

研究报告

太行鸡源贝莱斯芽孢杆菌的益生特性及全基因组分析

任廷亿^{#1}, 刘永相^{#1}, 张永英¹, 冯硕¹, 高鹤¹, 刘佳宁¹, 肖子悦¹, 马腾壑¹, 闫兆阳^{*1,2}

1 河北工程大学 生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056038

2 河北工程大学 河北省禽病技术创新中心, 河北 邯郸 056038

任廷亿, 刘永相, 张永英, 冯硕, 高鹤, 刘佳宁, 肖子悦, 马腾壑, 闫兆阳. 太行鸡源贝莱斯芽孢杆菌的益生特性及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1697-1709.

REN Tingyi, LIU Yongxiang, ZHANG Yongying, FENG Shuo, GAO He, LIU Jianing, XIAO Ziyue, MA Tenghe, YAN Zhaoyang. Probiotic properties and whole genome information of *Bacillus velezensis* from Taihang chicken[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1697-1709.

摘要:【背景】芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是家禽益生菌制剂的重要来源, 因其具有较强的抑菌活性和抗逆性, 近年来备受关注。【目的】筛选出具有潜在益生活性的太行鸡源芽孢杆菌, 为家禽益生菌制剂提供候选菌株。【方法】采集健康太行鸡的新鲜粪便样品, 通过芽孢杆菌选择培养基分离、16S rRNA 基因测序及全基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析鉴定芽孢杆菌种属, 通过双层琼脂平板法研究其对指示菌的抑菌活性; 利用其在不同条件下孵育后的存活率研究其耐受性; 通过肉汤稀释法测定其对抗菌药物的敏感性, 利用多种生物信息学工具和数据库对全基因组进行注释和比对, 分析其菌株安全性及潜在抗菌活性的次级代谢产物合成情况。

【结果】分离鉴定了 5 株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 双层琼脂平板法显示 5 株芽孢杆菌可抑制多种病原菌的生长, 在恶劣条件孵育后仍具有较高的存活率, 对 12 种测试的抗菌药物敏感且未携带可移动耐药基因和毒力基因。最后, 通过 antiSMASH 预测到 5 株贝莱斯芽孢杆菌存在 16–20 个与次级代谢产物合成相关的基因簇, 并与广谱抑菌活性的芬茛素和表面活性素等合成基因簇高度相似。【结论】本研究获得的 5 株贝莱斯芽孢杆菌具有广谱抑菌活性和体外安全性, 可作为家禽益生芽孢杆菌制剂的潜在候选菌株。

关键词: 太行鸡; 贝莱斯芽孢杆菌; 抑菌活性; 次级代谢产物

资助项目: 邯郸市科学技术研究与发展计划(21112012046); 河北省现代农业产业技术体系建设专项资金(HBCT2024270202)
This work was supported by the Handan Science and Technology Research and Development Program (21112012046) and the Earmarked Fund for Agriculture Research System of Hebei Province (HBCT2024270202).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: yanzhaoyang@hebeu.edu.cn

Received: 2024-07-22; Accepted: 2024-09-24; Published online: 2024-10-30

Probiotic properties and whole genome information of *Bacillus velezensis* from Taihang chicken

REN Tingyi^{#1}, LIU Yongxiang^{#1}, ZHANG Yongying¹, FENG Shuo¹, GAO He¹, LIU Jianing¹,
XIAO Ziyue¹, MA Tenghe¹, YAN Zhaoyang^{*1,2}

1 School of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei, China

2 Hebei Province Engineering Research Center of Poultry Diseases, Hebei University of Engineering,
Handan 056038, Hebei, China

