明, 分离出的样本属于 3 门 22 属(表 1)。将测序样本进行整理后上传至 NCBI 中的 GenBank 数据库, 登录号为 OP755752-OP756047、OR263729-OR263891、OQ775306-OQ775393、OR259065-OR259084、OR263013-OR263157、OR206106-OR206371 和 OR195815-OR196077。

表 1 朱鹮肠道可培养细菌 16S rRNA 基因多样性序列比对

Table 1 Sequence alignment of 16S rRNA gene diversity of culturable bacterial in the gut of crested ibis

类群 Group	克隆数量 Clone number	代表克隆 Representative clone	相似菌株 Similar strain	相似度 Similarity (%)
埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	555	LB2	<i>Escherichia coli</i> JCD05 (MH532531)	99.65
	17	LB9	<i>Escherichia fergusonii</i> A20 (OQ405419)	99.65
	8	LB103	<i>Escherichia marmotae</i> AKP_87 (OP027955)	89.06
	2	LB54	<i>Escherichia</i> sp. B24aem (OP004160)	99.78
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	3	LB100	<i>Aeromonas hydrophila</i> (OR263802)	99.93
	6	EB3	<i>Aeromonas salmonicida</i> I-N-3-1 (KU570320)	100.00
	5	EB78	<i>Aeromonas sobria</i> JY081016-1 (GQ232759)	99.65
	1	EB10	<i>Aeromonas dhakensis</i> WWi303 (MH396747)	100.00
	27	EB25	<i>Aeromonas veronii</i> CH-GX-GLS4-T-1-2021 (ON203106)	99.79
	2	AG124	<i>Aeromonas</i> sp. strain J16OP4 (MN519543)	99.70
柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	19	EB33	<i>Citrobacter braakii</i> CH-GX-LB3-6-2021 (ON221851)	97.24
	21	EB48	<i>Citrobacter freundii</i> 34-a blue (MN208220)	99.79

(待续)

(续表 1)

类群 Group	克隆数量 Clone number	代表克隆 Representative clone	相似菌株 Similar strain	相似度 Similarity (%)
	3	AM074	Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone LHE104 (JX093178)	99.62
	8	t241	<i>Citrobacter gillenii</i> KAR8 (KR054970)	99.21
	3	LB72	<i>Citrobacter</i> sp. HCX2 (MH368123)	99.64
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	1	AB105	<i>Enterobacter hormaechei</i> IPBCC 19426 (MN428803)	98.70
	1	LB74	<i>Enterobacter</i> sp. XSF-69 (OP566514)	99.79
哈夫尼菌属 <i>Hafnia</i>	35	AT168	<i>Hafnia alvei</i> 13-1275 (ON746755)	99.76
	8	t250	<i>Hafnia</i> sp. A1 (MN833383)	99.07
	27	AT83	Uncultured bacterium (AJ487023)	99.44
克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i>	3	LB87	<i>Klebsiella aerogenes</i> AC-R2 (OQ421704)	100.00
邻单胞菌属 <i>Plesiomonas</i>	49	LB47	<i>Plesiomonas shigelloides</i> 190719 (MT369949)	99.58
变形菌属 <i>Proteus</i>	30	LB21	<i>Proteus mirabilis</i> QHD (KJ699115)	99.86
	1	LB84	<i>Proteus</i> sp. DZ0503SBS3 (EU 382215)	99.58
	4	AB001	Uncultured bacterium clone CR_68 (JX457190)	99.40
	13	LB48	<i>Proteus vulgaris</i> P190036 (MN749541)	99.79
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	1	EB82	<i>Pseudomonas</i> sp. SG-1 (KC211303)	99.93
	6	M236	<i>Pseudomonas azotoformans</i> PgBE29 (MH144252)	98.49
	1	M244	<i>Pseudomonas libanensis</i> ICE25 (KX588596)	99.36
	4	M248	<i>Pseudomonas fluorescens</i> FC6846 (MH497588)	99.36
	1	M252R	<i>Pseudomonas reactans</i> NO8 (FJ972537)	99.79
志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	2	LB49	<i>Shigella sonnei</i> T-B7A (KJ806511)	87.62
肥杆菌属 <i>Obesumbacterium</i>	17	F78	<i>Obesumbacterium</i> sp. G3SM25 (MN928736)	99.64
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	1	AG74	<i>Bacillus altitudinis</i> KtRA5-79 (KF032700)	87.70
	34	F98	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AG30 (OR195825)	98.95
	59	EB9	<i>Bacillus atrophaeus</i> B-7 (MT434771)	98.60
	5	EB32	<i>Bacillus cereus</i> EVRAPSUBAC-1 (KY293394)	96.40
	2	B3	<i>Bacillus halotolerans</i> S-5 (CP101718)	99.93
	2	AG102	<i>Bacillus mojavensis</i> D50 (MZ165352)	94.55
	14	EB42	<i>Bacillus</i> sp. ABA34 (OP755866)	100.00
	1	LB5	<i>Bacillus stercoris</i> T342 (MW828127)	99.93
	16	t140	<i>Bacillus subtilis</i> 265ZY4 (KF831368)	99.37
	1	AG94	<i>Bacillus tequilensis</i> A-4 16S (HQ202821)	99.86
	2	LB18	<i>Bacillus thuringiensis</i> SRG2 (MK743981)	99.22
	1	AG131	<i>Bacillus tropicus</i> HBUAS52544 (OM967112)	99.50
	16	t157	<i>Bacillus siamensis</i> CB21 (OR206347)	99.93
	5	F84	<i>Bacillus licheniformis</i> BJ-55 (GQ280065)	98.70
	5	BB73	<i>Bacillus vallismortis</i> isolate qd53 (EF473133)	99.86

(待续)

(续表 1)				
类群 Group	克隆数量 Clone number	代表克隆 Representative clone	相似菌株 Similar strain	相似度 Similarity (%)
	1	BG31	<i>Bacillus toyonensis</i> ROD244 (OQ674419)	99.28
	1	AB126	<i>Bacillus aerius</i> NHSLA11 16S (MN515089)	100.00
	40	ABA2	<i>Bacillus velezensis</i> KKLW (CP054714)	99.71
	1	t110	<i>Weizmannia ginsengihumi</i> ATNJC22015 (OR243309)	99.77
	2	F107	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> SCSIO_43758 (MH283842)	99.35
赖氨酸芽孢杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	1	BG132	<i>Lysinibacillus capsici</i> R2-N-3 (OK272060)	86.90
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	1	M230	<i>Enterococcus casseliflavus</i> ZZU A83 (LC119138)	100.00
	1	M63	<i>Enterococcus durans</i> BF353 (MK491120)	99.93
	55	M1	<i>Enterococcus faecalis</i> IGM5-6 (MT197262)	99.86
	8	M2	<i>Enterococcus faecium</i> SB1350 (OR029280)	99.93
	10	M76	<i>Enterococcus gallinarum</i> GI13 (MT158590)	99.43
	17	ABA37	<i>Enterococcus hirae</i> 708 (CP055232)	100.00
	1	M12	<i>Enterococcus lactis</i> A60-1 (OM570329)	99.85
	1	M35	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> 772 (MN513232)	99.79
	1	M80	<i>Enterococcus</i> sp. CT-MH6-7 (MW893658)	91.28
	1	M239	<i>Enterococcus thailandicus</i> FJAT-18103 (MF385038)	99.22
库特氏菌属 <i>Kurthia</i>	14	AM005	<i>Kurthia gibsonii</i> RCB321 (KT260533)	99.36
乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	1	M29	<i>Lactococcus garvieae</i> SCH (KM088088)	99.64
	7	M30	<i>Lactococcus lactis</i> LL-01 (MN108017)	100.00
	2	M81	<i>Lactococcus</i> sp. CSCRZ.C (LC484729)	99.86
	3	M43	<i>Lactococcus taiwanensis</i> 1647 (MT597528)	99.79
漫游球菌属 <i>Vagococcus</i>	3	AG100	<i>Vagococcus fluvialis</i> GX21 (KU937384)	94.72
梭菌属 <i>Clostridium</i>	1	BG56	<i>Clostridium perfringens</i> 3116 (MT613499)	93.42
	1	BG76	<i>Clostridium ihumii</i> AP5 (NR_144705)	99.78
微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	1	BB158	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> HH-3 (MN933916)	99.72
类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	2	BG34	<i>Paenibacillus lautus</i> B433/17 (OL505560)	99.79
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	2	G13	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> TS9 (MT587582)	99.93
	7	G34	<i>Streptomyces</i> sp. LK-RR-32 (OQ456548)	99.86
	4	2	<i>Streptomyces violaceolatus</i> GC8-61 (KT363060)	99.93
	2	3	<i>Streptomyces cellostaticus</i> GC18 (OK513247)	99.79
	1	G27	<i>Streptomyces anulatus</i> S07-1 (KC814714)	99.79
	1	5	<i>Streptomyces fimbriatus</i> VITSK (KX364005)	99.40
	2	8	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> JJ123 (KX352809)	99.93
小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	1	26	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> FOLE 17 (KM370036)	100.00

从门水平上看, 分离出了变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinomycetota*)等 3 个门, 占分离总数的百分比分别为 71.00%、27.39%、1.60%, 变形菌门为优势菌门(图 1A)。从纲水平上看, 变形菌纲(*Proteobacteria*)作为优势菌纲, 芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、放线菌纲(*Actinomycetes*)和梭菌纲(*Clostridia*)次之, 分别占细菌总数的 71.00%、27.39%、1.61%、0.16% (图 1B)。其中变形菌纲包含 11 个属, 芽孢杆菌纲包含 8 个属, 放线菌纲包含 2 个属, 梭菌纲包含 1 个属。从属水平上看, 属于变形菌纲中的埃希氏菌属(*Escherichia*)为优势菌属, 分离出了 4 个种, 共 582 株, 占细菌分离总数的 46.75%; 其次为芽孢杆菌纲中的芽孢杆菌属(*Bacillus*), 分离出 20 个种, 占细菌分离总数的 16.79%; 肠球菌属(*Enterococcus*)、哈夫尼菌属(*Hafnia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、变形菌属(*Proteus*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、肥杆菌属(*Obesumbacterium*)、假单胞菌属

