



兽医临床科学

滇西南野猪肠道微生物初探

张子蕴¹, 王炳辉²

(1. 西南林业大学 林学院, 云南昆明 650224; 2. 昆明医科大学, 云南昆明 650500)

摘要: 为揭示滇西南地区野猪肠道微生物组成以及三地不同地理环境对其肠道微生物的影响, 研究于 2023 年 9~11 月采集临沧、德宏、怒江三地野猪消化道组织, 提取 DNA 后, 利用 16S rDNA V3~V4 区扩增子进行测序和分析。结果表明, 从野猪样本中共获得 9 761 条有效序列, 聚类产生 8 218 个操作分类单元(OTU), 分属 33 个门和 554 个属, 不同地区生活的野猪的粪便菌群结构和功能有所不同。综上, 三地野猪的肠道菌群有一定的共性, 同时也存在明显的差异。说明不同生活环境会导致野猪肠道微生物菌群差异, 生活环境复杂会使得野猪肠道微生物群落更加丰富。

关键词: 野猪; 肠道微生物; 滇西南

[中图分类号] S852.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1004-6704(2025)-03-0048-08

Preliminary Study on the Gut Microbiota of Wild Boars in Yunnan Southwest

ZHANG Ziyun¹, WANG Binghui²

(1. College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China;

2. Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: To reveal the composition of the gut microbiota in wild boars from the southwestern region of Yunnan and explore the impact of different geographical environments on their gut microbiota, the study was conducted from September to November 2023, collecting gastrointestinal tract tissues from wild boars in Lincang, Dehong, and Nujiang. After extracting DNA, 16S rDNA V3-V4 region amplicon sequencing and analysis were performed. The results showed that a total of 8 218 valid sequences were obtained from the wild boar samples, which were clustered into 8 218 operational taxonomic units(OTUs), belonging to 33 phyla and 554 genera. The Firmicutes and Bacteroidetes were the dominant phyla in all samples. The fecal microbial community structure and function of wild boars living in different regions differed. In summary, the gut microbiota of wild boars from the three regions share certain commonalities, but there are also significant differences. This indicates that different living environments can lead to variations in the gut microbiota of wild boars, and a more complex living environment can result in a richer gut microbial community.

Key words: sus scrofa; gut microbiota; Yunnan Southwest

众多研究逐渐揭示, 栖息于哺乳动物肠道内的庞大微生物群体, 其规模达到数万亿之巨, 对宿主的生理健康起着至关重要的作用, 它有助于食物的消

化过程, 同时抑制有害细菌的繁殖, 并且可以对免疫系统起到平衡作用等诸多益处^[1]。因为取材方便, 而且其中的微生物群落也能在某种程度上代表肠道微生物, 所以, 粪便及解剖学标本是最好的研究对象^[2]。近年来, 基于粪便样本的野生动物肠道菌群的差异性研究在诸多野生哺乳动物中逐渐开展^[3], 包括大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)^[4]、梅花鹿

[收稿日期] 2025-01-08

[第一作者] 张子蕴(1998-), 女, 硕士研究生, 主要从事野生动物研究。E-mail: 444537492@qq.com

* [通信作者] 王炳辉, binghuiwang@aliyun.com

(*Cervus nippon*)^[5]、猕猴(*Macaca mulatta*)^[6]、岩羊(*Pseudois nayaur*)^[7]等。通过采用高通量测序技术,研究者们不仅揭示了野生动物消化道内微生物的构成及其关键菌群,还对微生物的功能多样性进行了剖析。随着探索的不断进展,分析动物的饮食习惯变得尤为重要,这有助于揭示动物的营养摄取策略及其在食物链中的位置,成为研究物种间竞争与共生关系的必要途径,同时也为实施针对性的保护和管理策略提供了科学依据^[8-9]。通过对滇西南山猪的食物组成及其与猎物的相互关系的研究,可以为评估其栖息地,估算其容纳量,探讨其种间的亲缘关系等提供依据。野猪属脊椎动物亚门、哺乳纲(Mammalia)、偶蹄目(Artiodactyla)、猪科(Suidae)、猪属(*Sus*),是重要的资源兽类之一,体型似家猪,曾是中国“三有”保护名录下动物,但因其破坏力强且群落之间无明显生殖困难导致近年来数量激增,对栖息地的人类生活区造成较大影响,被移除“三有”名录。因此,该方案旨在利用前沿的高通量测序手段,深入探究各地猪只肠道内微生物群落的组成、多样性特征,并分析其在代谢功能方面表现出的地区性区别,以期为中国猪只的研究、监测和生防措施的开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样本采集

三地野猪组织在德宏、怒江和临沧的林场采集,共采集了5头成年野猪的个体样本,为防止周遭环境对样本产生污染,采集后的样品立即在现场进行解析处理,处理完成后迅速置入装有液氮的运输容器内进行搬运,抵达实验室随即放置于-80℃的冰箱中保存。本研究中三地的野猪均为野外生存,不存在人工饲养干预且无人工投喂。

