

# 幼龄朱鹮肠道微生物多样性与 产胞外酶活力分析

王琦<sup>①②</sup> 兰阿峰<sup>①②\*</sup> 王华健<sup>①</sup> 郭素芬<sup>①</sup> 段文斌<sup>③</sup> 牛克胜<sup>③</sup>

① 陕西理工大学生物科学与工程学院 汉中 723001; ② 陕西理工大学秦巴生物资源与生态环境部共建国家重点实验室(培育) 汉中 723001; ③ 陕西汉中朱鹮国家级自然保护区管理局 洋县 723300

**摘要:** 朱鹮 (*Nipponia nippon*) 是国家一级重点保护野生动物, 属于世界上最濒危的鸟类之一, 本研究通过对幼龄朱鹮肠道微生物的多样性及产酶活力进行研究, 以期分离得到对朱鹮有益的微生物。本研究采用纯培养的方法获得幼龄朱鹮肠道微生物, 通过革兰氏染色以及生理生化鉴定, 结合 16S rRNA 基因扩增和序列分析进行鉴定。使用水解圈降解法筛选产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶的菌株, 最终获得 254 株幼龄朱鹮肠道细菌, 隶属于 2 门 9 属。其中变形菌门 (Proteobacteria) 211 株, 占分离菌株总数的 83.07%, 优势菌属为埃希氏菌属 (*Escherichia*) 179 株 (70.47%)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacte*) 18 株 (7.09%) 以及肠杆菌属 (*Enterobacter*) 14 株 (5.51%); 厚壁菌门 (Firmicutes) 43 株, 占分离总数的 16.93%, 优势菌属为肠球菌属 (*Enterococcus*) 27 株 (10.63%)。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 244 株产蛋白酶, 19 株产淀粉酶, 10 株产脂肪酶, 4 株产纤维素酶, 分别占分离菌株总数的 83.07%、7.48%、3.94%和 1.57%。开展肠道微生物研究可为朱鹮饲养提供理论指导, 挽救每年夏秋季节因肠道疾病死亡的朱鹮。因此, 本研究期望能分离筛选出对朱鹮肠道有益的微生物菌株, 对朱鹮肠道疾病、生长发育及种群恢复提供帮助。

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

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2024) 05-714-15

## Intestinal Microbial Diversity and Enzyme Activities of Crested Ibis Nestlings

WANG Qi<sup>①②</sup> LAN A-Feng<sup>①②\*</sup> WANG Hua-Jian<sup>①</sup> GUO Su-Fen<sup>①</sup>  
DUAN Wen-Bin<sup>③</sup> NIU Ke-Sheng<sup>③</sup>

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

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

③ Shaanxi Hanzhong Crested Ibis National Nature Reserve, Yangxian 723300, China

**基金项目** 陕西省科技厅项目 (No. 2015SZS-15-09);

\* 通讯作者, E-mail: lanafeng2004@126.com;

**第一作者介绍** 王琦, 男, 副教授; 研究方向: 动物保护; E-mail: wangqis6@163.com.

收稿日期: 2023-03-20, 修回日期: 2024-05-21 DOI: 10.13859/j.cjz.202423049

**Abstract: [Objectives]** Crested Ibis *Nipponia nippon* is protected at the national level in China and is also one of the most critically endangered bird species globally. Unfortunately, the population of wild Crested Ibises has experienced a drastic decline due to environmental degradation. Research indicates that the gut microorganisms of Crested Ibises play vital roles in nutrient absorption, immune regulation and healthy growth. The objective of this study was to culturally analyze the intestinal microbiota of Crested Ibis nestlings for beneficial microorganisms. In this study, the gut microbial diversity and extracellular enzyme activity of Crested Ibises were examined to further understand their healthy development. **[Methods]** The intestinal microorganisms in Crested Ibis nestlings were obtained through pure culture methodology. The identification of the bacteria involved a combination of Gram staining, physiological and biochemical analysis, and 16S rRNA gene amplification and sequence analysis. A phylogenetic tree was subsequently constructed using 16S rRNA gene sequences of intestinal bacteria derived from Crested Ibis nestlings, including representative isolates and related species. Strains that produced amylase, protease, cellulase, or lipase were screened through hydrolytic cycle degradation. **[Results]** A total of 254 strains of bacteria were isolated from the fresh excreta of artificially-reared Crested Ibis nestlings, comprising 2 phyla and 9 genera (Table 2). Thirty-three gram-positive strains and 221 strains of gram-negative bacteria were identified (Fig. 1). Among these strains, 211 were identified as Proteobacteria, accounting for 83.07% of the total isolates. Among them, 179 were *Escherichia* sp., representing 70.47% of the total number of isolates, additionally, 18 strains of *Citrobacter* sp. (7.09%), 14 strains of *Enterobacter* sp. (5.51%), and 14 strains of *Klebsiella* sp. (5.51%) were also isolated. Of the total number of isolates, 7.09% were identified as follows: fourteen strains of *Enterobacter* sp. (5.51%), 4 strains of *Klebsiella* sp. (1.57%), 4 strains of *Shigella* sp. (1.57%), two strains of *Aeromonas* sp. (0.79%), and another 2 strains of *Aeromonas* sp. (0.79%). Forty-three strains, accounting for 16.93% of all the isolates, belonged to Firmicutes, in which 27 strains (10.63%) belonged to *Enterococcus* sp., 4 strains belonged to *Lysinibacillus* sp. (1.57%), and *Bacillus* sp. had 4 strains (1.57%). Physiological and biochemical identification revealed that the traits of each strain were in accordance with their respective 16S rRNA genes (Table 1). The differences between enzyme-producing strains were evaluated (Fig. 4), and the types and efficacy of extracellular enzyme production in these cultivable bacteria were analyzed (Fig. 5). The results revealed that 244 strains produced protease, 19 strains produced lipase, 10 strains produced amylase, and 4 strains produced cellulose (Fig. 3). **[Conclusion]** The Crested Ibis conservation station aims to research intestinal microorganisms to prevent deaths resulting from intestinal diseases during the summer and fall seasons each year. We found that the bacteria isolated from the intestines of Crested Ibis nestlings were classified into nine genera belonging to two phyla. *Escherichia*, a member of the phylum Proteobacteria, was the most abundant genus, accounting for 70.47% of the isolates, and 86.22% of the strains produced proteases. The findings can offer technical insights into the breeding of Crested Ibises.