Abstract: [Background] *Bacillus* spp. are important sources of probiotic preparations for poultry. Recently, *Bacillus* spp. have attracted much attention because of their inhibitory activities against pathogens and survivability under stress. [Objective] To screen *Bacillus* with probiotic properties from Taihang chicken, providing potential candidates for developing probiotic preparations in poultry. [Methods] Fresh feces samples were collected from healthy Taihang chickens. *Bacillus* strains were isolated with the selection medium and identified by 16S rRNA gene sequencing and core single nucleotide polymorphism (SNP) analysis of the whole genome. The inhibitory activities of the strains against indicator pathogens were tested by the double-layer agar plate method. The tolerance of the strains was evaluated based on the survival rates after incubation at different conditions. The broth dilution method was employed to examine the antimicrobial susceptibility of the strains. Furthermore, bioinformatics tools and databases were used for sequence alignment and annotation of the genomes, and the safety of the strain and the synthesis of secondary metabolites associated with probiotic profiles were analyzed. [Results] Five strains of *Bacillus velezensis* were identified, and they inhibited the growth of pathogens. Additionally, the isolates posed high survival rates after incubation at harsh conditions. They were sensitive to 12 tested antimicrobial agents and did not carry mobile resistance genes or virulence genes. Finally, 16–20 biosynthetic gene clusters related to secondary metabolite synthesis were identified in the five strains by antiSMASH, which showed high similarity to the biosynthetic gene clusters of fengycin and surfactin with broad-spectrum antimicrobial properties. [Conclusion] We obtained five *B. velezensis* strains with broad-spectrum antimicrobial properties and safety *in vitro*, which served as candidates for developing *Bacillus*-based probiotic preparations used for poultry.

Keywords: Taihang chicken; *Bacillus velezensis*; antimicrobial activity; secondary metabolites

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)作为畜禽益生菌制剂的重要来源, 具有独特的生存能力和对极端环境的耐受性, 并可产生多种抗菌活性物质^[1]。近年来, 不同来源芽孢杆菌的代谢产物在拮抗病原微生物方面的作用越发凸显^[2]。例如, Tian等^[3]从海洋沉积物中分离出来的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TY-1 产生多种脂肽类和聚酮

类代谢产物对茄科罗尔斯通氏菌(*Ralstonia solanacearum*)有很强的拮抗活性。Afrin 等^[4]从土壤中分离的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)可分泌一种抗菌蛋白, 从而能够抑制多重耐药深红沙雷氏菌(*Serratia rubidaea*)的生长。Palacios-Rodriguez 等^[5]发现解淀粉芽孢杆菌 BS4 可产生抗氧化、非溶血的抗菌代谢

物, 从而对多种革兰氏阴性病原菌具有一定的抗菌活性。Pedretti 等^[6]发现暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) CPAY1 的培养物上清液对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)等均表现出显著的抗菌活性。由此可见, 芽孢杆菌可产生各种类型的抗菌活性物质抑制病原菌的生长。

当前, 多重耐药菌在家禽中广泛流行, 使得禽用抗菌药物效力明显降低^[7-8], 而鸡源益生芽孢杆菌制剂的使用或能缓解这一问题。太行鸡是河北省著名的地方品种, 因其耐粗饲、抗病性强等特性, 广泛散养于太行山及其附近地区^[9], 可作为益生芽孢杆菌筛选的对象。本研究分离太行鸡源芽孢杆菌, 并通过全基因组分析揭示其潜在的益生机制, 以期为家禽用芽孢杆菌制剂提供候选菌株。

1 材料与方法

1.1 样品

指示菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enterica*) ATCC 13076 及蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC 11778, 美国模式菌种保藏中心。10 份新鲜粪便样品, 邯郸地区农户散养多年的健康太行鸡。

1.2 培养基

胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth, TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptone soy agar, TSA)及 Mueller-Hinton 肉汤(Mueller-Hinton broth, MHB)培养基, Oxoid 公司; 5%羊血琼脂和芽孢杆菌选择培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