1.2 DNA提取

采用特定于动物组织的DNA提取试剂套装(如细菌型DNA快速提取套装)对基因组DNA进行分离纯化,随后通过Thermo NanoDrop One设备对提取的DNA样本进行纯度与浓度的测定。

1.3 目标序列的扩增和测序

以提取的DNA样本为模板,借助16S rDNA的V3~V4区域通用引物341F(序列为5'-AT-GCGTAGCCGACCTGAGA-3')与805R(序列为5'-CGTCAGACTTTCGTCCATTGC-3')进行聚合酶链式反应扩增,具体反应参照Du等^[10]的微生物检测方法。依照纽英伦生物实验室(New England Biolabs,美国)出品的NEBNext® Ultra™ II DNA

Library Prep Kit for Illumina®的标准建库步骤执行操作。随后,利用Illumina Nova 6000测序系统,对所构建的扩增子文库开展PE250双端测序工作。

1.4 统计方法

经过UPARSE软件的聚类处理,对优化序列执行OUT分类单元的聚类操作,随后对这些序列的代表进行物种信息标注。通过与SILVA(16S)数据库的对比分析,获取了物种的注释信息(置信度标准设定为0.8)。在此过程中,淘汰了那些注释为叶绿体或线粒体的序列,以及未能精确分类至界级别的OTU和Tags。最终,我们获得了可用于分析的各样本有效Tags序列总量及其OTU分类学汇总数据。依据微生物分类体系,对搜集的数据在域、界、门、纲、目、科、属、种的分类层级上执行综合数据分析。借助R编程语言工具,完成物种共有性与独特性计数、菌群结构剖析以及物种丰富度的聚类处理。利用OTU丰度矩阵,计算出多样性指标(包括Chao1、Shannon、Simpson、ACE指数);同时,应用R语言中的vegan包进行主坐标分析(PCoA)。利用LEfse工具对各组样本间微生物物种的丰度差异进行显著性检验,筛选出在各个分组中丰度存在显著差异的物种。随后,通过Wilcoxon秩和检验对每两个样本组别间的差异进行具体比较。在此基础上,采用线性判别分析以实现数据降维,并评估这些具有显著差异的物种对于组间区分的重要性(即LDA评分)。在此过程中,将LDA评分的阈值设定为2.5,以此标准挑选出的物种即为各组的生物标志物;通过对KEGG数据库的深入分析,对微生物的功能进行分类整理。采用PICRUST工具对OTU的丰度信息进行规范化处理,旨在减少16S rRNA基因在基因组中拷贝数量不一致所造成的偏差。接着,实施OTU与KEGG数据库的对应比对,收集相应的KO编号、代谢途径数据及酶编码号,进而推算出各功能群组的丰度指标,并形成不同样本在各个分类级别上的丰度分布数据表,以供进一步的数据分析之需。

2 结果与分析

2.1 共有与特有OTU统计分析

如图1所示,对从德宏、怒江、临沧获得的野猪样本深度解读微生物分类学的立体架构,涵盖了从OTU等级到属、科,直至门类别的细致探讨,目的在于阐述微生物群落结构在不同分类等级中的分布特性。在本项研究中,对3个不同地域的野猪肠道微生物群进行了详细地剖析,共计发现8 218个

OTU,这些 OTU 跨越 33 大门类,进一步划分为 554 个属别。在对 OTU 级别进行精细研究的过程中,发现 3 个采样区野猪肠道中存在 307 个共有 OTU,临沧地区样本特有 1 287 个 OTU,怒江地区样本特有 1 946 个 OTU,而德宏地区样本中则有 3 863 个 OTU 是独有的;在微生物群落分类上,3 个地区的野猪肠道中存在 16 个共有的菌属。具体来看,临沧地区的野猪拥有 44 个独特的菌属,德宏地区的野猪有 63 个独特的菌属,而怒江地区的野猪则含有 54 个独特的菌属。这一发现揭示了尽管生存环境各异,野猪的肠道微生物群落仍保持着一定程度的共性,同时各自也展现出独特的微生物组成。通过稀释性曲线分析(图 2),本次测序数据能够较为准确地反映样本中肠道菌群的实际情况。

2.2 肠道微生物群落组成

从门水平上看(图 3A),德宏野猪肠道微生物群落中的 4 个优势菌门分别为 Proteobacteria、Bacteroidetes、Epsilonbacteraeota、Fusobacteria;临沧野猪肠道微生物群落中的 4 个优势菌门分别为 Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria。怒江野猪肠道微生物群落的 4 个优势菌门分别为:Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria。从科水平上看(图 3B),德宏肠道微生物群落中的 4 个优势菌科分别为 Pseudoalteromonadaceae、Chitinophagaceae、Vibrionaceae、Fuso-

bacteriaceae;怒江野猪肠道微生物群落中的 4 个优势菌科分别为 Veillonellaceae、Prevotellaceae、Ruminococcaceae、Lachnospiraceae;临沧野猪肠道微生物群落中 4 个优势菌科为:Pseudoalteromonadaceae、Lachnospiraceae、Veillonellaceae、Ruminococcaceae;从门水平看(图 3A),三地野猪肠道微生物群落中数量排名前 4 的菌门分别为在微生物分类学的领域中,我们发现了厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)以及柔壁菌门(Tenericutes)。进一步深入到科的分类层面(图3B),在3个不同地点的野猪肠道微生物