**Key words:** Crested Ibis nestling; Gut microbes; Pure culture; 16S rRNA gene; Produce extracellular enzymes

朱鹮 (*Nipponia nippon*) 隶属于鹮形目 (Pelecaniformes) 鹮科 (Threskiornithidae), 为国家一级重点保护野生动物, 在世界自然保

护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 的名录中保护等级为濒危级 (BirdLife International 2018)。在 20 世纪中期,

由于全球气候变化、朱鹮栖息地丧失、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(丁长青 2004)。据统计,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(Li et al. 2022)。但朱鹮的分布区域仍比较集中,种群还具有脆弱性(闫鲁等 2021)。

目前,肠道微生物逐渐成为了当下的研究热点。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(Waite et al. 2015, Grond et al. 2018)。因此,肠道微生物对宿主生存、繁殖和适应性都会产生影响(Kakumanu et al. 2016, Blumstein et al. 2017)。

当前对肠道微生物的研究主要以 Illumina Mi Seq 高通量测序技术为主,但高通量测序技术仅仅是对菌株的单一片段进行测序,获得菌株的分类地位,无法获得单一菌株,也就无法进行后续研究。对于发现新菌或者更加深入的研究,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幼龄朱鹮肠道微生物,通过优化培养基配方和培养条件等因素,分离出更多未培养的菌株,结合分离出菌株的产胞外酶能力大小,从健康幼龄朱鹮的肠道中分离得到对朱鹮消化、免疫、肠道菌群稳定等有益的微生物。

本研究的目的是为了获得幼龄朱鹮肠道可培养微生物,解析幼龄朱鹮肠道可培养微生物的组成结构,结合 16S rRNA 基因序列和前人的研究结果,对这些微生物进行产酶活力测试,预测潜在的肠道有益菌。

## 1 材料与方法

本研究于 2022 年 4 月 23 日在陕西省汉中市洋县朱鹮保护站采集幼龄朱鹮新鲜粪便样本,采集对象为 4 只人工养殖的 9 日龄朱鹮幼鸟,每只幼鸟大约取 5.0 g 粪便,取样方法见参考文献(史怀平等 2008)。取样后迅速放置于

4 °C 冰箱备用,2 h 内处理完粪便样本,在实验中准确称取 0.5 g 混匀样本用于实验,其余样本于 4 °C 保存。

### 1.1 培养基及配置

**BHI 培养基:**称取胰蛋白胨 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 18.0 g,超纯水定容至 1 000 ml, pH 为 7.4。

**MRS 培养基:**称取蛋白胨 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 为 6.5。

**TSA 培养基:**称取胰蛋白胨 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 为 7.3。

**高氏一号培养基:**称取硝酸钾 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 15.0 g,超纯水定容至 1 000 ml, pH 为 7.3。

**产淀粉酶培养基:**称取蛋白胨 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 15.0 g,超纯水定容至 1 000 ml, pH 为 7.2。

**产纤维素酶培养基(何志伟等 2021):**称取蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 3.0 g、氯化钠 5.0 g、羧甲基纤维素钠 10.0 g、刚果红 0.04 g、琼脂 15.0 g,超纯水定容至 1 000 ml, pH 为 7.0。

**产蛋白酶培养基(黄振东等 2019):**称取酪蛋白 20.0 g、琼脂 18.0 g,超纯水定容至 1 000 ml, pH 为 7.4。

**产脂肪酶培养基(张小龙等 2020):**称取蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 3.0 g、氯化钠 5.0 g、溴甲酚紫 0.04 g、PVA-橄榄油乳化剂 120 ml、琼脂 15.0 g,超纯水定容至 1 000 ml, pH 为 8.0。

上述培养基用 1 mol/L NaOH 调节到相应的 pH,煮沸后分装,高压灭菌后,冷却至 60 °C 左右,在超净工作台中分装至直径 9 mm 的无菌培养皿中备用。

## 1.2 纯培养法对朱鹮肠道微生物分离及分子鉴定

### 1.2.1 朱鹮肠道微生物的分离及形态学鉴定

提前准备好装有 250 ml BHI、MRS、TSA 和高氏一号的液体培养基, 在无菌条件下, 将朱鹮粪便样本混匀后, 在每瓶液体培养基中均加入 0.5 g 混匀样本, 放于 37 °C 培养 24 h 后, 从每瓶液体培养基中取 1 ml 菌液于 9 ml 无菌生理盐水中 10 倍梯度稀释。经预实验后, 确定在  $10^{-6}$  浓度下, 最适合细菌分离纯化。吸取  $10^{-6}$  浓度菌液分别涂布于 BHI、MRS、TSA 和高氏一号固体培养基上, 每种培养基 3 个重复, 37 °C 培养 12 ~ 16 h。随机挑取各个平板上不同形态特征的单菌落, 并在相应的培养基进行划线纯化, 使用甘油悬液冷冻法保藏菌种。通过革兰氏染色(王贺祥 2003)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 朱鹮肠道微生物的鉴定** 使用细菌 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取分离得到的细菌 DNA, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物(27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TCG CTC AG-3', 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')(Weisburg et al. 1991)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:  $2 \times Taq$  PCR Master Mix (含染料) 25  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ l, 模板 DNA 2  $\mu$ l (10 mg/L), 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 2  $\mu$ l, 总体积 50  $\mu$ l。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环 36 次; 72 °C 10 min。分别取 2  $\mu$ 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(Uvitec)检测, 将 PCR 阳性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, 以相似度小于 97% 的确定为潜在新菌种(Drancourt et al. 2004), 选择每个种序列最长的菌株作为代表菌株(侯建平 2021)。

采用 Mega 11.0 (Tamura et al. 2004) 软件

中的 Compute pairwise distance 计算遗传距离, 采用邻接法(neighbor-joining, NJ)对测序获得的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, Bootstrap 自展 1 000 次检验进化树拓扑结构置信区间。

**1.2.3 朱鹮肠道微生物产酶能力测定** 对纯培养得到的菌株进行胞外酶能力测定, 使用无菌牙签进行穿刺培养, 选择蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶四种酶。

产蛋白酶细菌的筛选(黄振东等 2019): 使用产蛋白酶筛选培养基, 穿刺接种后于 37 °C 恒温培养, 48 h 后观察, 若菌落周围出现水解圈, 则说明为产蛋白酶细菌。

产淀粉酶细菌的筛选: 使用产淀粉酶筛选培养基, 穿刺接种后于 37 °C 恒温培养, 48 h 后观察, 加入卢戈氏碘液覆盖 1 min 后, 若菌落周围出现水解圈, 则说明为产淀粉酶细菌。

产纤维素酶细菌的筛选(何志伟等 2021): 使用产纤维素酶筛选培养基, 穿刺接种后于 37 °C 恒温培养, 48 h 后取出, 若菌落周围出现水解圈, 则说明为产纤维素酶细菌。

产脂肪酶细菌的筛选(张小龙等 2020): 使用脂肪酶筛选培养基, 灭菌后加入 PVA-橄榄油乳化液 120 ml, 摇匀后倒平板, 无菌条件下穿刺接种后于 37 °C 恒温培养, 48 h 后取出, 若菌落周围出现淡黄色水解圈, 则说明为产脂肪酶细菌。

四种酶的筛选培养基培养后, 分别测量其水解圈直径( $D$ )与菌落直径( $d$ ), 将其比值( $D/d$ )记为产酶能力大小。

## 1.3 统计分析

使用 SPSS 21.0 中的单因素方差分析检验实验结果中不同菌株的  $D/d$  值差异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 Dunnett's T3 检验进行多重比较,  $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离与纯化及形态学鉴定

对幼龄朱鹮粪便样本中的微生物进行分离

纯化后，最终得到 254 个纯化菌株。经过革兰氏染色鉴定出革兰氏阳性菌共 33 株，占分离总数的 12.99%；革兰氏阴性菌共 221 株，占分离

总数的 87.01%。部分菌株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，部分结果见表 1。经鉴定后，每个菌株