(*Pseudomonas*)等菌属也占据一定比例(图 1C)。

构建的系统发育树将变形菌门、厚壁菌门和放线菌门分为了三大支。在厚壁菌门中, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)和以 AG94、LB5、B3、EB9、EB42、BB73、t157、ABA2、t140、F98、F84、AB126、F107、t110、AG131、BG31、LB18、EB32 为代表的细菌聚为一支, 以 BB158 为代表的细菌和微小杆菌属(*Exiguobacterium*)聚为一支, 以 BG34 为代表的细菌和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)聚为一支, 以 BG132 为代表的细菌和赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)聚为一支, 以 A005 为代表的细菌与库特氏菌属(*Kurthia*)聚为一支, 以 AG100 为代表的细菌和漫游球菌属(*Vagococcus*)聚为一支, 以 M1、M80、M230、M76、M35、M239、ABA37、M63、M12、M2 为代表的细菌和肠球菌属(*Enterococcus*)聚为一支, 以 M81、M43、M30 为代表的细菌和乳球菌属(*Lactococcus*)聚为一支, 以 BG56、BG76 为代表的细菌与梭菌属(*Clostridium*)聚为一支, 以 26 为代表的细菌和

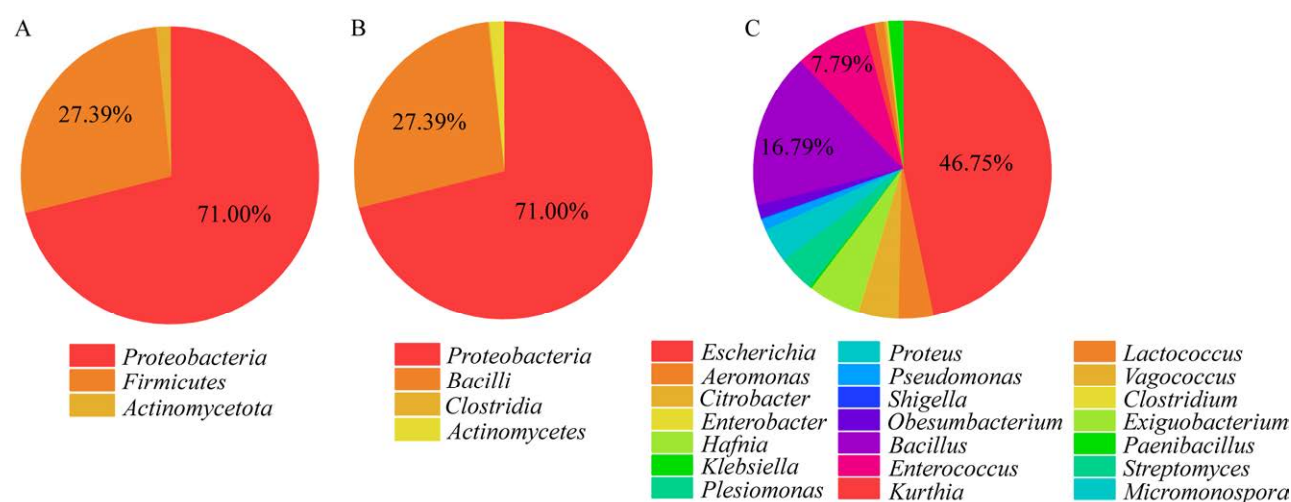


图 1 朱鹮肠道可培养细菌群落组成 A: 门水平; B: 纲水平; C: 属水平。

Figure 1 Composition of culturable bacterial communities in the Crested Ibis gut. A: Phylum level; B: Class level; C: Genus level.

小单孢菌属(*Micromonospora*)聚在一支,以 2、8、5、3、G13、G27、G34 为代表的细菌和链霉菌属(*Streptomyces*)聚在一支(图 2)。在变形菌门分支中,以 M252R、M236、M244、M248、EB82 为代表的细菌与假单胞菌属聚为一支,气单胞菌属(*Aeromonas*)与以 EB78、EB3、LB100、EB25、EB10 为代表的细菌聚为一支,变形菌属(*Proteus*)与以 LB21、LB48、LB84、AB001 为代表的细菌聚在一支,邻单胞菌属(*Plesiomonas*)与以 LB47 为代表的细菌聚为一支,埃希氏菌属(*Escherichia*)与以 LB2、LB9、LB54、LB103 为代表的细菌聚为一支;志贺氏菌属(*Shigella*)和以 LB49 为代表的细菌聚为一支,哈夫尼菌属(*Hafnia*)和以 t250、AT169、AT83 为代表的细菌聚为一支,肥杆菌属(*Obesumbacterium*)和 F78 为代表的细菌聚为一支,肠杆菌属(*Enterobacter*)和以 LB74、AB105 为代表的细菌聚为一支,克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)与以 LB87 为代表的细菌聚为一支;柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)与以 AM074、t241、EB33、EB48、LB72 为代表的细菌聚为一支(图 3)。

2.2 基础培养基分离微生物多样性比较

本研究先采用 9 种不同基础培养基对成年健康朱鹮肠道微生物进行初步分离。LB 和 BHI 培养基在分离细菌的种类和数量上显示出明显优势(图 4),同时由于这 2 种培养基的营养成分相对简单且易于分析,被选为进一步实验的基础培养基。同时,已有文献表明通过向培养基中添加粪便上清液,能有效地提高粪便中可分离的微生物数量^[24]。因此,本研究在下一阶段实验中,采用向这两类培养基中分别添加 2%、4%、6% 浓度的粪便上清液来分离朱鹮肠道微生物。朱鹮保护站的工作人员对朱鹮的饲喂主要以鲫鱼和泥鳅为主,按 1:2 的比例投放于朱鹮活动场所中供朱鹮自由觅食。为模拟朱鹮的自然食性,

本研究选用鲫鱼和泥鳅的肉汤浸液作为培养基的主要营养成分,制备出不同浓度的添加鱼肉培养基,用于分离和培养朱鹮肠道微生物。

2.3 BHI、LB 培养基添加粪便上清分离微生物多样性比较

采用 BHI 培养基时,分离出细菌 2 门 6 属 13 种,共计 89 株。在门水平上,可分为变形菌门和厚壁菌门,其中变形菌门为优势菌门(70.79%),在目水平上,可分为肠杆菌目(*Enterobacterales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)、芽孢杆菌目(*Bacillales*),在属水平上,可分为埃希氏菌属、变形菌属、柠檬酸杆菌属、肠球菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(图 5A)。

将粪便上清添加至 BHI 培养基之后,分离出细菌 2 门 4 属 13 种,共计 262 株。在门水平上仍以变形菌门和厚壁菌门为主,其中变形菌门为优势菌门,在属水平上,分离出埃希氏菌属、芽孢杆菌属、肠球菌属、微小杆菌属(图 5B),其中,微小杆菌属为新增属(图 5C)。

采用 LB 培养基时,分离出细菌 2 门 8 属 23 种,共计 84 株。在门水平上,变形菌门为优势菌门,在属水平上,分离出了埃希氏菌属、变形菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属、志贺氏菌属、柠檬杆菌属、肠杆菌属和芽孢杆菌属(图 6A)。

将粪便上清添加至 LB 培养基之后,分离得到的细菌以变形菌门为主,共分离得到细菌 227 株,在目水平上可分为肠杆菌目、芽孢杆菌目、梭菌目,属水平上分为埃希氏菌属、邻单胞菌属、赖氨酸芽孢杆菌属、芽孢杆菌属、肠球菌属、乳球菌属、漫游球菌、梭菌属、类芽孢杆菌属(图 6B)。添加粪便上清液的 LB 培养基,在目水平和属水平上,均与原培养基有着较大的差异(图 6C)。