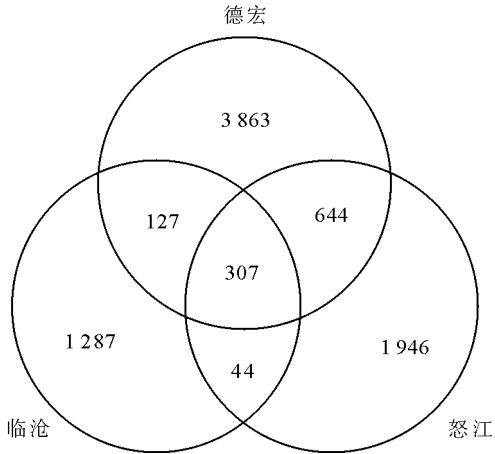


图 1 三地野猪特有及共有 OTU

Fig. 1 Unique and shared OTUs of wild boars from three locations

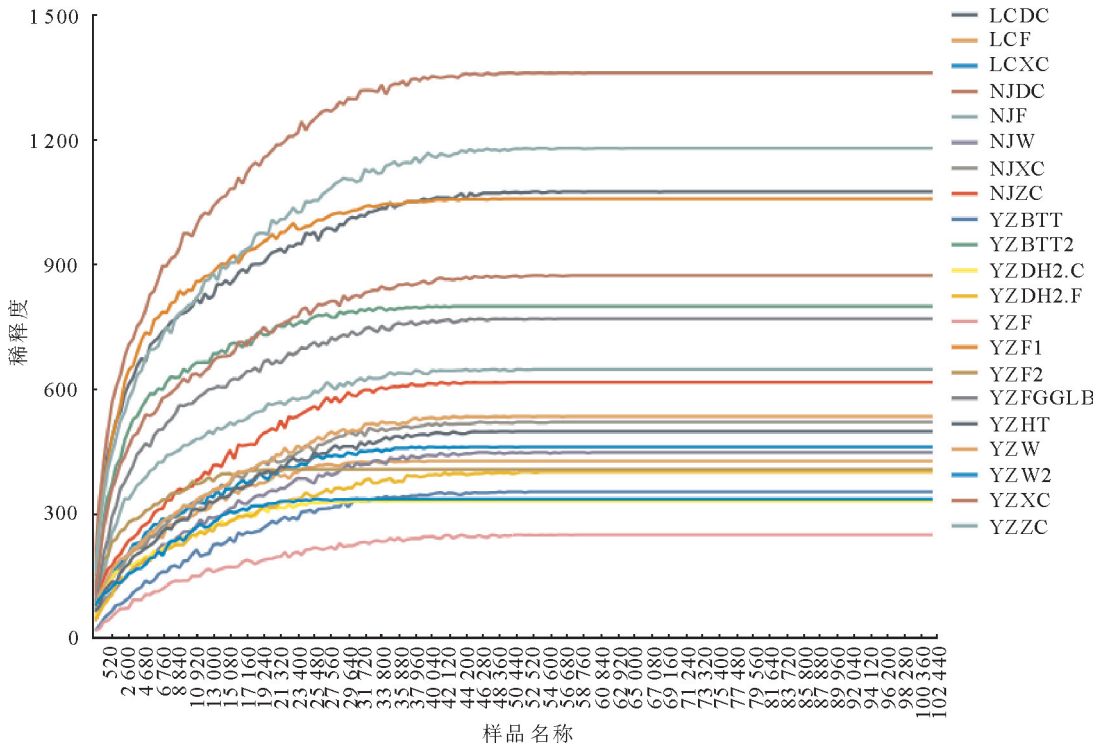


图 2 三地样品 OTU 稀释性曲线

Fig. 2 OTU dilution curves of samples from three places

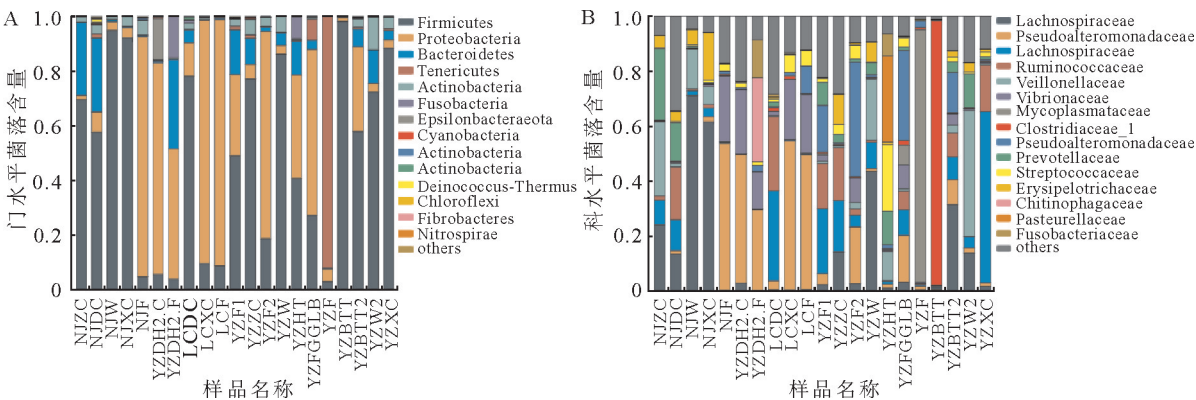


图3 三地野猪肠道微生物组成门水平(A)和科水平(B)的含量

Fig. 3 Gut microbial composition of wild boars in three places at the phylum level(A) and at the level of the family(B)

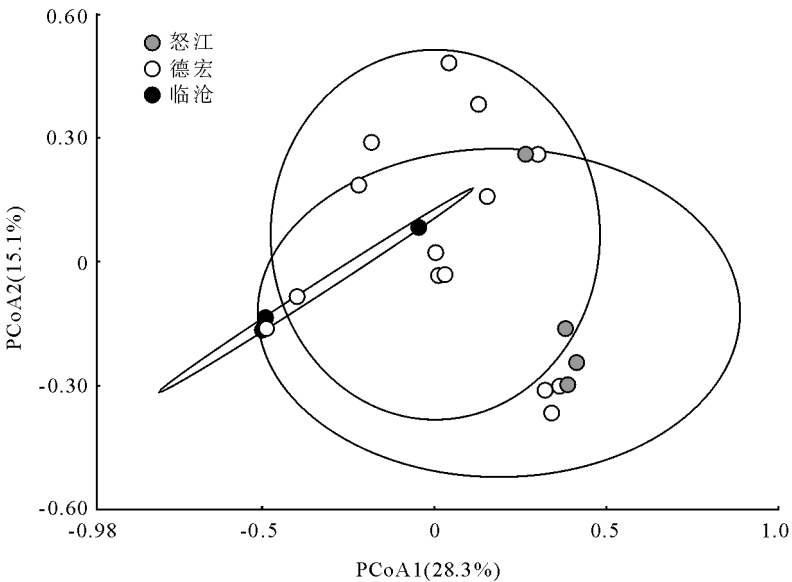


图4 PCoA 分析

Fig. 4 PCoA analysis

物群中,数量上占据前四位的菌科是:毛螺菌科(Lachnospiraceae)、弧菌科(Vibrionaceae)、交替单胞菌科(Pseudoalteromonadaceae)以及再次出现的弧菌科(Vibrionaceae),占比分别为34.30%、8.53%、7.63%、5.61%。

2.3 肠道微生物群落 Beta 多样性分析