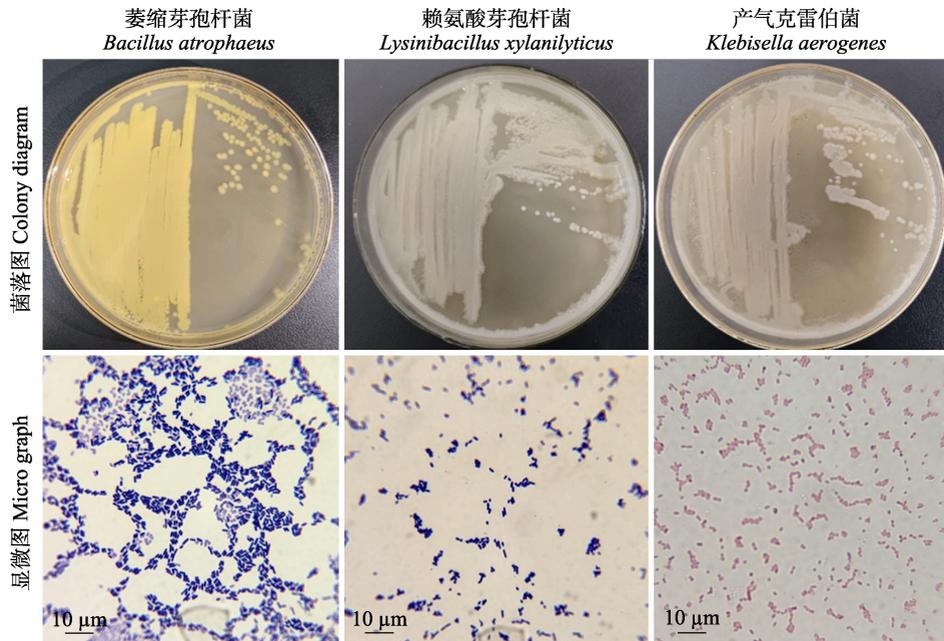


图 1 幼龄朱鹮部分肠道菌种的菌落特征与显微特征 (× 1 000)

Fig. 1 Colony characteristics and microscopic characteristics of some intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings (× 1 000)

表 1 幼龄朱鹮部分肠道细菌的生理生化鉴定

Table 1 Physiological and biochemical identification of some intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

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 <sub>2</sub> S	尿素 Urea	苯丙氨酸 Phenylalanine	明胶 Gelatin	枸橼酸 Citric acid	过氧化物酶 Peroxidase	接触酶 Catalase	硝酸盐还原 Nitrate reduction	甲基红 Methyl red, MR	乙酰甲基甲醇 Voges-Proskauer, VP
YJ39	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
YJ4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
YB057	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
YB071	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Y26	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
YB112+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Y38	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
YB078	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
YB134	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
YB052	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
YB004	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
YB074	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
YB093	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Y89	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Y96	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+

“+” 代表阳性，“-” 代表阴性。“+” means positive,“-” means negative.

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。

## 2.2 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

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, 所有扩增产物均在 1 500 bp 有明亮且单一的电泳条带 (图 2), 为可测序样本。测序所得序列通过 16S rRNA 基因序列比对分析后, 分为 2 门 9 属, 整理序列并提交 NCBI 中的 GenBank 数据库并获得登录号 (OP762719 ~ OP762972)。

上述 254 株细菌的分类及总数见表 2, 16S

rRNA 基因多样性序列比对结果见表 3。包含变形菌门 (Proteobacteria) 211 株, 占分离总菌株数的 83.07%, 为优势菌门, 其中埃希氏菌属 (*Escherichia*) 179 株, 占分离总菌株数的 70.47%, 为优势菌属。

基于代表菌株的 16S rRNA 基因构建的系统发育树 (图 3) 分为 2 大支, 分别为厚壁菌门 (Firmicutes) 与变形菌门 (Proteobacteria)。本研究分离出了一部分通过高通量测序技术检测出来但尚未通过纯培养手段分离得到的未培养细菌, 同时也分离得到了通过纯培养手段获得的可培养细菌。其中, 在变形菌门分支中, 以 YJ9 代表的未培养细菌和 YJ39 代表的可培

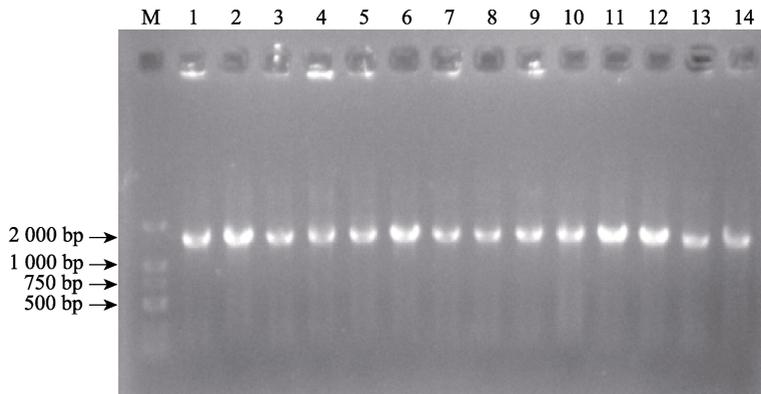


图 2 幼龄朱鹮肠道细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增图

Fig. 2 PCR amplification of 16S rRNA gene of intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

M. 分子量标记; 1~14 为本研究分离的细菌样本。M. Marker; 1 - 14 are bacterial samples obtained in this study.

表 2 幼龄朱鹮肠道细菌分类及总数

Table 2 Classification and total number of intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

细菌门分类 Classification of Bacteriophages	细菌属分类 Classification of the genus of bacteria	总数 Total	占总数的百分比 Percentage (%)
变形菌门 Proteobacteria	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	179	70.47
	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	18	7.09
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	14	5.51
	克雷伯菌属 <i>Klebsiella</i>	4	1.57
	志贺菌属 <i>Shigella</i>	4	1.57
	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	2	0.79
	厚壁菌门 Firmicutes	肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	27
	芽孢菌属 <i>Bacillus</i>	4	1.57
	赖氨酸芽孢杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	2	0.79

表 3 幼龄朱鹮肠道细菌可培养细菌 16S rRNA 基因多样性序列比对

Table 3 Sequence alignment of 16S rRNA gene diversity of culturable intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

属 Genera	克隆数量 Clone numbers	代表克隆 Representative clone	相似序列 Similar strains	相似度 (%) Similarity
埃希氏菌属 <i>Escherichia</i>	175	YJ9	Uncultured organism clone ELU0113-T282-S-NI_000126 (HQ788468)	99.86
	4	YJ39	<i>Escherichia fergusonii</i> strain 90ft2b (MG639902)	99.04
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	21	YB151	<i>Enterococcus hirae</i> strain MLG3-29-2 (MT473367.1)	99.37
	5	YB118+	Uncultured bacterium clone a5 (ON745458)	99.52
	1	YB003	<i>Enterococcus avium</i> strain 2324 (MT604783)	98.47
柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i>	10	YB074	Uncultured organism clone ELU0018-T230-S-NIPCRAMgA Na_000413 (HQ744946)	99.72
	8	YB057	Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone F2apr.45 (GQ417381)	99.51
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	11	YB080	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain IPBCC 19.1426 (MN428803)	99.55
志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	4	YB082	<i>Shigella flexneri</i> strain A64 (OP204110)	99.63
克雷伯菌属 <i>Klebsiella</i>	4	Y38	Uncultured organism clone ELU0138-T119-S-NIPCRAMgA Na_000118 (HQ795637)	99.63
芽孢菌属 <i>Bacillus</i>	2	YB078	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain Z78 (MG470729)	99.72
	2	YB127	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain B-4 (MT434773)	99.64
气单胞菌属 <i>Aeromonas</i>	2	Y89	Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone AS0829L1 (OP268346)	99.55
变形菌属 <i>Proteus</i>	3	Y96	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone DH5 Alpha 8 (OP748776)	99.46
赖氨酸芽孢杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	2	YB134	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> strain C5 (KX832684)	99.74