总的来说,在 BHI 培养基中,分离得到 3 个特有的属,分别为肠杆菌属、变形菌属和柠檬

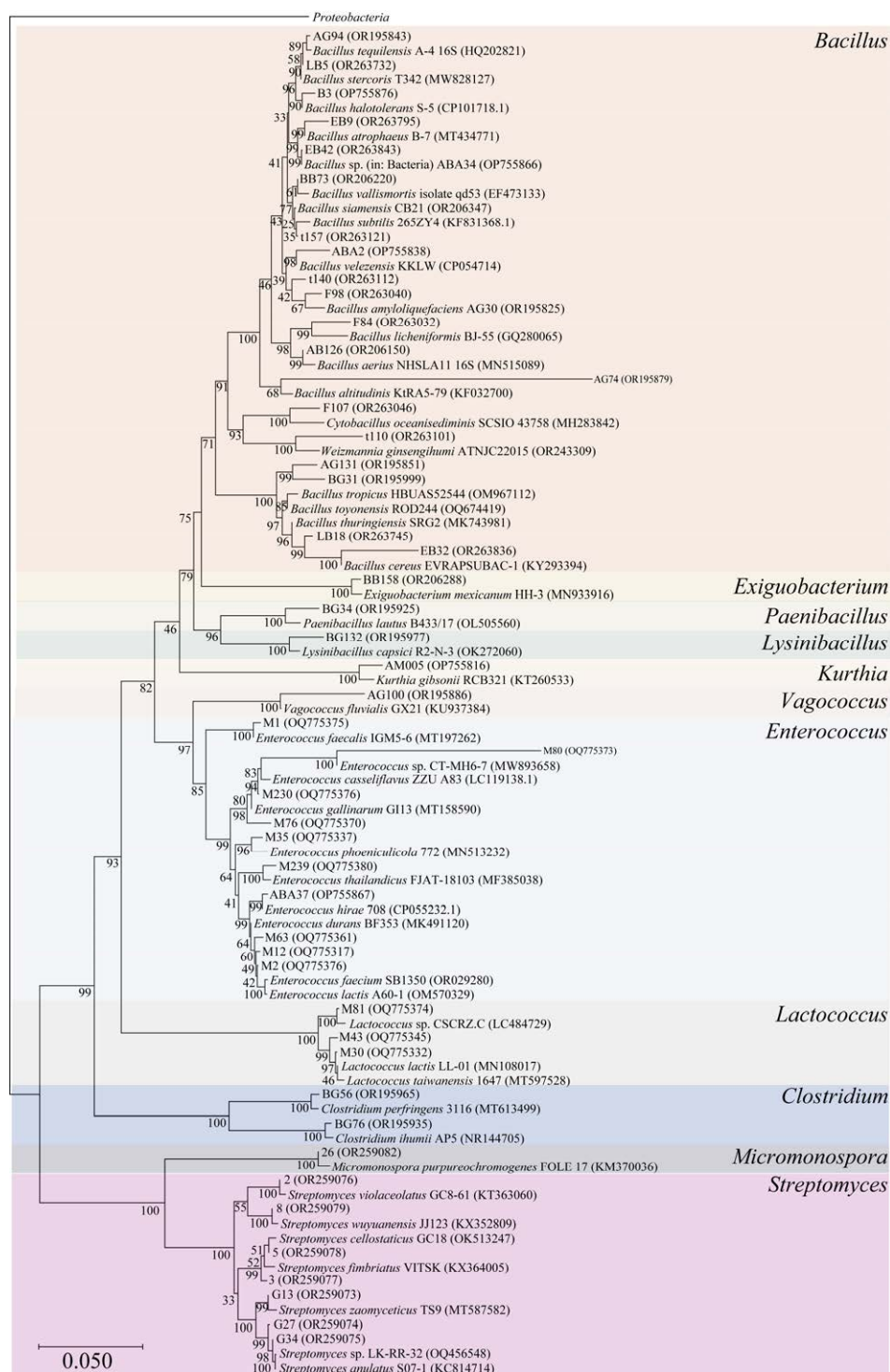


图2 基于厚壁菌门 16S rRNA 基因序列构建的朱鹮肠道可培养微生物的系统发育树 括号中的数字表示序列的 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 bootstrap 支持率; 标尺 0.050 为进化距离。

Figure 2 Phylogenetic tree of culturable microorganisms in the crested ibis gut based on 16S rRNA gene sequences of Firmicutes. The numbers in parentheses represent the GenBank entry number of the sequence; The numbers on the branch points represent the bootstrap support rate; The scale 0.05 is the evolutionary distance.

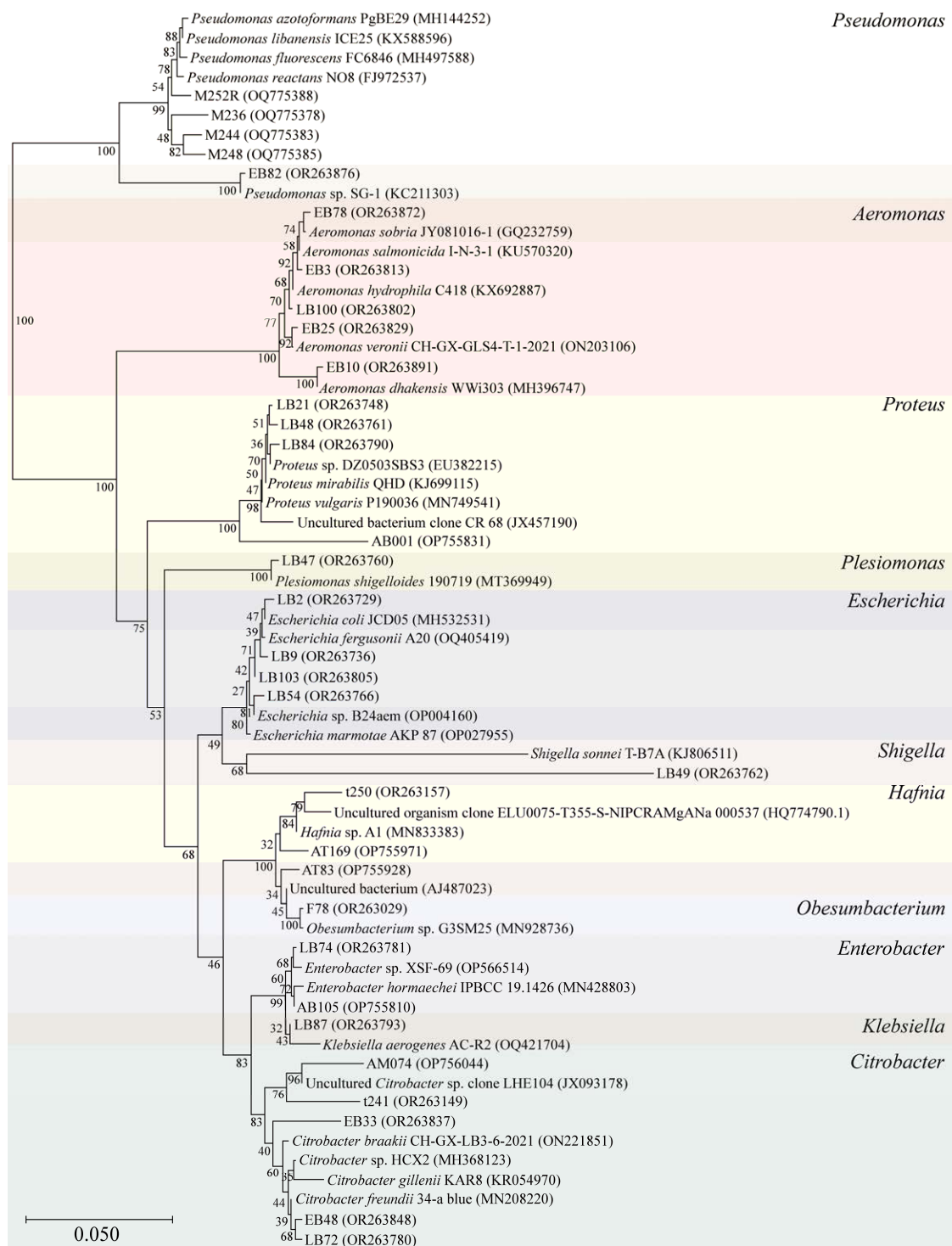


图3 基于变形菌门16S rRNA 基因序列构建的朱鹮肠道可培养微生物的系统发育树 括号中的数字表示序列的 GenBank 登录号；分支点上的数字表示 bootstrap 支持率；标尺 0.050 为进化距离。

Figure 3 Phylogenetic tree of culturable microorganisms in the crested ibis gut based on 16S rRNA gene sequences of *Proteobacteria*. The numbers in parentheses represent the GenBank accession number of the sequence; The numbers on the branch points represent the bootstrap support rate; The scale 0.05 is the evolutionary distance.

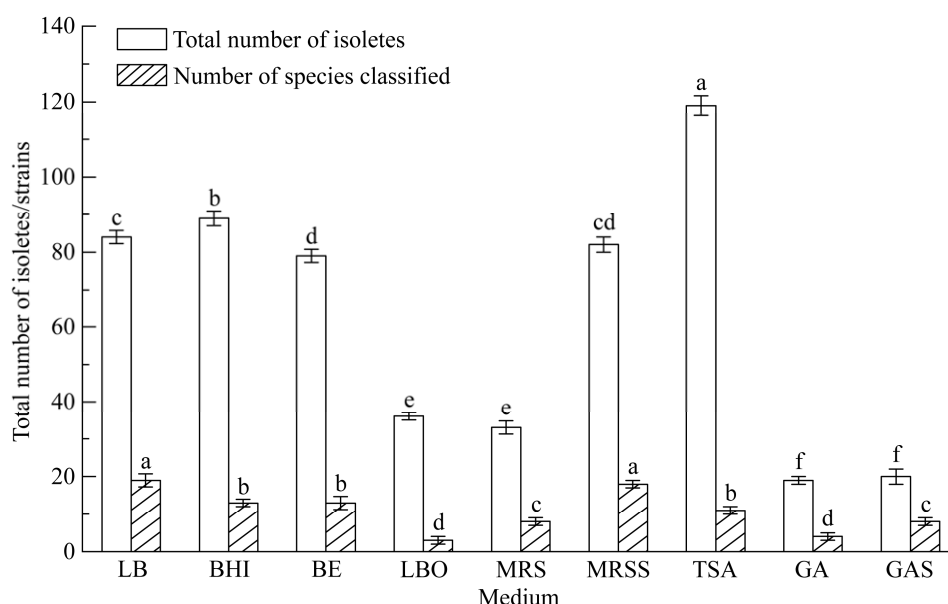


图4 基础培养基在分离细菌总数和种分类水平上的数量 LB: LB培养基; BHI: BHI培养基; BE: 牛肉膏蛋白胨培养基; LBO: LB寡营养培养基; MRSS: MRS筛选培养基; GAS: 高氏一号筛选培养基。图柱上不同的字母表示其中存在显著性差异, 相同字母则表示不存在显著性差异。

Figure 4 The number of isolated bacteria in the base medium at the total number and species classification level. LB: LB medium; BHI: BHI medium; BE: Beef extract peptone medium; LBO: LB oligotrophic medium; MRSS: MRS screening medium; GAS: Gauze's synthetic medium No.1 screening medium. Different letters on the bars indicate that there is a significant difference among them, and the same letters indicate that there is no significant difference.