由图4可以明显看出,3个地区人工饲养的野猪在肠道微生物群落的构成上存在显著的差异性。而怒江地区的野猪样本,其肠道微生物的组成与其他两地相比,虽然在交叉区域较多,但其所占的独立区域也相对较大,这表明怒江地区野猪的肠道微生物具有更高的多样性。

2.4 肠道标志物物种生物菌群差异分析

由图5可以看出,3个不同区域野猪体内的生物标识物种丰富度及其所含有的种类差异。白色为临沧种群、灰色为怒江种群、黑色为德宏种群。临沧种群中莫拉菌科(f_Moraxellaceae, LDA=2.2797,

P=0.049)的差异贡献性最大,怒江种群中的琥珀酸弧菌科(f_Succinivibrionaceae, LDA=2.1955, P=0.030)的差异贡献性最大德宏种群中(f_Pseudoalteromonadaceae, LDA=4.6008, P=0.030)的差异贡献性最大。临沧野猪的肠道菌群差异物种多于德宏野猪肠道菌群差异多怒江野猪肠道菌群差异。

2.5 肠道微生物功能差异分析

通过样本对比分析,我们可以观察到3个不同地区的野猪种群在肠道微生物功能方面存在着显著的异质性,具体体现在KEGG通路的第一层分类上,详见图6。基因数据处理(genetic information processing)和新陈代谢(metabolism)差异最为明显,新陈代谢水平德宏野猪群体高于临沧野猪群体,细胞进程水平(cellular processes)临沧野猪群体高于怒江野猪群体。在KEGG通路水平2中(图7),三地野猪有5条通路有显著差异,其中其他氨基酸的代谢通路(metabolism of other amino acids)、氨