氨苄西林(ampicillin)、头孢噻肟(cefotaxime)、

链霉素(streptomycin)、庆大霉素(gentamicin)、阿米卡星(amikacin)、四环素(tetracycline)、红霉素(erythromycin)、氟苯尼考(florfenicol)、林可霉素(lincomycin)、泰妙菌素(tiamulin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、利奈唑胺(linezolid)、利福平(rifampicin)和万古霉素(vancomycin), 上海麦克林生化科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 革兰氏染色试剂盒、磷酸盐缓冲液(PBS)、芽孢染色试剂盒和胆盐, 北京索莱宝科技有限公司。光学显微镜, 尼康公司; 多功能酶标仪, 帝肯公司; 麦氏比浊仪, 梅里埃公司; 常规 PCR 仪, 耶拿公司。

1.4 芽孢杆菌的分离鉴定

1.4.1 菌株的分离

用酒精灯外焰灼烧粪便表面数秒后, 每份样品取 0.5 g 溶于含 800 μ L 无菌 PBS 的 1.5 mL 离心管中, 于 80 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后接种至芽孢杆菌选择培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。待培养完成后挑取黄色单菌落, 接种于 800 μ L TSB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 8 h。吸取 400 μ L 菌液置于 200 μ L 60%甘油中, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 芽孢杆菌的形态观察

将芽孢杆菌选择培养基筛选得到的疑似芽孢杆菌接种在 TSA 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 刮取适量菌体进行涂片固定。参考革兰氏染色和芽孢染色试剂盒的说明书进行细菌染色, 置于油镜下观察芽孢杆菌繁殖体和芽孢形态。

1.4.3 溶血性试验

蘸取 1 μ L 菌液在 5%羊血琼脂培养基上划线, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。观察并记录芽孢杆菌在 5%羊血琼脂培养基上的溶血情况。

1.4.4 16S rRNA 基因鉴定

参考细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取芽孢杆菌基因组 DNA。以芽孢杆菌基因

组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系和反应条件参考北京康润诚业科技有限公司的常规 PCR *Taq* Mix 说明书。取少量 PCR 产物进行 1%琼脂糖电泳, 将含有目的片段的 PCR 产物委托北京博迈德基因技术有限公司进行测序, 将组装好的序列上传至 BLAST 在线软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对, 鉴定其种属。

1.4.5 全基因组测序及进化分析

构建二代测序的基因组 DNA 文库, 通过 DNBSEQ-T7 平台进行双端短读长测序。利用 SPAdes v3.15.2 软件对全基因组的 clean data 进行从头组装(de novo assembly), 根据菌株的种属信息在 NCBI 上查找并下载同种菌株的基因组序列文件, 利用 kSNP v4.1 (<https://github.com/kissake/kSNP4>)构建核心单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)系统发育树。

1.5 体外抑菌活性的测定

取 5 μ L 培养过夜的分离菌液置于 TSA 培养基中心位置, 待菌液晾干后, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。将活化好的指示菌液调整至 0.5 麦氏浊度(约 10^8 CFU/mL), 按照 1:100 的比例稀释于低于 50 $^{\circ}$ C 的 TSA 培养基中, 充分混匀后, 倾倒入适量于含有培养了 24 h 分离菌株的 TSA 培养基中。待琼脂凝固后, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h, 测量抑菌圈直径。每株菌进行 3 次重复。

1.6 芽孢杆菌生物学特性的测定

1.6.1 生长曲线的测定

将培养好的菌液调整为 0.5 麦氏浊度(约 10^8 CFU/mL), 按 1%接种量接种至 TSB 培养基中, 取 200 μ L 菌液加入 96 孔细胞培养板中。每株菌进行 3 个重复, 使用多功能酶标仪测定菌液 600 nm 处的吸光度, 连续测定 24 h。