酸杆菌属, 在 BHI 粪便上清添加培养基中, 分离得到 1 个特有的属为微小杆菌属; 在 LB 培养基中, 分离出 6 个特有的属, 分别为变形菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属、志贺氏菌属、柠檬酸杆菌属以及肠杆菌属, 而在 LB 粪便上清添加培养基中, 分离出 7 个特有属, 分别为邻单胞菌属、肠球菌属、乳球菌属、漫游球菌属、类芽孢杆菌属、梭菌属和赖氨酸芽孢杆菌属(表 2)。

2.4 不同类型培养基分离得到的微生物多样性比较

本研究使用的所有培养基中, 除了 MRS 筛选培养基的优势菌门为厚壁菌门外, 其他培养基的优势菌门都为变形菌门。

本研究将所有培养基按类型分为三大类培

培养基, 一是基础培养基, 二是添加鱼肉培养基, 三是添加粪便上清培养基。在门水平上, 变形菌门为优势菌门(图 7A)。在科水平上, 肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)为优势菌科, 基础培养基对肠球菌科(*Enterococcaceae*)有较好的选择性, 添加粪便上清培养基对芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)有较好的选择性, 添加鱼肉培养基对气单胞菌科(*Aeromonadaceae*)有较好的选择性(图 7B)。在种水平上, 三类培养基分离得到的细菌多样性从高到低依次为基础培养基(59 种)、添加鱼肉培养基(29 种)、添加粪便上清培养基(28 种)(图 7C)。

在这三类培养基中, 均可分离得到埃希氏菌属、芽孢杆菌属和肠球菌属细菌, 占总属的 14.29%。不同培养基体现出对某些类群细菌的

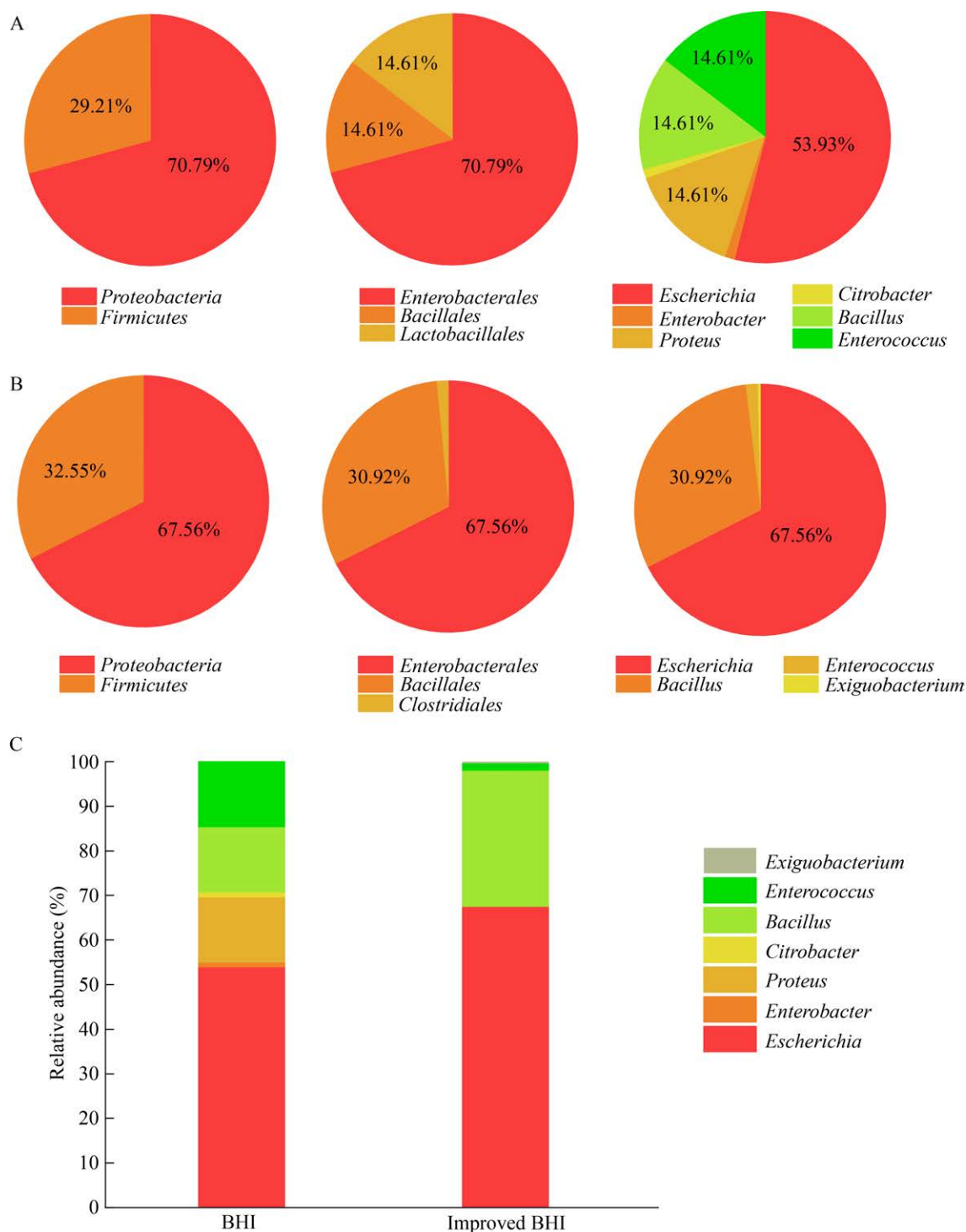


图5 BHI培养基与添加粪便上清液的BHI培养基分离可培养微生物多样性 A: BHI培养基; B: 添加粪便上清的BHI培养基; C: 两种培养基分离可培养微生物的不同。

Figure 5 Isolation of culturable microorganisms diversity from BHI medium versus BHI medium supplemented with fecal supernatant. A: BHI medium; B: BHI medium with added fecal supernatant; C: The difference in culturable microorganisms isolated from the two media.

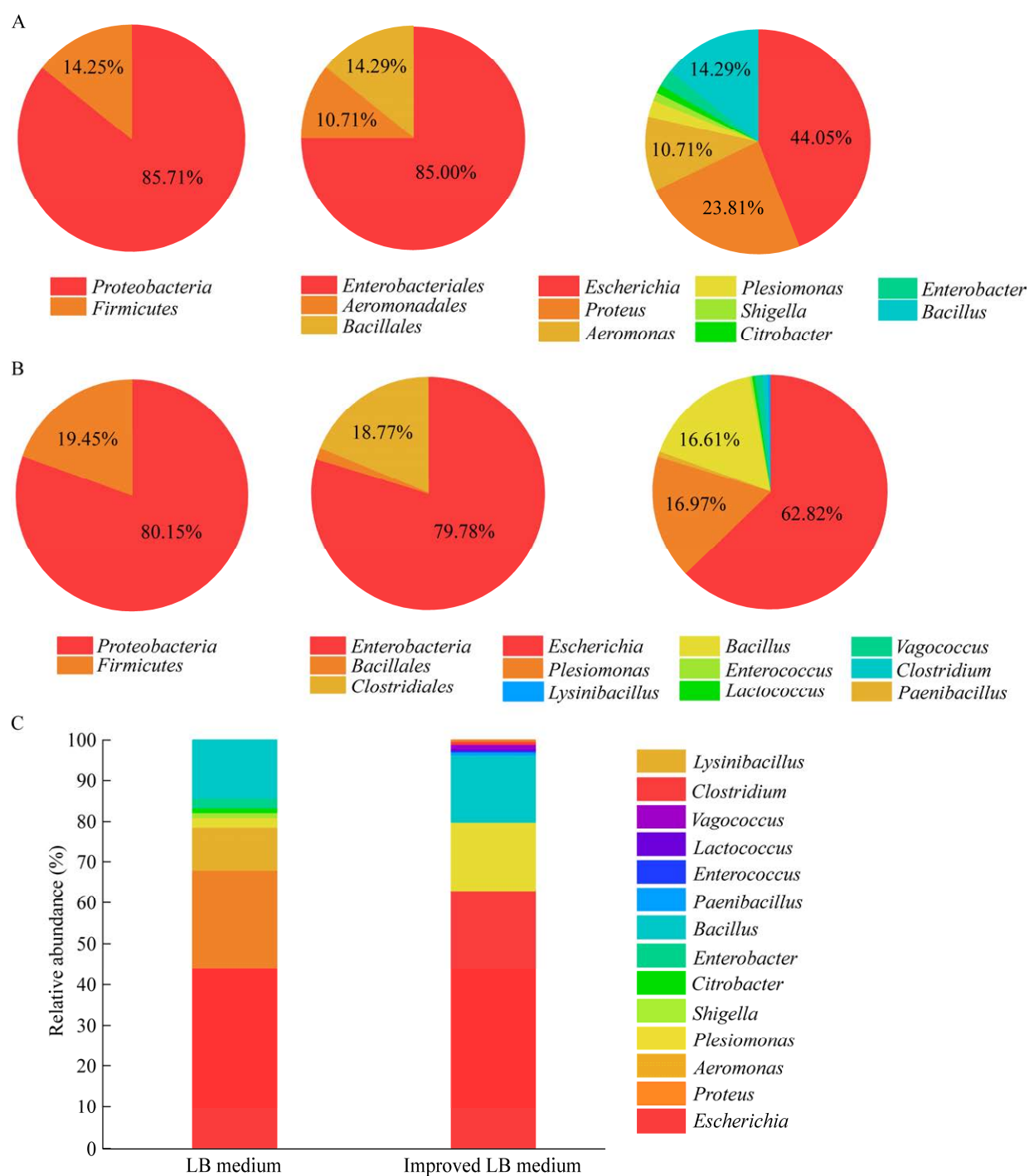


图 6 LB 培养基与添加粪便上清液的 LB 培养基分离可培养微生物多样性 A: LB 培养基; B: 添加粪便上清的 LB 培养基; C: 两种培养基分离可培养微生物的不同。

Figure 6 Isolation of culturable microorganisms diversity from LB medium versus LB medium supplemented with fecal supernatant. A: LB medium; B: LB medium with added fecal supernatant; C: The difference in culturable microorganisms isolated from the two media.