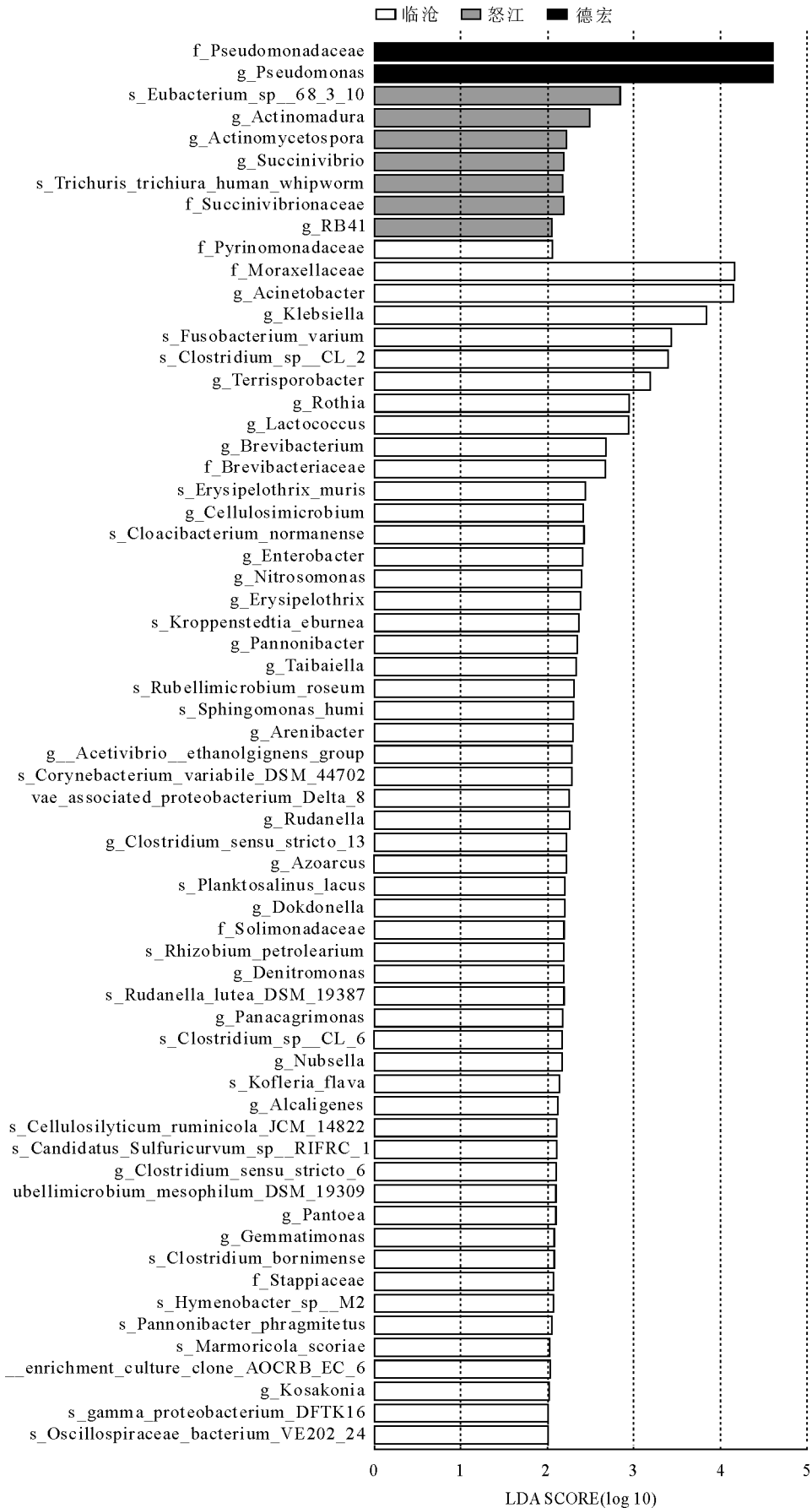


图 5 LDA 差异物种分析(Log10)
Fig. 5 LDA differential species analysis (Log10)