养细菌与埃希氏菌属聚在一起,以 YB071 为代表的可培养细菌与志贺氏菌属 (*Shigella*) 聚在一起,以 Y96 为代表的未培养细菌与变形菌属 (*Proteus*) 聚在一起,以 Y89 为代表的未培养细菌与气单胞菌属 (*Aeromonas*) 聚在一起,以 YB080 为代表的可培养细菌与肠杆菌属 (*Enterobacter*) 聚在一起,以 YB074 和 YB057 为代表的未培养细菌与柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*) 聚在一起,以 Y38 为代表的可培养细菌与克雷伯菌属 (*Klebsiella*) 聚在一起。在厚壁菌门分支中,以 YB118 为代表的未培养细菌和 YB151 及 YB003 为代表的可培养细菌与肠球菌属 (*Enterococcus*) 聚在一起,以 YB127 和 YB078 为代表的可培养细菌与芽孢菌属 (*Bacillus*) 聚在一起,以 YB134 为代表的可培养细菌与赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus*) 聚在一起。

### 2.3 肠道细菌产酶筛选

经蛋白酶筛选培养基筛选出 244 株产蛋白酶,占菌株总数的 83.07%,经脂肪酶筛选培养基筛选出 10 株细菌产脂肪酶,占菌株总数的 3.94%,经淀粉酶筛选培养基筛选出 19 株细菌产淀粉酶,占菌株总数的 7.48%,经纤维素酶筛选培养基筛选出 4 株细菌产纤维素酶,占菌株总数的 1.57%。部分胞外酶筛选见图 4,部分筛选结果见表 4。

根据朱鹮肠道可培养细菌 16S rRNA 基因多样性序列比对结果,在每个属中各挑选出一个代表菌株,共挑选出 15 个代表菌株,以便于分析,由于产纤维素酶的代表菌株只有 1 个,故额外选择了两个产纤维素酶的细菌以进行差异显著性分析。

产纤维素的细菌主要是宋内氏志贺菌 (*Shigella sonnei*); 产淀粉酶的细菌主要为产

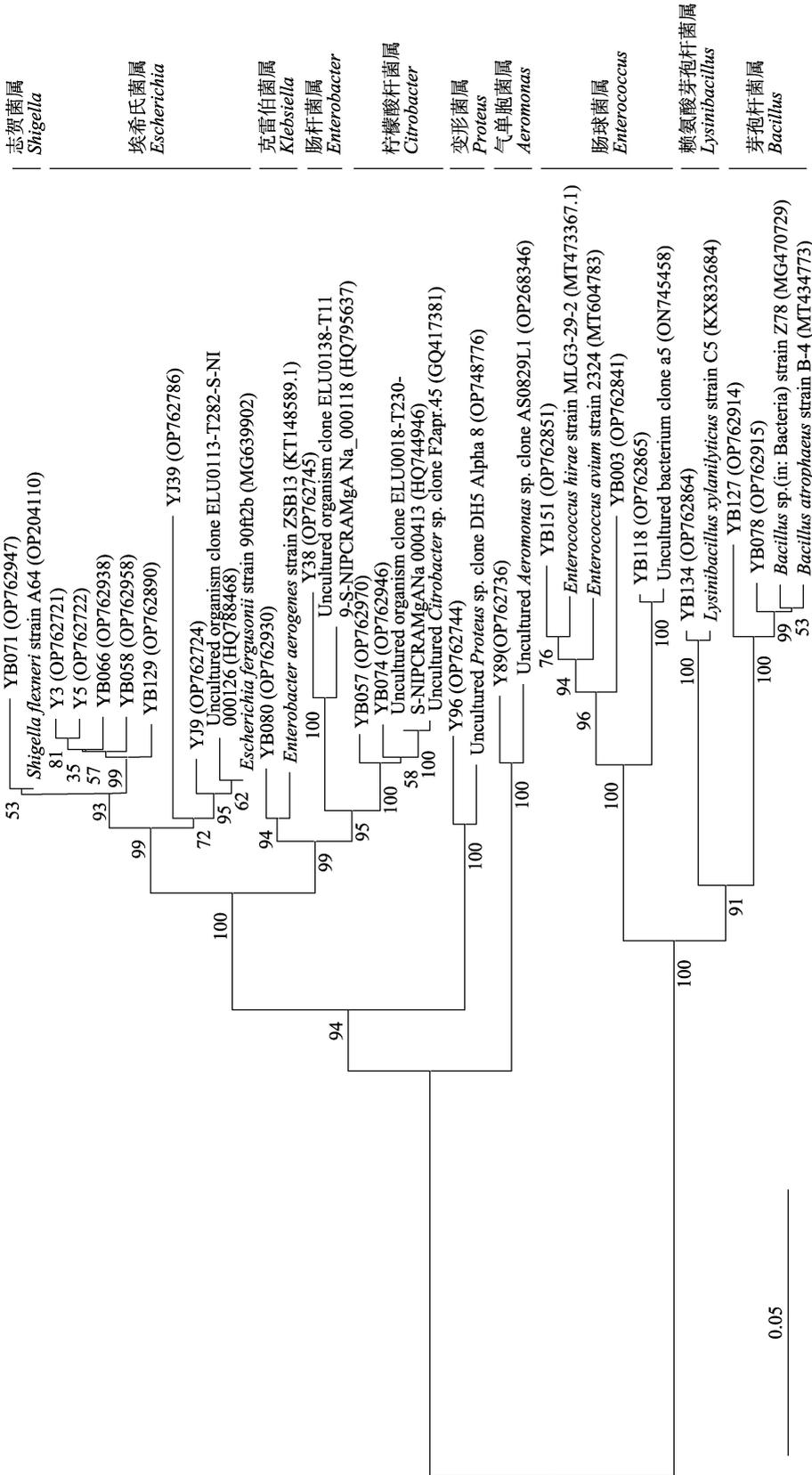


图 3 基于幼龄朱鹮肠道细菌 16S rRNA 基因序列构建的部分代表性分离菌株与相近种之间的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence between representative isolates and related species of intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

分支点附近的数字表示重复 1 000 次的 Bootstrap 自展值, 标尺 0.05 为进化距离。图中以 Y 开头的菌株为本次研究中分离得到的菌株, 括号中为相应菌株在 NCBI 的登录号。其余比序列均来自 NCBI 数据库。

The number near the branch represents the Bootstrap support value with 1 000 replications. The scale 0.05 is the evolutionary distance. The strains beginning with Y in the figure are the strains isolated in this study, and the NCBI accession numbers of the corresponding strains are shown in parentheses. The rest of the aligned sequences were obtained from the NCBI database.