表 2 BHI、LB 与添加粪便上清后的 BHI、LB 培养基中特有的属

Table 2 Genera characteristic in BHI, LB and BHI, LB medium after addition of fecal supernatant

培养基名称 Medium name	每种培养基中独特的属 Unique genera in each type of medium
BHI 培养基 BHI medium	<i>Enterobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Citrobacter</i>
改良 BHI 培养基 Modified BHI medium	<i>Exiguobacterium</i>
LB 培养基 LB medium	<i>Proteus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Shigella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i>
改良 LB 培养基 Modified LB medium	<i>Plesiomonas</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lysinibacillus</i>

选择性,每种培养基均能分离得到其他类型培养基培养不出来的特殊菌株^[25]。其中仅能在基础培养基中分离得到的属数量最多,为 6 个,占有属的 30%,仅能在添加粪便上清培养基中分离得到的属有 5 个,占有属的 23.81%,仅能在添加鱼肉培养基中分离得到的属有 1 个,占有属的 4.76% (表 3, 图 8)。

2.5 可培养细菌中的潜在新菌

本研究中所获得的 1 245 株细菌中,有 62 株与其最相似物种的 16S rRNA 基因相似度低于 98.65%,为潜在新菌,占分离总数的 4.98%,分为 15 个潜在新种。包括肠杆菌科 40 株,芽孢杆菌科 12 株,气单胞菌科 3 株,肠球菌科 5 株,假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*) 2 株(表 4)。

从培养基水平来看,62 株潜在新菌中,有 33 株来自基础培养基,分属于 9 个潜在新种;28 株来自添加粪便上清培养基,分属于 15 个潜在新种;有 1 株来自添加鱼肉培养基,分属于 1 个潜在新种。新菌得率最高的是基础培养基(2.65%),其次是添加粪便上清培养基(2.25%),最低为添加鱼肉培养基(0.08%)。

由图 9 所示,潜在新菌的系统发育树可分为两大支,在变形菌门中,以 LB4、LB11 等细菌与埃希氏菌属聚在一支,EB33 与柠檬酸杆菌属聚在一支,AT227 和 t178 与哈夫尼菌属聚在一支,LB57 与变形菌属聚在一支,CB64、AG107 和 AG87 与邻单胞菌属聚在一支,F59 与气单

胞菌属聚在一支;在厚壁菌门中,BG81 与类芽孢杆菌属聚在一支,AG100 与漫游球菌属聚在一支,AG54 与肠球菌属聚在一支,AG86、EB59、EB32 等与芽孢杆菌属聚在一支。

2.6 朱鹮肠道微生物中的有益微生物

本研究共分离得到 96 株肠球菌属细菌,经文献查阅发现粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)^[26]、小肠肠球菌(*Enterococcus hirae*)^[27]、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)^[28]、乳酸肠球菌(*Enterococcus lactis*)^[29]、耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)^[30]等 5 种细菌具有益生作用,本次共计分离得到 82 株,占分离总数的 6.59% (表 5)。

3 讨论

肠道微生物与宿主共同维持着体内的生态平衡,研究表明,生物与其肠道微生物共同进化,微生物群落能够在环境压力下增强宿主对不利环境的适应性,包括提高存活率、表型可塑性和繁殖性能^[31]。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、免疫等具有重要影响^[32]。已有研究显示^[33],肠道微生物可以通过调节免疫细胞,增强黏膜屏障功能,使宿主对入侵的病原体产生强大的免疫反应,同时维持免疫稳态。朱鹮作为濒危物种,其食物资源的多样性可能受限,而肠道微生物多样性则可以帮助提高营养吸收效率,微生物通过发酵未消化的食物残渣生成短链脂肪

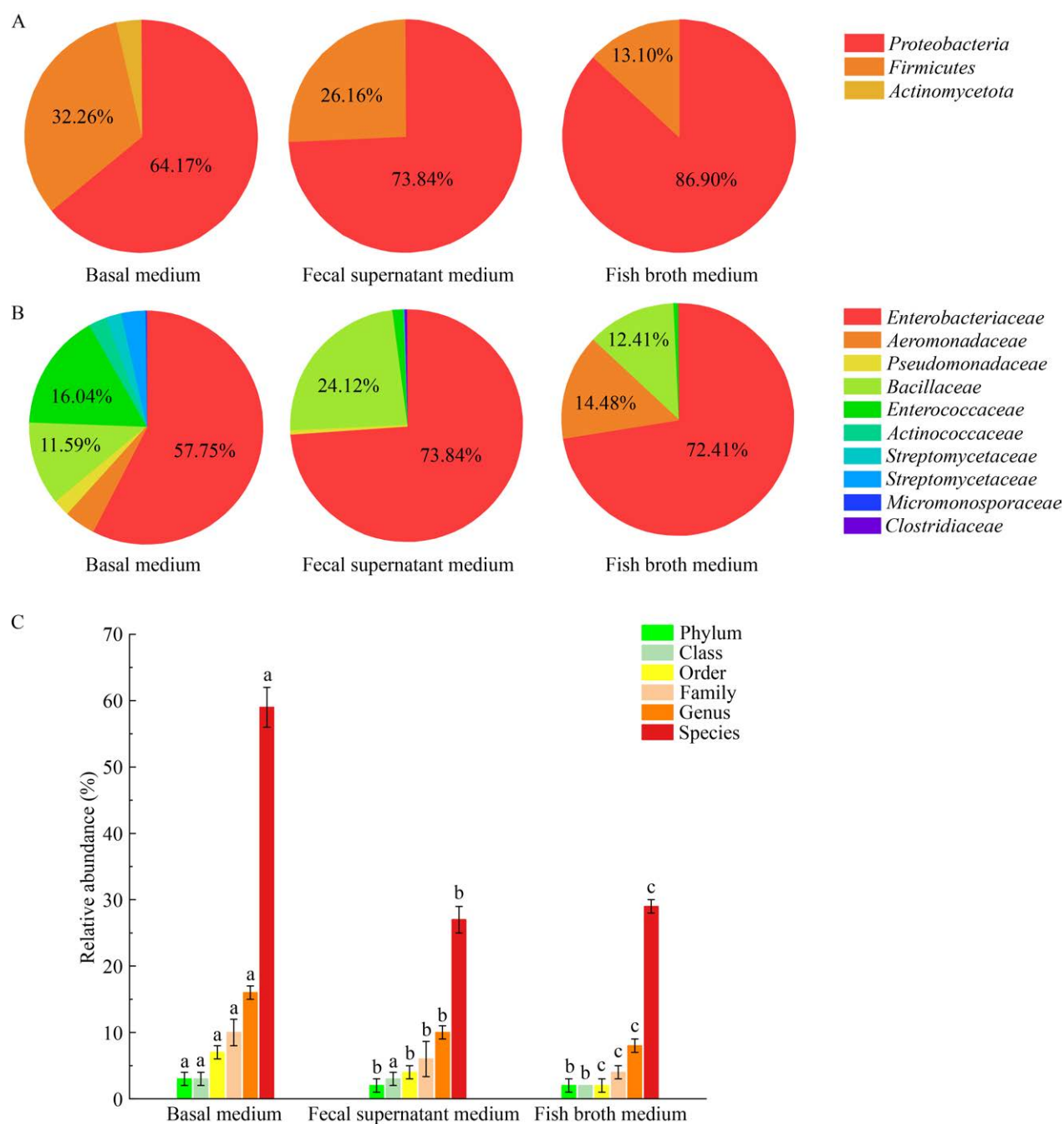


图7 不同培养基分离可培养细菌群落结构以及在不同分类水平上的多样性 A: 门水平; B: 科水平; C: 不同培养基分离可培养细菌群落结构及在不同分类水平上的多样性。图柱上不同小写字母表示其中存在显著性差异, 相同字母则表示不存在显著性差异。

Figure 7 Structure of culturable bacterial communities isolated from different media and their diversity at different taxonomic levels. A: Phylum level; B: Family level; C: The community structure and diversity of culturable bacteria isolated from different media at different classification levels. Different lowercase letters on the bars indicate that there is a significant difference among them, and the same letters indicate that there is no significant difference.

表 3 可培养细菌在不同培养基中特有的属

Table 3 Genera characteristic of culturable bacteria in different media

培养基类型	每种培养基中独特的属	Number
Medium type	Unique genera in each type of medium	
基础培养基	<i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Kurthia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i> <i>Pseudomonas</i> , 7	
Basal medium	<i>Lactococcus</i>	
添加粪便上清培养基	<i>Vagococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> 5	
Fecal supernatant medium		
添加鱼肉培养基 Fish broth medium	<i>Obesumbacterium</i>	1

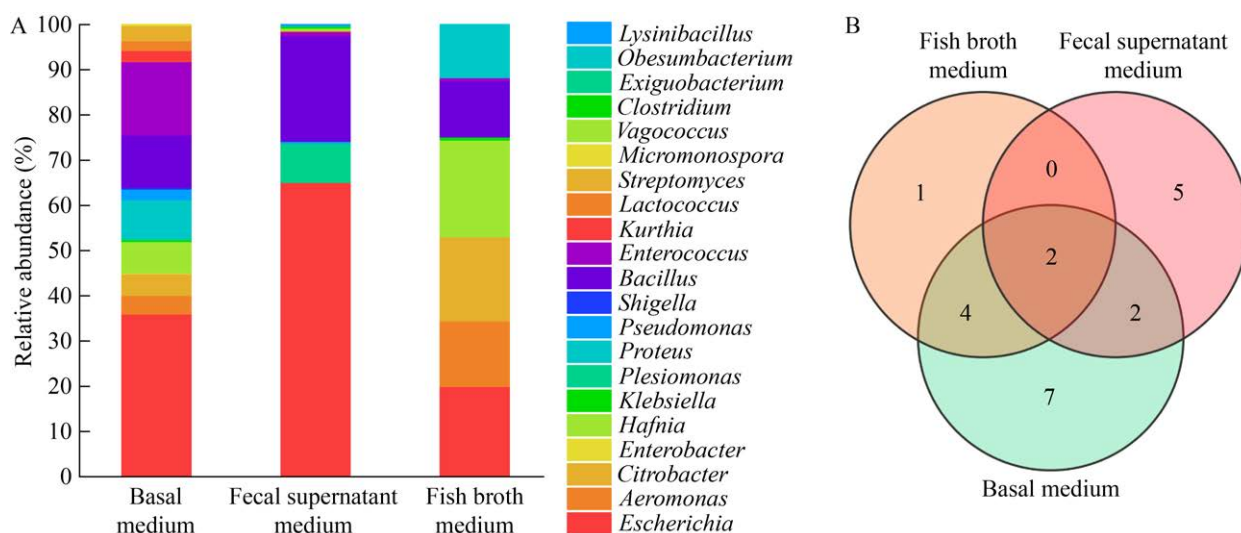


图 8 不同培养基分离可培养微生物属水平群落结构(A)和属水平数目韦恩图(B)

Figure 8 Genus-level community structure (A) and genus-level number Venn diagram (B) of culturable microorganisms isolated from different media.