1.6.2 耐受性的测定

刮取适量 TSA 培养基上培养 24 h 的菌株至灭菌生理盐水中, 并调整为 0.5 麦氏浊度的菌悬液。按照 1:10 的比例稀释至含不同 pH (pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0)和不同浓度胆盐(0.3%和 0.6%)的生理盐水中, 并以相同浓度菌液稀释于未经处理的生理盐水中作为对照组, 分别在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。此外, 以 1:10 比例稀释的菌液分别在 40、50 和 60 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 来检测芽孢杆菌对温度的耐受情况。待孵育完成后, 使用无菌生理盐水稀释至合适的稀释度, 在 TSA 培养基上进行涂布计数。整个实验重复 3 次。芽孢杆菌存活率(%)=(处理组活菌数/对照组活菌数) $\times$ 100。

1.7 药物敏感性的测定

采用美国临床和实验室标准协会^[10]和欧盟药敏委员会试验标准^[11]推荐的微量肉汤稀释法进行菌株的药物敏感性测定。测试药物包括氨苄西林、头孢噻肟、链霉素、庆大霉素、阿米卡星、四环素、红霉素、氟苯尼考、林可霉素、泰妙菌素、环丙沙星、利奈唑胺、利福平和万古霉素, 以金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 作为质控菌株。抗菌药物的测试范围和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 质控范围见表 1, 药敏结果的判定参照文献[10-11]。

1.8 全基因组分析

将组装好的全基因组序列上传至 ResFinder v4.5.0 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) 和 Comprehensive antibiotic resistance database (CARD)数据库(<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) 筛查可移动耐药性相关基因, 上传至 Virulence factor database (VFDB)数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)筛查菌株的毒力基因。在 antiSMASH v6.0.1 在线软件(<https://antismash.secondarymetabolites.org>) 和 RAST 在线软件(<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)中提交芽孢杆菌全基因组序列, 进行菌株的次级代谢产物生物合成基因簇的预测和注释。

表 1 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 质控范围及抗菌药物的测定范围

Table 1 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 quality control (QC) ranges and antimicrobial test ranges

Antibacterial agents	Test ranges (μg/mL)	MIC (μg/mL)
Ampicillin	0.125–64.000	0.500–2.000
Cefotaxime	0.250–128.000	1.000–4.000
Streptomycin	0.060–64.000	0.125–1.000
Gentamicin	0.060–64.000	0.125–1.000
Amikacin	0.250–64.000	1.000–4.000
Tetracycline	0.060–64.000	0.125–1.000
Erythromycin	0.060–32.000	0.250–1.000
Florfenicol	0.500–64.000	2.000–16.000
Lincomycin	0.030–64.000	0.060–0.250
Tiamulin	0.250–64.000	0.500–2.000
Ciprofloxacin	0.060–64.000	0.125–0.500
Linezolid	0.250–64.000	1.000–4.000
Rifampicin	0.002–32.000	0.004–0.016
Vancomycin	0.125–64.000	0.500–2.000

1.9 数据统计及可视化

数据均采用 GraphPad Prism v9.5.0 进行可视化, 结果以 mean±SD 表示。芽孢杆菌系统进化树采用 iTOL v6 在线软件(<https://itol.embl.de/>)

进行可视化, 以贝莱斯芽孢杆菌 UTB96 全基因组序列为参考, 利用 BRIG v0.9.5 软件绘制全基因组图谱, 利用 Easyfig v2.2.5 软件对次级代谢产物生物合成基因簇进行可视化。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌的分离鉴定结果

经过高温处理和芽孢染色选择培养基筛选, 从太行鸡粪便样品中初步分离和纯化到 125 株疑似芽孢杆菌菌株。通过革兰氏染色可知均为革兰氏阳性菌株, 并且存在大量短小钝圆或椭圆蓝色菌体(疑似芽孢, 图 1A)。芽孢染色发现, 菌体呈红色, 芽孢呈绿色(图 1B)。由此可见, 经分离和纯化后的疑似芽孢杆菌均为可产芽孢的菌株。溶血性试验结果表明, 菌株 HUE210、HUE211、HUE214、HUE217 和 HUE219 在 5% 羊血琼脂培养基上表现为不溶血(图 1C)。16S rRNA 基因检测显示 5 株分离菌的电泳条带均扩增到 1 500 bp 左右(图 1D), 将 16S rRNA 基因序列上传至 BLAST 进行比对分析, 与枯草芽