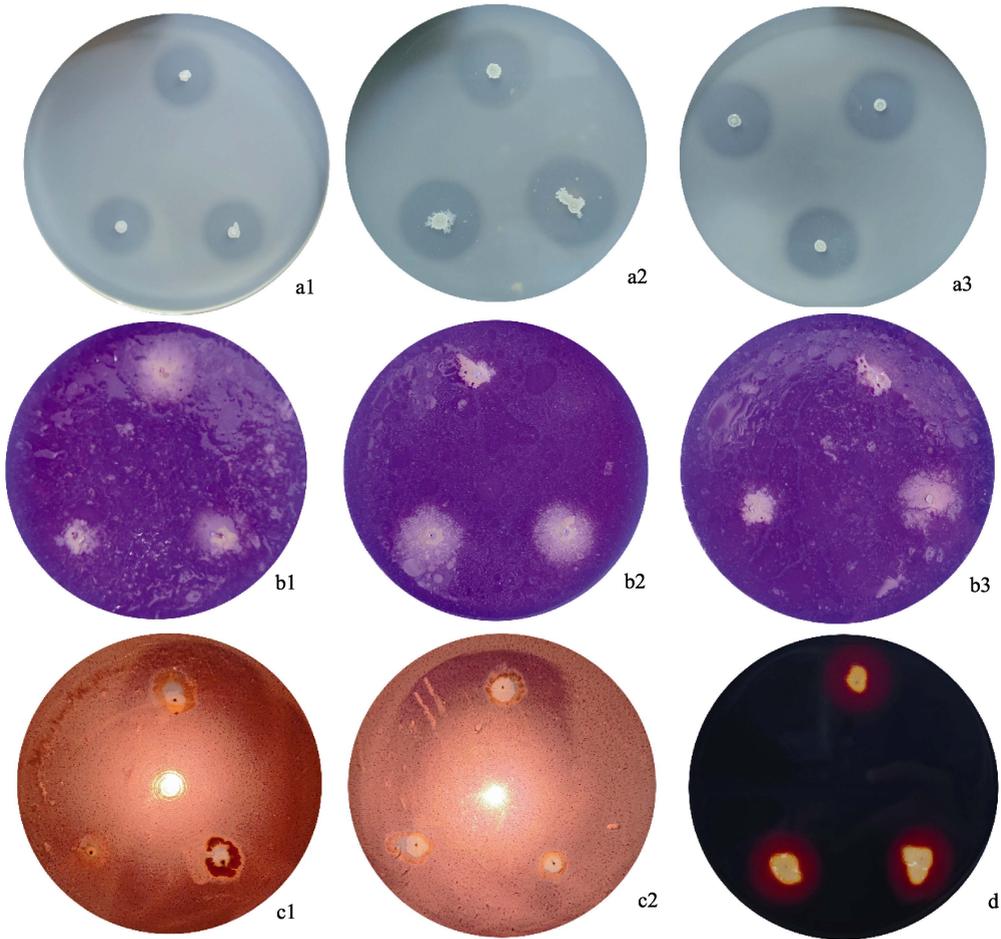


图 4 部分菌株产胞外酶筛选图

Fig. 4 Screening diagram of extracellular enzyme production of some strains

a. 产蛋白酶菌株, a1 ~ a3 代表产胞外酶能力由小到大; b. 产脂肪酶菌株, b1 ~ b3 代表产胞外酶能力差异; c1 和 c2. 产纤维素酶菌株; d. 产淀粉酶菌株。

a. Diagram of protease-producing strains, a1 - a3 represent the difference in extracellular enzyme production capacity; b. Diagram of lipase-producing strains, b1 - b3 represent the difference in extracellular enzyme production capacity; c1 and c2. Cellulase-producing strain; d. Amylase-producing strain.

气克雷伯菌、芽孢杆菌属和柠檬酸杆菌属; 产蛋白酶的细菌主要为克雷伯菌属、芽孢杆菌属、变形杆菌属 (*Proteus*)、柠檬酸杆菌属、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和宋内氏志贺菌; 产脂肪酶的细菌主要是克雷伯菌属、萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*) 和宋内氏志贺菌。

在产淀粉酶的代表菌株中, 菌株 YB078 的产胞外酶能相对于 Y25 和 Y96 差异显著

( $F_{4, 10} = 303.708, P < 0.001$ ), 菌株 Y25 和 Y96 的产胞外酶能力相对于菌株 YB127 差异显著 (Y25 vs. YB127:  $P < 0.01, 95\% \text{ CI} = [0.237 7, 0.644 4]$ ; Y96 vs. YB127:  $P < 0.01, 95\% \text{ CI} = [0.278 2, 0.735 1]$ ), YB078 菌株的产酶能力最强 (图 5a)。在产蛋白酶代表菌株中, 菌株 Y96 和 YB127 的产胞外酶能力相对于菌株 Y38 差异显著 ( $F_{8, 18} = 4 338.260, P < 0.001$ ), 菌株

表 4 幼龄朱鹮肠道部分细菌产胞外酶筛选结果

Table 4 Screening results of extracellular enzymes produced by some intestinal bacteria of *Nipponia nippon*

菌株号 Strain No.	纤维素酶 Cellulase	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	脂肪酶 Lipase	菌株名称 Strains name
YJ4	-	-	+	-	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
YJ39	-	-	-	-	弗格森埃希氏菌 <i>Escherichia fergusonii</i>
Y38	-	+	+	+	产气克雷伯菌 <i>Klebsiella aerogenes</i>
Y96	-	+	+	-	普通变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>
YB125	-	-	-	-	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>
Y29	-	-	-	-	海氏肠球菌 <i>E. hirae</i>
YB003	-	-	-	-	鸟肠球菌 <i>E. avium</i>
YB083	-	-	+	-	霍马氏肠杆菌 <i>Enterobacter hormaechei</i>
YB134	-	-	-	-	赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>
Y25	-	+	+	-	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i> spp.
YB057	-	-	+	-	弗式柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>
Y89	-	-	-	-	维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>
YB078	-	+	+	-	芽孢菌属 <i>Bacillus</i> spp.
YB127	-	+	+	+	萎缩芽孢杆菌 <i>B. atrophaeus</i>
YB071	+	-	+	+	宋内氏志贺菌 <i>Shigella sonnei</i>

“+”表示该菌株具有产消化酶的能力，“-”表示该菌株无产消化酶的能力。

“+” indicates that the strain has the ability to produce digestive enzymes, and “-” indicates that the strain has the ability to produce proletharian digestive enzymes.