表 4 潜在新菌分类表

Table 4 Potential new bacteria classification table

Name of the most similar strain	Phylum	Order	Family	Genus	Number
<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	27
<i>Citrobacter braakii</i>	Proteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	5
<i>Escherichia marmotae</i>	Proteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	4
<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	3
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Proteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	3
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Proteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	2
<i>Bacillus velezensis</i>	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2
<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2
<i>Vagococcus fluvialis</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Vagococcus</i>	2
<i>Proteus terrae</i>	Proteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Proteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Plesiomonas</i>	2
<i>Paenibacillus lautus</i>	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	<i>Lactococcus</i>	2
<i>Escherichia fergusonii</i>	Proteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	1

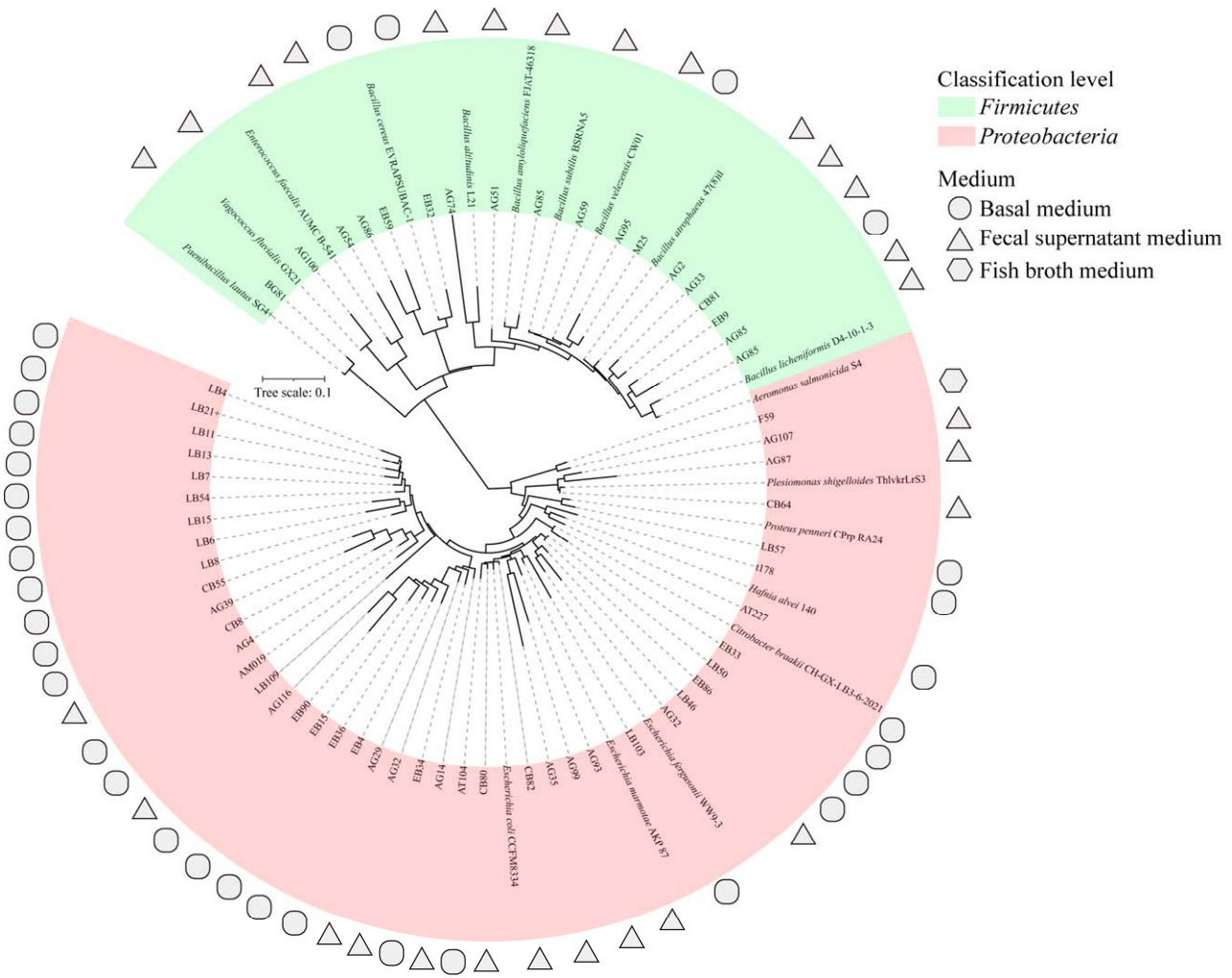


图 9 不同培养条件下潜在新菌的系统发育树
Figure 9 Phylogenetic tree of potential new bacteria under different culture conditions.

表 5 有益微生物分类表
Table 5 Beneficial microbial classification table

Strain name	Phylum	Order	Family	Genus	Number
<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	55
<i>Enterococcus hirae</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	17
<i>Enterococcus faecium</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	8
<i>Enterococcus lactis</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Firmicutes	Lactobacillales	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	1

酸等营养物质，补充宿主的营养需求^[34]。此外，肠道微生物群的多样性还可以通过竞争抑制有害微生物的生长减少病原体的定殖机会，从而预防相关疾病的发生^[35]。朱鹮的健康对于其种群的存续和生态系统的平衡具有至关重要的作用。健康的朱鹮种群能够有效控制其食物

链中的某些昆虫或水生无脊椎动物的数量,从而维持生态系统的平衡^[36]。此外,朱鹮的健康状态可以反映其栖息环境的质量。微生物群落的变化常与环境污染、栖息地退化等生态问题相关,因此,朱鹮的微生物多样性研究也可以作为生态环境监测的一部分^[37]。微生物多样性在维持朱鹮健康和种群稳定中扮演着关键角色,通过对朱鹮微生物群落的研究,不仅可以深化对其健康状况的理解,还可以为其栖息地的生态管理和保护措施的制定提供科学依据,这对维持生态系统的平衡和生物多样性的保护具有重要的生态意义。而由于一些因素的限制,大多数肠道微生物在体外的条件下仍然无法培养,但近期研究表明,使用培养组学的方法,可以帮助在体外分离得到更多的微生物种类^[38]。

本研究共采用三大类十八小类培养基对成年健康朱鹮肠道微生物进行分离鉴定,共分离出 1 245 株细菌,它们分别来自 3 个门的 22 个属中的 82 个种,可分为变形菌门(71.00%)、厚壁菌门(27.39%)和放线菌门(1.61%)。本研究初步分析了朱鹮肠道可培养微生物的菌群多样性。相对于使用单一培养基和单一培养营养物质的研究来说,本研究能够更全面地展示朱鹮肠道微生物的多样性。目前对于动物肠道微生物的研究基本可分为两类,一类是以高通量测序技术为主的免培养技术,另一类是以获得单一菌株为主的纯培养技术。对于纯培养技术,大多数研究通常仅局限于使用基础培养或通过对基础培养基进行改造来培养微生物,很少有研究使用以添加动物食物为培养基的营养成分来制作培养基。

本研究发现,不同类型培养基对朱鹮肠道微生物的分离效果各不相同。使用基础培养基分离得到 561 株细菌,鉴定为 59 个种,使用添加粪便上清培养基分离得到 539 株细菌,鉴定

为 27 个种,使用添加鱼肉培养基分离得到 145 株细菌,鉴定为 29 个种。总体而言,共鉴定出 3 个门 22 个属的细菌,其中,仅能在基础培养基中分离出的有 6 个属,仅能在添加粪便上清培养基中分离得到的有 5 个属,仅能在添加鱼肉培养基中分离得到的有 1 个属。此外,本研究还发现,添加鱼肉培养基对气单胞菌科有较好的选择性。气单胞菌科是一类常见的水生细菌,广泛存在于鱼类等水生动物的肠道中,而气单胞菌是该科的代表菌种,具有一定的致病性,尤其在鱼类中常引致感染和疾病^[39-40]。添加鱼肉培养基在选择性培养气单胞菌科方面具有一定优势,这是由于几个关键因素共同作用的结果。首先,添加鱼肉培养基提供了气单胞菌所需的营养成分。鱼肉中含有丰富的蛋白质、脂肪和其他营养物质,这些成分能有效促进气单胞菌的生长,气单胞菌在鱼类肠道中共生,因此对这些营养物质具有很强的利用能力;其次,添加鱼肉培养基可能含有鱼肉中天然存在的气单胞菌^[41],这使得该培养基在选择性上具有优势,在制备添加鱼肉培养基的过程中,如果未进行严格的灭菌处理,鱼肉中的气单胞菌可能会作为初始接种菌,进一步增强培养基对气单胞菌科的选择性。此外,鱼肉中某些特定成分可能对非气单胞菌科的细菌产生抑制作用,从而提高气单胞菌的相对生长优势。

本研究采用多种基础培养基对朱鹮肠道微生物进行分离纯化,选择了 LB、BE、BHI、MRS、TSA 这 5 种天然培养基和高氏一号合成培养基。这些培养基的营养成分相对明晰,并已经使用多年,因此在本研究中,这类培养基对朱鹮肠道微生物的分离效果相对较好,但仍存在一定的缺陷。在本研究中,这类培养基虽然在细菌总量和分离种类上占据优势,但分离得到的细菌大多数为常见的细菌,即使通过对

MRS 培养基添加溴甲酚绿来选择性筛选细菌, 也未能增加细菌的多样性。史怀平等^[15]从成年朱鹮肠道分离 4 门 11 属细菌, 其中, 厚壁菌门为优势菌门, 占分离总数的 68.18%, 其次是变形菌门占分离总数的 13.64%, 放线菌门占分离总数的 12.64%, 拟杆菌门(*Bacteroidota*)占分离总数的 4.55%。本研究采用的培养基类型及培养条件有所不同, 可能导致部分细菌未能被分离出来。