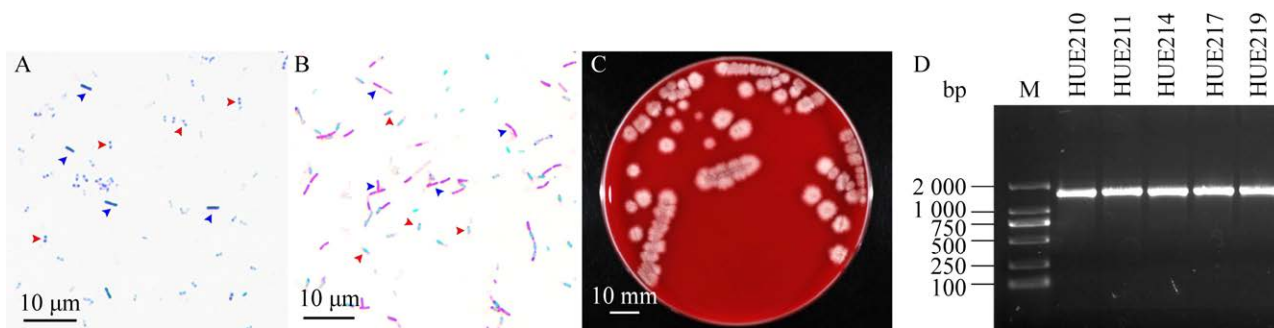


图 1 芽孢杆菌的分离与鉴定 A: 革兰氏染色(蓝色箭头指示菌体, 红色箭头指示疑似芽孢), 比例尺为 10 μm。B: 芽孢染色(蓝色箭头指示菌体, 红色箭头指示芽孢), 比例尺为 10 μm。C: 5%羊血琼脂培养基测定芽孢杆菌的溶血性试验, 比例尺为 10 mm。D: 1%凝胶电泳图, M: DNA marker。

Figure 1 Isolation and identification of *Bacillus*. A: Gram staining, blue arrows indicate cells, red arrows indicate spores. Scale bar=10 μm. B: Spore staining, blue arrows indicate cells, red arrows indicate spores. Scale bar=10 μm. C: Hemolysis test of 5% sheep blood plate to determine *Bacillus*. Scale bar=10 mm. D: 1% gel electrophoresis, M: DNA marker.

孢杆菌亚群(*Bacillus subtilis sensu lato* group)高度相似。基于基因组核心 SNP 构建 5 株芽孢杆菌的系统发育树, 结果显示 5 株芽孢杆菌与贝莱斯芽孢杆菌亲缘关系最近(图 2)。

2.2 抑菌活性测定结果

采用双层琼脂平板抑菌试验测定 5 株贝莱斯芽孢杆菌对指示菌的抑菌活性, 结果如图 3

所示, 5 株贝莱斯芽孢杆菌对大肠杆菌 ATCC 25922、肠炎沙门氏菌 ATCC 13076、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 和蜡样芽孢杆菌 ATCC 11778 均表现出一定的抑菌活性。

2.3 生物学特性测定结果

如图 4 所示, 5 株贝莱斯芽孢杆菌呈现出相同的生长趋势, 在 0–3 h 处于生长迟缓期;