Y38的产胞外酶能力相对于菌株YB134差异显著 ( $P < 0.05$ , 95% CI = [0.155 4, 0.611 3]), Y96和YB127菌株的产酶能力最强(图5b)。产纤维素酶的菌株中, 菌株YB018、菌株Y26与菌株YB071产胞外酶能力差异显著 ( $F_{2,6} = 778.400$ ,  $P < 0.001$ ) (图5c), YB018菌株的产酶能力最强(YB018 vs. YB071:  $P < 0.001$ , 95% CI = [0.268 2, 0.411 8]; YB018 vs. Y26:  $P < 0.001$ , 95% CI = [0.648 2, 0.791 8])。产脂肪酶代表菌株中, 菌株YB071、菌株Y38及菌株YB127的产胞外酶能力差异显著 ( $F_{2,6} = 218.679$ ,  $P < 0.001$ ; Y38 vs. YB127:  $P < 0.05$ , 95% CI = [0.061 7, 0.258 3]; Y38 vs. YB071:  $P < 0.001$ , 95% CI = [-0.437 1, -0.262 9]; YB127 vs. YB071:  $P < 0.001$ , 95% CI = [-0.6116, -0.408 4]) (图5d), YB071菌株的产酶能力最强。

对朱鹮肠道部分可培养细菌产胞外酶种类

和能力进行分析, 其中, 在变形菌属中, 以Y96为代表的菌株, 可产淀粉酶和蛋白酶, 且产蛋白酶能力最强 ( $D/d = 4.00$ ); 在埃希氏菌属中, 以YJ4和YJ39为代表的菌株中, 只有YJ4可产一种蛋白酶, YJ39不具有产胞外酶的能力; 在肠球菌属中, 以YB083、YB125、Y29和YB003为代表的菌株中, 只有YB083可产蛋白酶, 其余菌株均不具有产胞外酶的能力; 在柠檬酸杆菌属中, 以Y25和YB057为代表的菌株中, Y25可产淀粉酶和蛋白酶, YB057可产蛋白酶; 在芽孢杆菌属中, 以YB127和YB078为代表的菌株中, YB127可产淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶三种酶, 且产蛋白酶的能力最强 ( $D/d = 3.22$ ), YB078可产淀粉酶和蛋白酶; 在产气克雷伯菌属中, 以Y38为代表的菌株, 可产淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶, 其中产蛋白酶能力最强 ( $D/d = 4.03$ ); 在志贺菌属中, 以YB071为代表的菌株, 可产纤维素酶、蛋白酶、

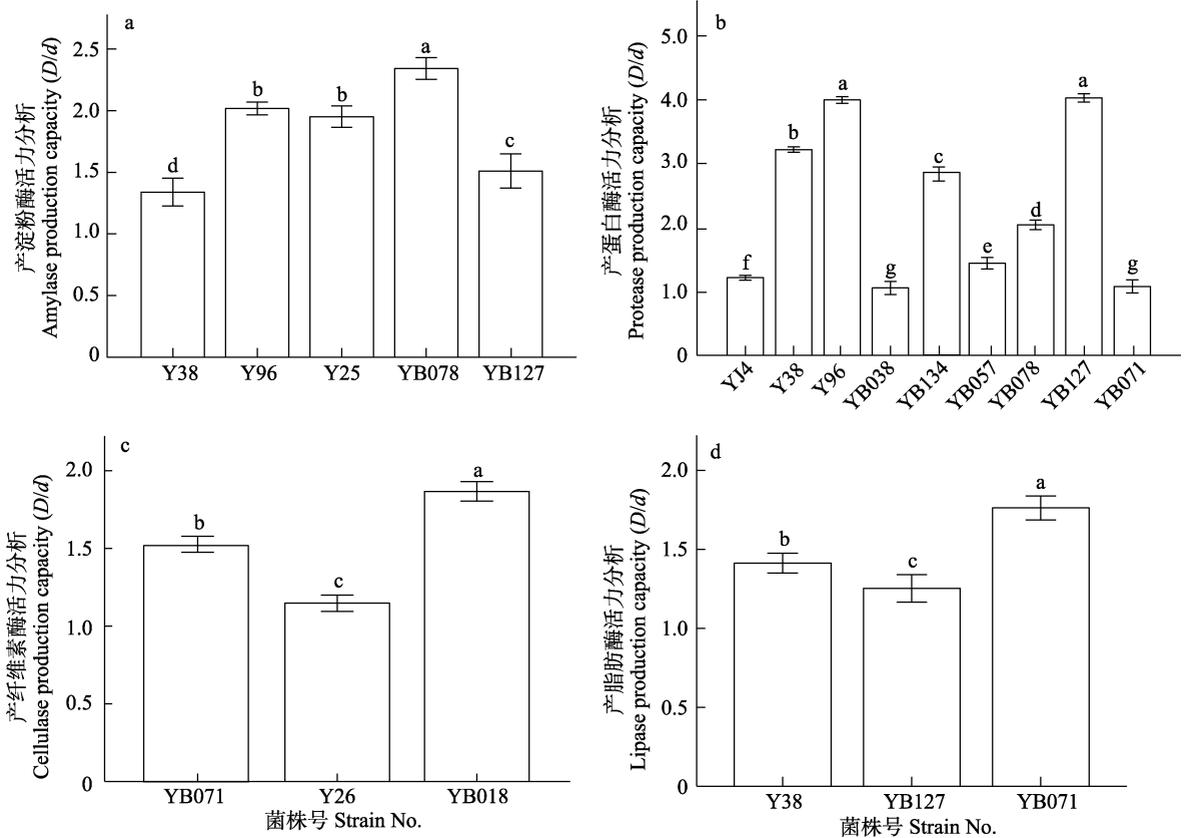


图 5 幼龄朱鹮肠道部分代表性细菌产胞外酶分析结果

Fig. 5 Analysis of extracellular enzymes produced by some representative intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

a. 产淀粉酶的菌株及其活力; b. 产蛋白酶的菌株及其活力; c. 产纤维素酶的菌株及其活力; d. 产脂肪酶的菌株及其活力。D/d 表示解圈直径与菌落直径的比值。图柱上不同的字母表示菌株间产酶活力存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 相同字母则表示不存在显著性差异。误差线表示标准差。

a. Amylase producing strain and its activity; b. Protease producing strain and its activity; c. Cellulase producing strain and its activity; d. Lipase producing strain and its activity. D/d stands for degradation zone ratio, D stands for degradation zone diameter, and d stands for colony diameter.  $P < 0.05$  indicates there is significant difference between the strains, different letters on the bars indicate that there is significant difference between them, and the same letters indicate that there is no significant difference. Error bar indicates standard deviation.

脂肪酶, 其中产脂肪酶能力最强 ( $D/d = 1.76$ ); 在气单胞菌属中, 以 Y89 为代表的菌株, 不具有产胞外酶的能力; 在赖氨酸芽孢杆菌属中, 以 YB134 为代表的菌株, 不具有产胞外酶的能力 (图 6)。

综上所述, 在朱鹮肠道分离出的菌株中, 有高达 86.22% 的菌株具有产胞外酶的能力。尤其是 Y38、YB127 和 YB071 三个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

本研究采用 9 日龄朱鹮幼鸟为研究对象, 使用纯培养方法对朱鹮肠道微生物进行分离纯化, 最终获得 254 株细菌, 属于变形菌门和厚壁菌门, 其中变形菌门为优势菌门。由于培养基的类型及培养条件不同, 可能会导致部分细菌无法被分离; 此外, 本研究仅采用了需氧培