有报道显示^[42], 从隐士朱鹮肠道中分离得到 1 234 株细菌, 分为 5 门 37 属, 其中厚壁菌门为优势菌门, 占分离总数的 40%, 其次是变形菌门占 32%, 放线菌门占 19%, 拟杆菌门占 7%, 梭杆菌门(*Fusobacteriota*)占 2%。本研究从朱鹮肠道中分离得到的细菌分布为变形菌门(71.00%)、厚壁菌门(27.39%)和放线菌门(1.61%)。然而, 本研究分离到肠球菌科、气单胞菌科、假单胞菌科、链霉菌科(*Streptomycetaceae*)和小单胞菌科(*Micromonosporaceae*)的细菌, 这些在文献中未曾分离得到。此外, 有研究表明^[43], 从山齿鹑的盲肠和泄殖腔中分别分离出 69 株和 71 株细菌, 其中在盲肠中, 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。本研究共分离得到 884 株变形菌门细菌, 341 株厚壁菌门细菌和 20 株放线菌门细菌。因朱鹮仍处于濒危状态, 故取样部位受到限制, 这可能是导致分离出的细菌在门的水平上相对较少的原因之一; 同时, 样品的保存方式以及培养基的不适用也可能降低可培养细菌的多样性^[17]。

与朱鹮肠道环境相似的营养条件以及改变微生物培养基组成都有利于改善朱鹮肠道微生物的可培养性。本研究采用添加食物培养基, 并根据朱鹮的食性设计了添加鱼肉培养基, 通

过设置添加不同的鱼肉浓度来分离朱鹮肠道微生物。本研究设置了三组不同的浓度梯度培养基来对朱鹮肠道微生物进行分离, 在分离细菌的数量上呈现出先增加后减少的趋势。这种现象可能是由于自然界中数量庞大的环境微生物可利用的营养物质比较匮乏, 多数处于“寡营养”状态, 高浓度营养物质比较适合生长快且对其有抵抗能力的微生物, 但可能会抑制那些生长速度较慢的微生物^[44-45]; 当微生物处于寡营养环境时, 如果转移到富营养培养基中, 会因不适应而无法生长, 因此寡营养培养基可用于培养生长缓慢的细菌^[46]。在人工模拟的培养环境中, 3 个浓度梯度出现 3 种不同的情况: 在低浓度的营养条件下, 会生长出一些寡营养的细菌; 在中营养浓度中, 那些生长较快的细菌会大量繁殖; 而在高营养浓度的条件下, 处于中低浓度的细菌对高营养的抵抗能力不足, 导致无法生长。这 3 种不同营养浓度的培养基在分离细菌种类上也存在较大差异, 表明在对应营养浓度下, 某些对营养要求特殊的细菌才能生存^[47]。

相较于使用添加食物培养基来模拟朱鹮肠道环境, 通过在培养基中添加粪便上清液的方法可以更直接地还原朱鹮肠道内的各种营养物质和信号分子, 从而获得更多的细菌种类。由于朱鹮肠道中各个营养成分的浓度不明确, 本研究采用了 3 种浓度梯度来分离纯化朱鹮肠道微生物。有研究^[28]通过使用 0.22 μm 过滤器对粪便上清进行过滤, 提高了粪便样本中低丰富度细菌的数量。有学者^[48]通过对粪便提取物进行超声处理, 使分离出来的细菌在种类上提高了许多。本研究中采用了 0.22 μm 过滤器对粪便上清液进行过滤, 全程在有氧条件下进行, 意外分离出梭菌属细菌, 这可能是因为粪便上清中的某种物质使得这类细菌可以在有氧或者微厌氧的环境中生长, 这是在其他培养基中未

能分离得到的。

本研究共发现了 62 株潜在新菌,其中包括基础培养基分离得到的 33 株细菌,分属于 9 个潜在新种;添加粪便上清培养基分离得到的 28 株细菌,分属于 15 个潜在新种;添加鱼肉培养基分离得到的 1 株细菌,分属于 1 个潜在新种。Goodman 等^[49]通过添加粪便上清液来增加分离微生物多样性,粪便上清液中可能含有某些细菌赖以生存的营养因子,缺失这些营养因子会导致这类细菌无法生长。使用 0.22 μm 无菌滤膜过滤上清液,提高了粪便中厌氧菌的分离率。虽然在分离总数上,添加粪便上清培养基略差于基础培养基,但是在分离得到的细菌种类上,比基础培养基多出 6 种,这表明添加粪便上清液可以提高新菌的分离率。添加鱼肉培养基仅得到 1 株潜在新菌,推测可能是由于胃酸可以将蛋白质变性,随后胃蛋白酶可以将这些变形的蛋白质剪切成更小的肽,使肠道更容易吸收^[50]。本研究中的鱼肉经过高温灭菌后,导致蛋白质变性,由于鱼肉未经胃酸处理,没有变成更易吸收的小肽,从而在分离细菌和潜在新菌的数量上,都不及其他两类培养基多。

此外,本研究共分离得到 96 株肠球菌属细菌。肠球菌属也属于乳酸菌,是当前研究的热点之一。部分肠球菌菌株已被用于各类食品和药品中,也有部分与其他菌株如双歧杆菌(*Bifidobacterium*)等联合使用,制作成微生态制剂^[51]。

本研究分离得到 96 株肠球菌属细菌可分为 9 个种,其中有 5 个种的 82 株细菌被报道具有益生作用。Avram-Hananel 等^[52]从人的结肠中分离得到的耐久肠球菌(*Enterococcus durans*),发现可以作为潜在的抑炎菌株;对于粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),有研究通过体外试验,发现可以用于治疗肠胃感染等疾病^[53];将屎肠

球菌(*Enterococcus faecium*)菌株制成微生态制剂后,可以保护动物免受大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和梭菌感染^[54];小肠肠球菌对产气荚膜梭菌抑制能力最强,对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及大肠杆菌具有一定抑制能力^[55];乳酸肠球菌(*Enterococcus lactis*)可抑制致病菌艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)和单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的生长^[56]。这些益生菌不仅能调节禽类的免疫能力,还能调节肠道菌群结构^[57]。肠球菌产生的蛋白酶、淀粉酶、B 族维生素等可以有效分解肠道中的食物残渣,促进宿主更好地吸收食物中的营养^[58]。益生菌能在 T 细胞中诱导大量白细胞介素(IL-12),抑制免疫球蛋白(Ig E)的产生,有效地防止过敏反应^[59],因此益生菌越多,感染过敏性疾病的概率可能就越低^[60]。然而,这些益生菌在鸟类肠道中的具体作用机制目前仍不明确,还需要进一步研究。

4 结论

本研究从人工喂养的朱鹮新鲜粪便中,共分离得到 1 245 株细菌,共计 3 个门 22 个属 82 种,使用多种培养基对朱鹮肠道微生物进行分离,较好地显示出样品中可培养细菌的微生物多样性。研究结果表明,朱鹮肠道内的可培养细菌十分丰富,有 96 株肠球菌属的细菌,有 82 株细菌具有益生作用,占分离总数的 6.59%;有 62 株为潜在新菌,占分离总数的 4.98%。本研究为后期朱鹮肠道微生物资源挖掘奠定了良好的基础,也为后期开发应用积累了丰富且稀有的菌种资源。

致谢

感谢陕西汉中朱鹮国家级自然保护区管理

局段文斌、牛克胜为本研究的样品采集工作提供的支持与帮助。

REFERENCES

- [1] KIM HB, BOREWICZ K, WHITE BA, SINGER RS, SREEVATSAN S, TU ZJ, ISAACSON RE. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(38): 15485-15490.
- [2] MAYNARD CL, ELSON CO, HATTON RD, WEAVER CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system[J]. Nature, 2012, 489(7415): 231-241.
- [3] SOMMER F, BÄCKHED F. The gut microbiota: Masters of host development and physiology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(4): 227-238.
- [4] TREMAROLI V, BÄCKHED F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J]. Nature, 2012, 489(7415): 242-249.
- [5] FUENTES S, ROSSEN NG, van der SPEK MJ, HARTMAN JH, HUUSKONEN L, KORPELA K, SALOJÄRVI J, AALVINK S, de VOS WM, D'HAENS GR, ZOETENDAL EG, PONSIOEN CY. Microbial shifts and signatures of long-term remission in ulcerative colitis after faecal microbiota transplantation[J]. The ISME Journal, 2017, 11(8): 1877-1889.
- [6] KELLY CR, IHUNNAH C, FISCHER M, KHORUTS A, SURAWICZ C, AFZALI A, ARONIADIS O, BARTO A, BORODY T, GIOVANELLI A, GORDON S, GLUCK M, HOHMANN EL, KAO DN, KAO JY, McQUILLEN DP, MELLOW M, RANK KM, RAO K, RAY A, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients[J]. The American Journal of Gastroenterology, 2014, 109(7): 1065-1071.
- [7] LIU SX, LI YH, DAI WK, LI XS, QIU CZ, RUAN ML, ZOU B, DONG C, LIU YH, HE JY, HUANG ZH, SHU SN. Fecal microbiota transplantation induces remission of infantile allergic colitis through gut microbiota re-establishment[J]. World Journal of Gastroenterology, 2017, 23(48): 8570-8581.
- [8] LEE P, YACYSHYN BR, YACYSHYN MB. Gut microbiota and obesity: an opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT)[J]. Diabetes, Obesity & Metabolism, 2019, 21(3): 479-490.
- [9] THOMAS CM, VERSALOVIC J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine[J]. Gut Microbes, 2010, 1(3): 148-163.
- [10] ZHU Y, LI YD, YANG HQ, HE K, TANG KY. Establishment of gut microbiome during early life and its relationship with growth in endangered crested Ibis (*Nipponia nippon*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 723682.
- [11] SOLDEN L, LLOYD K, WRIGHTON K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 31: 217-226.
- [12] XIAO Y, WANG JY, SUN PD, DING T, LI JY, DENG Y. Formation and resuscitation of viable but non-culturable (VBNC) yeast in the food industry: a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2025, 426: 110901.
- [13] CAVICCHIOLI R, OSTROWSKI M, FEGATELLA F, GOODCHILD A, GUIXA-BOIXEREU N. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*)[J]. Microbial Ecology, 2003, 45(3): 203-217.
- [14] VARTOUKIAN SR. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria[J]. Journal of Oral Biosciences, 2016, 58(4): 143-149.
- [15] 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).
- [16] Hafeez ul Haq, 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 H, 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).
- [17] 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 HJ, LAN AF, GUO SF, DUAN WB, WANG Q, NIU KS. Intestinal microbial diversity and enzyme activities of crested Ibis[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4125-4140 (in Chinese).
- [18] 薛正楷, 郑文武, 张宿义. 一株整合型高抗性高效发酵己酸菌的选育研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 143-150.
XUE ZK, ZHENG WW, ZHANG SY. Breeding of an integrated strain with high resistance and highly efficient fermentation for caproic acid production[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 143-150 (in Chinese).
- [19] 万文结, 刘月, 薛芷筠, 张泽文, 程国军, 李晓华, 何冬兰. 纤维素降解菌 *Arthrobacter oryzae* HW-17 的纤维素降解特性及纤维素酶学性质[J]. 环境科学学报, 2017, 37(10): 3679-3686.
WAN WJ, LIU Y, XUE ZJ, ZHANG ZW, CHENG GJ, LI XH, HE DL. Cellulose degradation characteristics and cellulase properties of cellulose-decomposing bacterium *Arthrobacter oryzae* HW-17[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(10): 3679-3686 (in Chinese).
- [20] 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).
- [21] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for

- phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [22] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [23] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [24] LAGIER JC, HUGON P, KHELAIFIA S, FOURNIER PE, SCOLA BL, RAOULT D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(1): 237-264.
- [25] 孙创, 王金燕, 张钰琳, 张蕴慧, 朱晓雨, 陈朝晖, 张晓华. 利用改良培养基探究西太平洋海水可培养细菌多样性[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 845-861. SUN C, WANG JY, ZHANG YL, ZHANG YH, ZHU XY, CHEN ZH, ZHANG XH. Exploring the diversity of cultivated bacteria in the Western Pacific waters through improved culture media[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(4): 845-861 (in Chinese).
- [26] 宋乐辉. 鸡源性粪肠球菌的分离及益生特性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2023. SONG LH. Isolation of *Enterococcus faecalis* from Chickens Caecum and Studies on its Probiotic Properties[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [27] HAMID NH, DAUD HM, KAYANSAMRUAI P, HASSIM HA, MOHD YMS, ABU BSN, SRISAPOOME P. Short- and long-term probiotic effects of *Enterococcus hirae* isolated from fermented vegetable wastes on the growth, immune responses, and disease resistance of hybrid catfish (*Clarias gariepinus* × *Clarias macrocephalus*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2021, 114: 1-19.
- [28] 田相利, 刘云慧, 刘怡君, 汪仕爽, 罗凯, 刘杨, 秦光彩, 范瑞用. 添加不同形式屎肠球菌对凡纳对虾生长性能、非特异免疫及抗病力影响的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(10): 179-189. TIAN XL, LIU YH, LIU YJ, WANG SS, LUO K, LIU Y, QIN GC, FAN RY. Effects of *Enterococcus faecium* in different forms on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of *Penaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2024, 54(10): 179-189.
- [29] 高雅茹. 乳肠球菌ID4细菌素的作用机制及其对口腔菌群影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2024. GAO YR. Study on mechanism of *Enterococcus lactis* ID4 bacteriocin and its effect on the oral flora[D]. Wuxin: Jiangnan University, 2024.
- [30] SIMONE P, TIANE MM, ANA PVC, ROBSON A, ANA PGF, FLAVIO AOC, ADRIANO B. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect[J]. Food Control, 2015, 51: 49-54.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] KOGUT MH, LEE A, SANTIN E. Microbiome and pathogen interaction with the immune system[J]. Poultry Science, 2020, 99(4): 1906-1913.
- [34] LYNCH SV, PEDERSEN O. The human intestinal microbiome in health and disease[J]. The New England Journal of Medicine, 2016, 375(24): 2369-2379.
- [35] RIPPLE WJ, BESCHTA RL, FORTIN JK, ROBBINS CT. Trophic cascades from wolves to grizzly bears in Yellowstone[J]. Journal of Animal Ecology, 2014, 83(1): 223-233.
- [36] VACHER C, HAMPE A, PORTÉ AJ, SAUER U, COMPANT S, MORRIS CE. The phyllosphere: microbial jungle at the plant-climate interface[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2016, 47: 1-24.
- [37] 孟凡凡, 胡益, 王建军. 微生物性状揭示物种分布格局、群落构建机制和生态系统功能[J]. 微生物学报, 2020, 60(9): 1784-1800. MENG FF, HU A, WANG JJ. Microbial traits shed light on species distributions, assembly processes and ecosystem functions[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(9): 1784-1800 (in Chinese).
- [38] LAGIER JC, KHELAIFIA S, ALOU MT, NDONGO S, DIONE N, HUGON P, CAPUTO A, CADORET F, TRAORE SI, SECK EH, DUBOURG G, DURAND G, MOUREMBOU G, GUILHOT E, TOGO A, BELLALI S, BACHAR D, CASSIR N, BITTAR F, DELERCE J, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics[J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16203.
- [39] MICHAEL JANDA J, ABBOTT SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73.
- [40] AUSTIN B, AUSTIN DA. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish[M]. Sixth edition. Switzerland: Springer, 2016: 1-552.
- [41] 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.
- [42] CAHILL MM. Bacterial flora of fishes: a review[J]. Microbial Ecology, 1990, 19(1): 21-41.
- [43] SPERGSEER 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.
- [44] 张晓华. 海洋微生物学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007: 332-333. ZHANG XH. Marine Microbiology[M]. Qingdao, China: China Ocean University Press, 2007: 332-333 (in Chinese).
- [45] 张秀明, 张晓华. 海洋微生物培养新技术的研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 33(6): 99-104. ZHANG XM, ZHANG XH. New culture approaches of marine microorganisms[J]. Marine Sciences, 2009, 33(6): 99-104 (in Chinese).

- [46] ZHANG XH, AHMAD W, ZHU XY, CHEN JX, AUSTIN B. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms[J]. *Marine Life Science & Technology*, 2020, 3(2): 189-203.
- [47] 黄自然, 韩妮, 常宇骁, 李惠敏, 丁磊, 谭亚芳, 毕玉晶, 杨瑞馥, 吴家红. 人体肠道细菌寡营养培养组条件的优化研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3641-3652.
- HUANG ZR, HAN N, CHANG YX, LI HM, DING L, TAN YF, BI YJ, YANG RF, WU JH. Optimization of oligotrophic culture conditions for human gut bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3641-3652 (in Chinese).
- [48] LAGIER JC, ARMOUGOM F, MILLION M, HUGON P, PAGNIER I, ROBERT C, BITTAR F, FOURNOUS G, GIMENEZ G, MARANINCHI M, TRAPE JF, KOONIN EV, SCOLA BL, RAOULT D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(12): 1185-1193.
- [49] GOODMAN AL, KALLSTROM G, FAITH JJ, REYES A, MOORE A, DANTAS G, GORDON JI. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 6252-6257.
- [50] 申俊华, 赵小刚, 郭吉余, 苏勇. 胃酸分泌的化学感应及其对氮营养素应答的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(12): 36-40.
- SHEN JH, ZHAO XG, GUO JY, SU Y. Advances in chemosensing of gastric acid secretion and its response to nitrogen nutrient[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2022, 58(12): 36-40 (in Chinese).
- [51] 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).
- [52] AVRAM-HANANEL L, STOCK J, PARLESAC A, BODE C, SCHWARTZ B. *E. durans* strain M4-5 isolated from human colonic flora attenuates intestinal inflammation[J]. *Diseases of the Colon and Rectum*, 2010, 53(12): 1676-1686.
- [53] RAN HN, SUN MH, JUNG EL, HEE LY. Effect of *Enterococcus faecalis* strain PL9003 on adherence and growth of *Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 12(5): 746-752.
- [54] BOGUT I, MILAKOVIĆ Z, KRISTEK S, NOVOSELIĆ D, BUKVIĆ Ž. Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*)[J]. *Veterinarni Medicina*, 2000, 45(4): 107-109.
- [55] 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(22): 63-68, 150.
- HE X, XU SQ, MA XZ, CHEN XH, HE XL, YE GS. Isolation, identification, and probiotic characteristics of *Enterococcus hirae* from Tibetan sheep intestines[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021(22): 63-68, 150 (in Chinese).
- [56] FU XM, LYU L, WANG Y, ZHANG Y, GUO XK, CHEN Q, LIU C. Safety assessment and probiotic characteristics of *Enterococcus lactis* JDM1[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 163: 105380.
- [57] 李虎. 肠道益生菌在家禽生产中的应用进展[J]. *中国畜牧业*, 2023(21): 39-40.
- LI H. Progress in application of intestinal probiotics in poultry production[J]. *China Animal Industry*, 2023(21): 39-40 (in Chinese).
- [58] 张曼, 潘广林, 梁武龙, 王华, 李然, 张瑞, 柴佳, 叶超, 张耀相. 秦岭大熊猫肠道益生菌的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(1): 125-129.
- ZHANG M, PAN GL, LIANG WL, WANG H, LI R, ZHANG R, CHAI J, YE C, ZHANG YX. Isolation and identification of probiotics from giant pandas in Qinling Mountains[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(1): 125-129 (in Chinese).
- [59] 魏明颖, 王玉涵, 杨倩, 贾丽娜. 肠道益生菌功能特性研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(4): 14-16.
- WEI MY, WANG YH, YANG Q, JIA LN. Research progress of functional properties of intestinal probiotics[J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(4): 14-16 (in Chinese).
- [60] 曲巍, 张智, 马建章, 刘慧, 雅男. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(1): 214-219.
- QU W, ZHANG Z, MA JZ, LIU H, YA N. Effect of probiotics on gut microbiota in mice evaluated by high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2017, 38(1): 214-219 (in Chinese).