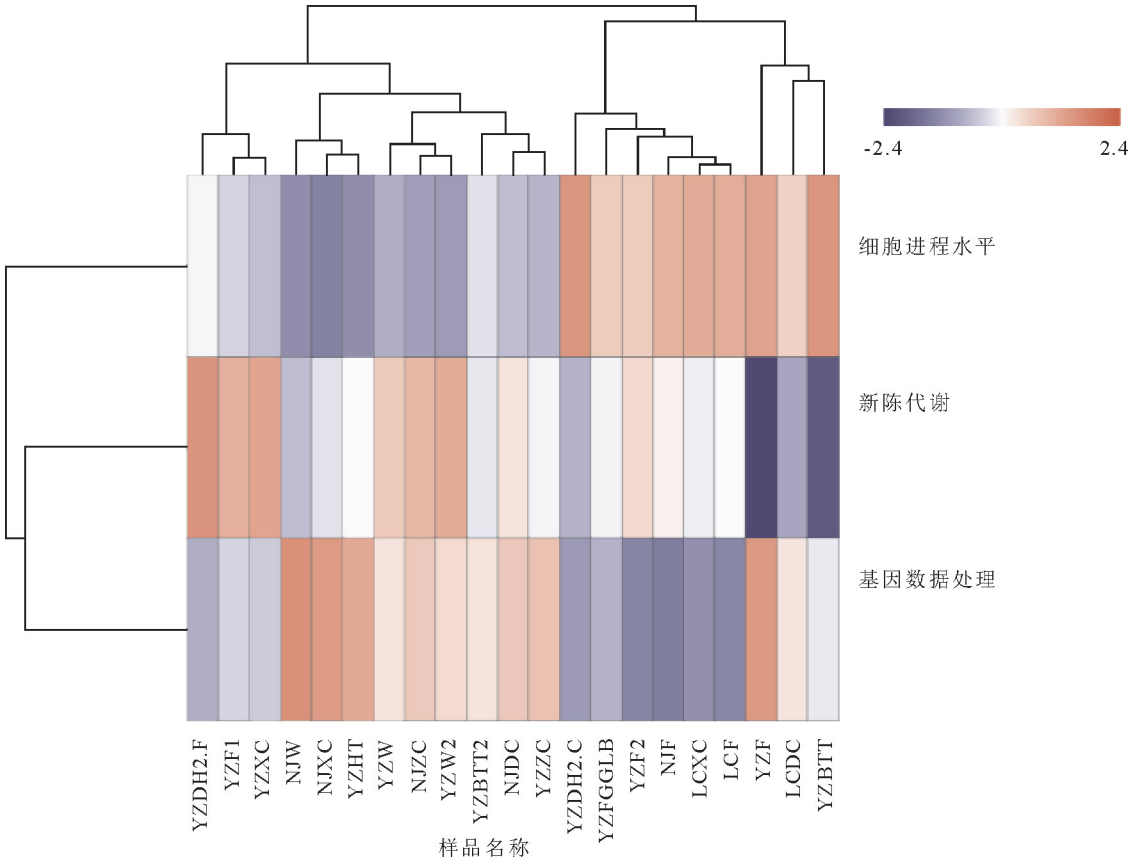


图 6 KEGG 通路聚类功能分析(L1)

Fig. 6 KEGG pathway clustering function analysis (L1)

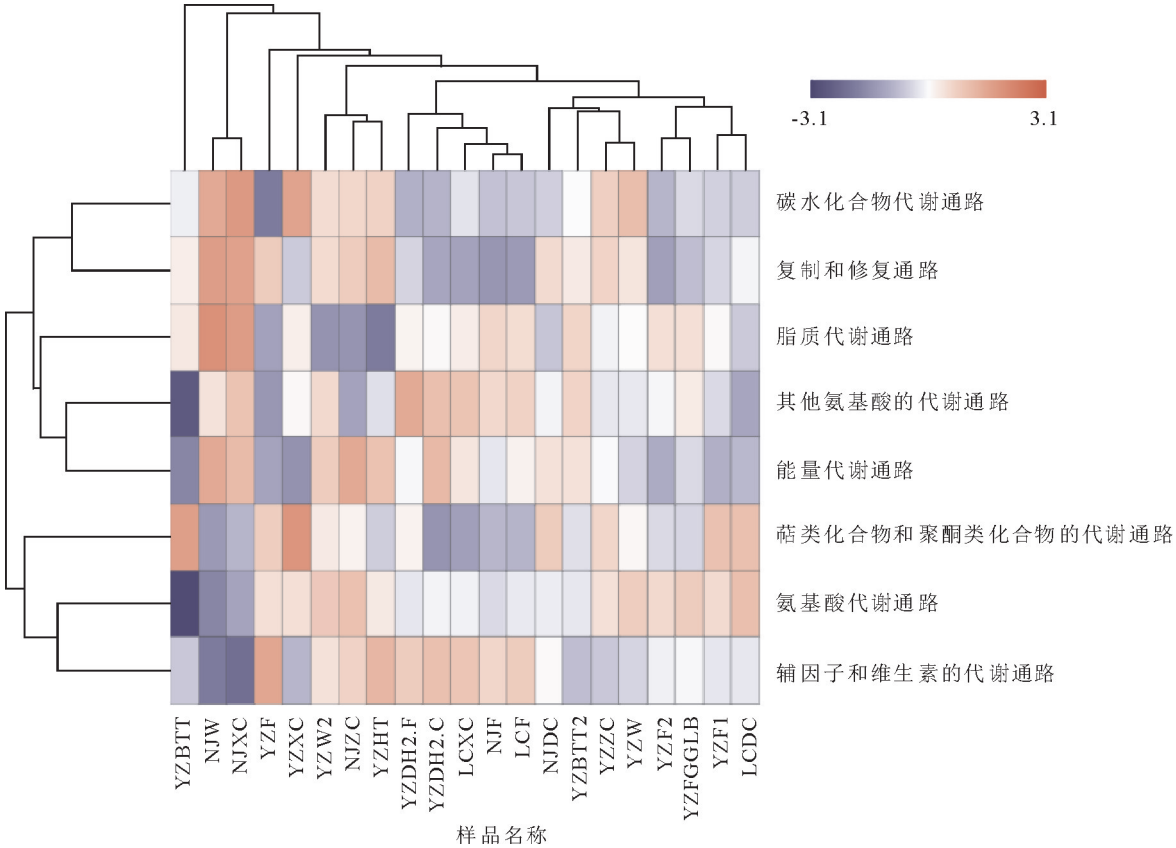


图 7 KEGG 通路聚类功能分析(L2)