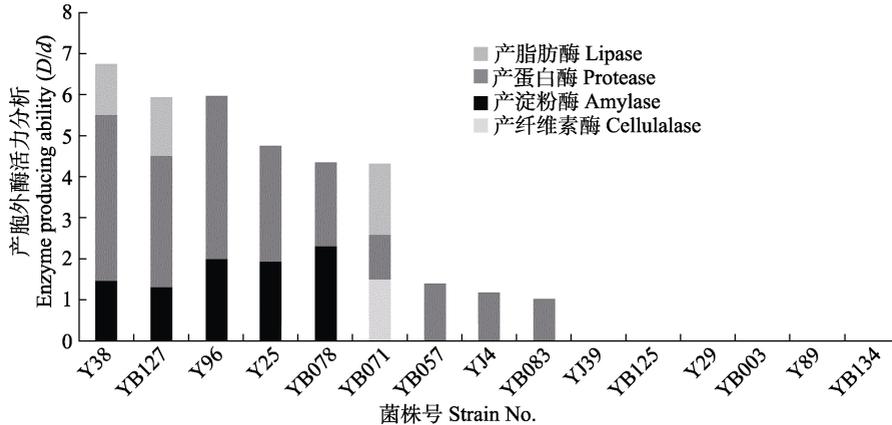


图 6 幼龄朱鹮肠道部分代表性细菌产胞外酶种类和能力分析

Fig. 6 Analysis of extracellular enzyme producing species and ability of some representative intestinal bacteria of *Nipponia nippon* nestlings

$D/d$  表示水解圈比值,  $D$  表示水解圈直径,  $d$  表示菌落直径。

$D/d$  stands for degradation zone ratio,  $D$  stands for degradation zone diameter, and  $d$  stands for colony diameter.

养, 并未采用厌氧培养, 故在分离的菌株中缺少厌氧细菌。与高通量测序技术相比, 纯培养对于微生物物种丰富度的研究是有缺陷的, 因为对于微生物来说, 约 99% 的物种是无法在实验室中培养出来的。由于不同细菌在相同培养条件下生长情况不一致, 生长缓慢的细菌难以被察觉, 导致在挑取菌落时未能得到这类细菌, 造成菌种缺失。

有学者 (Zhu et al. 2021) 通过高通量测序技术分析幼龄朱鹮肠道微生物的演替, 发现幼龄朱鹮 6 ~ 9 日龄时, 厚壁菌门的细菌呈现下降趋势, 同时变形菌门的细菌呈现上升趋势。幼龄朱鹮在 9 日龄以后, 肠道微生物趋于稳定, 其优势菌群为变形菌门细菌和厚壁菌门细菌。另有报道 (Ran et al. 2021) 指出, 幼龄朱鹮肠道微生物主要由厚壁菌门、变形菌门和梭杆菌门 (*Fusobacterium*) 组成, 从 9 日龄之后, 肠道微生物种类开始趋于一致, 随着幼龄朱鹮日粮中新鲜泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 的加入, 梭杆菌门的细菌和厚壁菌门中的梭菌属细菌数量大幅增加, 变形菌门细菌和厚壁菌门细菌开始减少, 厚壁菌门主要由芽孢菌属和梭

菌属组成, 芽孢菌属基本不变。考虑到 9 日龄后的朱鹮肠道微生物开始趋于稳定, 因此本研究采用该阶段幼龄朱鹮的粪便为研究对象, 采用纯培养技术分离肠道细菌, 经纯化后分析, 纯培养细菌以厚壁菌门和变形菌门菌株为主, 其中, 变形菌门是优势菌门, 埃希氏菌属是优势菌属, 在该年龄段, 肠道微生物的优势菌群与文献 (Zhu et al. 2021) 一致。本研究未获得酸杆菌门和放线菌门细菌, 可能是由于含量过少, 生长时容易被其他细菌覆盖导致无法分离; 厚壁菌门细菌相对较少, 主要以肠球菌属为主, 而文献 (Ran et al. 2021) 中主要以梭菌属为主。可能由于本研究未进行厌氧培养, 导致梭杆菌门和厚壁菌门中的梭菌属这类厌氧菌未能分离出来。

以往研究通过高通量测序技术对极度濒危的蓝冠噪鹛 (*Garrulax courtoisi*) (Wang et al. 2022) 以及树麻雀 (*Passer montanus*) (Zhang et al. 2023) 和红隼 (*Falco tinnunculus*) (Yu et al. 2020) 的肠道微生物类群进行了分类, 发现在门水平上, 厚壁菌门和变形菌门的细菌为占主导菌群, 而在属水平上, 由于物种之间的差异

以及饮食等原因, 导致细菌均各不相同。Zhu 等 (2021) 及 Ran 等 (2021) 对朱鹮肠道微生物的高通量测序表明, 厚壁菌门和变形菌门为优势菌门, 说明在鸟类中, 这两类门的细菌占主导地位。通过纯培养技术对山齿鹑 (*Colinus virginianus*) (Su et al. 2014)、隐鹮 (*Geronticus eremita*) (Spergser et al. 2018) 和成年朱鹮 (史怀平等 2008) 的肠道微生物进行分离培养, 结果显示厚壁菌门、变形菌门和放线菌门细菌为优势菌门。

饮食结构会对肠道微生物的种类产生一定的影响 (刘艺端等 2016), 朱鹮保护站养殖幼龄朱鹮的目的是让其健康成长, 成年后将其放归自然, 因此, 在幼龄朱鹮的食谱选择上, 参考了野外朱鹮的食谱。由于野生朱鹮的主要食物来源是泥鳅, 偶尔也会附以小昆虫和野果为食, 故在人工繁育幼龄朱鹮时, 其日粮组成以泥鳅为主食, 用黄粉虫 (*Tenebrio molitor*)、奶粉和苹果等作为辅食以补充必要的氨基酸等物质, 调节肠道微生物的组成。朱鹮保护站对 9 日龄朱鹮的饲料配比为泥鳅、黄粉虫、苹果、蛋黄、奶粉和水分别按 55%、5%、5%、10%、5% 和 15% 比例混合打碎饲喂。考虑到朱鹮日粮成分组成, 结合幼龄朱鹮的食谱, 本研究选择了降解蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶这 4 个基础功能进行细菌功能研究, 为后续发掘对幼龄朱鹮肠道有益的菌株组合奠定基础。

此次分离可产胞外酶的细菌中, 有 244 株产蛋白酶、19 株产淀粉酶、10 株产脂肪酶和 4 株产纤维素酶, 分别占分离菌株总数的 83.07%、7.48%、3.94% 和 1.57%。黄粉虫和泥鳅作为幼龄朱鹮的主要食物, 含有大量的蛋白质 (钦传光等 2002, 陈继发 2021), 本研究分离到的肠道微生物有 83.07% 的细菌可以产蛋白酶, 与朱鹮日粮组成相对应; 同时, 这类高蛋白的食物会增加肠道中大肠杆菌的数量 (Lubbs et al. 2009)。当 9 日龄朱鹮以上述配方的饲料为食时, 可以更好地消化吸收其中的营养物质, 同时其肠道菌群会逐渐趋于成鸟朱鹮

的肠道菌群, 保证该阶段幼龄朱鹮的健康成长。脂肪酶的含量较少, 可能是因为泥鳅中的脂肪含量较少 (周美玉等 2022), 使分解利用脂肪的细菌无法生存。此外, 由于朱鹮在野外会进食野果等植物性食物, 在幼龄朱鹮的人工养殖中, 用苹果来代替野外的植物性食物, 以帮助肠道中产纤维素酶和产淀粉酶的细菌定植。