Fig. 7 KEGG pathway clustering function analysis (L2)

基酸代谢(amino acid metabolism)、辅因子和维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)差异最明显。

3 讨 论

3.1 三地野猪肠道微生物组成

该研究中,厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)及柔壁菌门(Tenericutes)在三个地区的野猪肠道微生物群中占据了主导地位,其数量居各菌门之首。首先,在三地野猪的肠道微生物构成中,以厚壁菌门(Firmicutes)与拟杆菌门(Bacteroidetes)作为主导菌群,这一发现与先前研究者对野猪肠道微生物多样性的探究结论相吻合^[11]厚壁菌门(Firmicutes)具备将食物中的纤维素分解并转化为挥发性脂肪酸的能力,而拟杆菌门(Bacteroidetes)则对宿主消化系统中的粗纤维进行分解,同时肩负着分解有害物质的重要代谢功能^[12-13],因此,这两种卓越的肠道微生物群落能显著促进野猪对高纤维素植物的有效消化、营养物质的充分吸收,以及所需能量的获取,在猪肠道微生物多样性中扮演着不可或缺的角色^[14-17]。再者,本项研究观察到在3个不同地区的野猪肠道微生物群中普遍存在一种占比较高的细菌门——变形菌门(Proteobacteria)。此细菌门为细菌域中规模最为庞大的分类群,囊括了众多关键的细菌种类。变形菌门的成员形态各异,且均属于革兰氏阴性菌,此门类中还涵盖了许多具备固氮功能的细菌,它们能够进行氮素的固定,进而通过调节肠道内氮素营养的状况,对大肠菌群的代谢过程及群落组成产生深远影响。

3.2 野猪肠道微生物群落的丰富度

本研究发现,怒江、德宏及临沧三地的野猪肠道微生物种群丰富性均显著,特别是德宏地区野猪的肠道微生物标志性物种多样性超过了其他两地。这三个区域的野猪肠道微生物组成与多样性各不相同,德宏野猪群生活区更加靠近人类居住区,摄入人类种植农作物更多,食谱更为多样,所以肠道菌群更为丰富。三个地区生物多样性的不同研究结果指出,生存环境和食物资源的差异是决定野猪消化道微生物种群结构的关键因素。另外,各野猪个体之间消化道微生物种群亦展现出独特性,这种差异或许与它们的基因特性、生命周期阶段、性别等生物学属性密切相关。

3.3 肠道微生物与野猪健康

毛螺菌科(Lachnospiraceae)是厚壁菌门下的一

个科,包含多个属,它们在哺乳动物的肠道中含量丰富。那些隶属于厚壁菌门的微生物,在处理各类碳水化合物方面扮演着重要角色,特别是在分解水果与蔬菜中含有的果胶这一复杂的膳食纤维及益生元上表现出较强的能力,它们发酵产生乙酸和丁酸,为野猪提供能量的主要来源,由此可得野猪的食谱多为水果蔬菜根茎果实类,此菌种肠道中的作用不仅限于能量代谢,还包括对肠道健康和免疫功能的促进与野猪的健康状态有着密切的联系。由此菌种含量可推断宿主的消化道健康情况以及细菌感染情况。

在部分野猪样品中发现变形菌门(Proteobacteria),在细菌分类中占据重要地位的一大类群,其中包含了不少知名的致病菌种,例如大肠杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌和幽门螺杆菌等。若此类菌种在宿主体内过度繁殖,则可能引起肠道不适,从而对肠道健康造成威胁^[18]。

三地样品中均发现 *Pseudoalteromonas daceae*,该细菌具有抗菌和抗病毒特性的不寻常溴化化合物,因其多样的代谢能力而能够适应不同的生态环境,它们拥有产生抗生素的能力,这或许能成为判断野猪肠道健康的标准之一。

研究野猪消化系统内微生物所产生的代谢物质,对这些生物维持其健康状况、生理机能及代谢平衡起到了至关重要的作用。鉴于此,深入研究肠道微生物的种群构成对于野猪的科学管控及采取生物方法预防其造成损害显得尤为重要,并具有极高的参考与实际应用价值。

由于野生猪对人类居住区域造成的损害严重并且具备较高的攻击性,这导致本项研究所需的样本收集工作极具挑战,样本量也因此受限。另外,针对野猪消化系统内微生物群落的探究目前尚处于初级阶段,且缺乏完善的检测技术。检测手段的多样性亦可能导致对微生物类别的判定出现差异。鉴于此,我们必须继续深入探索,以科学的方法全面了解野生猪肠道微生物群落的构成、作用及其多样性,从而为野生猪的生物控制技术打下坚实的理论基础。

参考文献:

[1] 赵宇卓,吴 尽,杨天雄,等. 基于宏基因组学的野生动物肠道微生物研究进展[J]. 野生动物学报,2021,42(2):568-574.
ZHAO Y ZH, WU J, YANG T X, et al. Advances in research on wildlife intestinal microbes based on metagenomics[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(2):568-574.

[2] 负航,胡闭月,王健,等. 3 种粪便标本保存方法对肠道菌群检测结果影响的比较研究[J]. 微生物学杂志,2020,40(3):74-80.
YUN H, HU B Y, WANG J, et al. Comparison of three methods of stool samples preservation affecting detection results of enteric microbial population[J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(3):74-80.

[3] 甄军爱,杨亚昕,朱轶强,等. 基于粪便组学的野生哺乳动物肠道微生态研究进展[J]. 野生动物学报,2022,43(3):836-844.
ZHEN J A, YANG Y X, ZHU Y Q, et al. Advances on intestinal microecology based upon omics analyses of feces samples in wild mammals[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2022, 43(3):836-844.

[4] 王鑫,李才武,晋蕾,等. 不同地区圈养大熊猫肠道细菌菌群多样性及组成[J]. 应用与环境生物学报,2021,27(5):1 218-1 225.
WANG X, LI C W, JIN L, et al. Diversity and community structure of gut microbiomes of captive giant pandas in different regions[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2021, 27(5):1 218-1 225.

[5] 史倍宁,赵耀,林子涵,等. 圈养梅花鹿肠道菌群组成的性别差异[J]. 野生动物学报,2023,44(2):330-338.
SHI B N, ZHAO Y, LIN Z H, et al. Gender differences in intestinal microbiota composition of captive Sika Deer[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2023, 44(2):330-338.

[6] SAWASWONG V, PRAIANANTATHAVORN K, CHANCHAE P, et al. Comparative analysis of oral-gut microbiota between captive and wild long-tailed macaque in Thailand [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):14 280.

[7] MA Y, MA S, CHANG L, et al. Gut microbiota adaptation to high altitude in indigenous animals[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 516(1):120-126.

[8] 杨雄威. 华南野猪(*Sus scrofa chirodontus*)的食性和肠道微生物多样性初步研究[D]. 贵阳:贵州大学,2021.

[9] 陈飞,汤永晶,赵明旭,等. 亚洲象肠道微生物的研究进展[J]. 林业建设,2021(4):49-52.
CHEN F, TANG Y J, ZHAO M X, et al. Research progress on intestinal microorganism of Asian elephant[J]. Forestry Construction, 2021(4):49-52.

[10] DU L, CHEN Q R, LIU P P, et al. Phosphorus removal performance and biological dephosphorization process in treating reclaimed water by Integrated Vertical-flow Constructed Wetlands(IVCWs)[J]. Bioresource Technology, 2017, 243:204-211.

[11] 杨雄威,彭彩淳,郭群毅,等. 贵州苗岭地区野猪肠道菌群结构与功能分析[J]. 兽类学报,2021,41(4):365-376.
YANG X W, PENG C CH, GUO Q Y, et al. Diversity and functional characteristics of intestinal microflora of free-living wild boars in the Miaoling Mountain area in Guizhou Province, China[J]. Acta Theriologica Sinica, 2021, 41(4):365-376.

[12] 陈惠瑜,苏跃青,张海涛,等. 规定饮食条件下不同性别和年龄恒河猴的肠道菌群差异探讨[J]. 中国微生态学杂志,2023,35(1):37-44.
CHEN H Y, SU Y Q, ZHANG H T, et al. Sex and age-specific changes of gut microbiota in Rhesus with prescribed diet[J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(1):37-44.

[13] 赵贵军,竭航,朱吉彬,等. 圈养不同性别林麝粪便菌群多样性研究[J]. 西南农业学报,2019,32(7):1 652-1 658.
ZHAO G J, JIE H, ZHU J B, et al. Study on fecal bacterial microbiota of captive musk Deer in different gender[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(7):1 652-1 658.

[14] KEADY M M, PRADO N, LIM H C, et al. Clinical health issues, reproductive hormones, and metabolic hormones associated with gut microbiome structure in African and Asian elephants[J]. Animal Microbiome, 2021, 3(1):85.

[15] ZHANG C B, XU B, LU T, et al. Metagenomic analysis of the fecal microbiomes of wild Asian elephants reveals microflora and enzymes that mainly digest hemicellulose[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(8):1 255-1 265.

[16] LI G D, JIANG Y, LI Q Y, et al. Comparative and functional analyses of fecal microbiome in Asian elephants[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2022, 115(9):1 187-1 202.

[17] FENG X, HUA R, ZHANG W Y, et al. Comparison of the gut microbiome and resistome in captive African and Asian elephants on the same diet[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2023, 10:986 382.

[18] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(9):496-503.