动物肠道中存在着许多共生菌, 在健康的动物中, 肠道菌群与宿主健康之间存在着共生关系, 以维持宿主的正常机能, 但这种平衡可以随着年龄、环境、饮食和习性等外界因素的改变而发生变化。肠道微生物可以通过改变宿主免疫能力对宿主产生积极的影响, 有研究表明, 肠道微生物在鸟类生命早期与宿主胸腺 T 细胞之间会相互作用, 从而调节宿主 T 细胞活力 (Cheng et al. 2021)。

动物肠道微生物对动物的消化吸收、维持免疫、能量摄取和消耗、新陈代谢及生长发育等有着非常重要的调节作用 (Rooks et al. 2016, Osadchiy et al. 2019, Tilg et al. 2020)。本实验得到 27 株肠球菌属细菌, 经序列比对有 21 株为海氏肠球菌细菌。报道显示, 海氏肠球菌为动物肠道益生菌, 已经被用于药物、食品和微生态制剂等 (鲁旭等 2019); Ruiz-Rodríguez 等 (2013) 从戴胜 (*Upupa epops*) 体内分离得到海氏肠球菌, 发现其产生的细菌素可以改善宿主肠道的微生态环境; Arokiyaraj 等 (2014) 也发现了一株可以抑制肠道中病原菌、具有抗菌抗炎作用的海氏肠球菌。本研究采用纯培养筛选分离获得可培养菌株, 通过对这些菌株特性研究, 期望发掘朱鹮肠道微生物益生菌, 并制作成微生态制剂, 用以改善家禽或者鸟类甚至于朱鹮的肠道微生物结构, 以代替抗生素的使用。

## 参 考 文 献

- Arokiyaraj S, Hairul Islam V I, Bharanidharan R, et al. 2014. Antibacterial, anti-inflammatory and probiotic potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*.

- World Journal of Microbiology & Biotechnology, 30(7): 2111–2118.
- BirdLife International. 2018. *Nipponia nippon*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22697548A132069229. [2023-03-10]. [DB/OL]. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22697548A132069229.en>.
- Blumstein D T, Rangchi TN, Briggs T, et al. 2017. A systematic review of carrion eaters' adaptations to avoid sickness. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(3): 577–581.
- Cheng J H, Yuan Y S, Zhao F, et al. 2021. Thymic T-cell production is associated with changes in the gut microbiota in young chicks. *Frontiers in Immunology*, 12: 700603.
- Drancourt M, Berger P, Raoult D. 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5): 2197–2202.
- Grond K, Sandercock B K, Jumpponen A, et al. 2018. The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *Journal of Avian Biology*, 49(11): e01788.
- Guan Y, Wang H F, Gong Y N, et al. 2020. The gut microbiota in the common kestrel (*Falco tinnunculus*): a report from the Beijing Raptor Rescue Center. *PeerJ*, 8: e9970.
- Kakumanu M L, Reeves A M, Anderson T D, et al. 2016. Honey bee gut microbiome is altered by In-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1255.
- Li X H, Fu J Y, Zhai T Q, et al. 2022. Understanding recovery is as important as understanding decline: the case of the Crested Ibis in China. *Land*, 11(10): 1817.
- Lubbs D C, Vester B M, Fastinger N D, et al. 2009. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93(1): 113–121.
- Osadchiv V, Martin C R, Mayer E A. 2019. The gut-brain axis and the microbiome: mechanisms and clinical implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2): 322–332.
- Ran J, Wan Q H, Fang S G. 2021. Gut microbiota of endangered Crested Ibis: establishment, diversity, and association with reproductive output. *PLoS ONE*, 16(4): e0250075.
- Rooks M G, Garrett W S. 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6): 341–352.
- Ruiz-Rodríguez M, Martínez-Bueno M, Martín-Vivaldi M, et al. 2013. Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3): 495–502.
- Spergser J, Loncaric I, Tichy A, et al. 2018. The cultivable autochthonous microbiota of the critically endangered Northern Bald Ibis (*Geronticus eremita*). *PLoS ONE*, 13(4): e0195255.
- Su H W, McKelvey J, Rollins D, et al. 2014. Cultivable bacterial microbiota of northern bobwhite (*Colinus virginianus*): a new reservoir of antimicrobial resistance? *PLoS ONE*, 9(6): e99826.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Tilg H, Zmora N, Adolph T E, et al. 2020. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20: 40–54.
- Waite D W, Taylor M W. 2015. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. *Frontiers in Microbiology*, 6: 673.
- Wang C, Li J W, Cheng Y W, et al. 2022. Investigation on the characteristics of gut microbiota in critically endangered blue-crowned laughingthrush (*Garrulax courtoisi*). *Molecular Genetics and Genomics*, 297(3): 655–670.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697–703.
- Zhang S, Shen Y, Wang S N, et al. 2023. Responses of the gut microbiota to environmental heavy metal pollution in tree sparrow (*Passer montanus*) nestlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 264: 115480.
- Zhu Y, Li Y D, Yang H Q, et al. 2021. Establishment of gut microbiome during early life and its relationship with growth in endangered Crested Ibis (*Nipponia nippon*). *Frontiers in Microbiology*, 12: 723682.
- 陈继发. 2021. 黄粉虫的营养特性及其在畜禽饲料中的应用效果. *中国畜牧兽医*, 48(7): 2424–2430.

- 丁长青. 2004. 朱鹮研究. 上海: 上海科技教育出版社.
- 何志伟, 董起钰, 刘锐, 等. 2021. 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. *中国媒介生物学及控制杂志*, 32(2): 224–229.
- 候建平, 郑思思, 龙鑫, 等. 2021. 高山兀鹫肠道微生物的分离鉴定与耐药性分. *野生动物学报*, 42(2): 460–469.
- 黄振东, 万晴, 薛志静, 等. 2019. 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. *中国媒介生物学及控制杂志*, 30(4): 409–413.
- 刘艺端, 余凯凡, 朱伟云. 2016. 食物主要成分与动物肠道微生物组成及其代谢的关系. *世界华人消化杂志*, 24(5): 706–713.
- 鲁旭, 张影, 曾明. 2019. 益生性肠球菌安全性评价研究进展与监管. *中国药事*, 33(5): 555–560.
- 钦传光, 韩定献, 董先智, 等. 2002. 泥鳅及其提取物中营养成分的研究. *食品科学*, 23(2): 123–126.
- 史怀平, 杨增岐, 操胜. 2008. 健康朱鹮消化道正常菌群的分离与鉴定. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 36(3): 69–74.
- 王贺祥. 2003. 农业微生物学. 北京: 中国农业大学出版社, 345–346.
- 闫鲁, 黄治学. 2021. 35年来朱鹮的保护经验与发展思路. *野生动物学报*, 42(3): 890–896.
- 张小龙, 曹娜, 张续, 等. 2020. 普通卷甲虫肠道可培养细菌的分离、鉴定及产消化酶活性. *中国微生态学杂志*, 32(3): 269–273, 277.
- 周美玉, 李达, 李安东, 等. 2022. 野生和养殖大鳞副泥鳅营养成分比较分析. *湖北农业科学*, 61(6): 134–138.