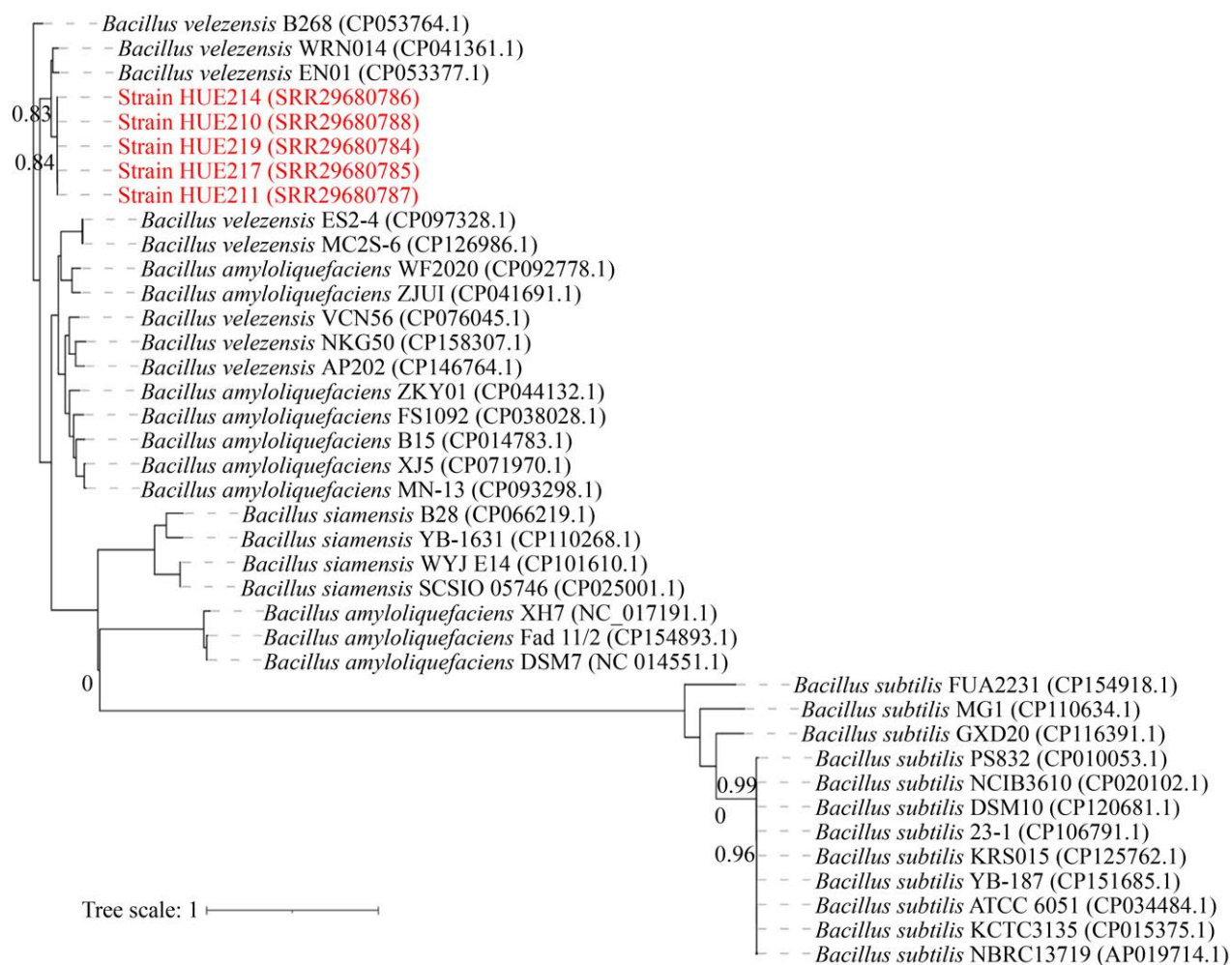


图 2 基于基因组核心 SNP 构建分离菌株的系统发育树 括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号; 分支上数字表示最大似然的自展值, 分支上未标数字表示最大似然的自展值为 1; 比例尺显示碱基替换数。

Figure 2 Phylogenetic tree of the isolated strains constructed based on core SNP of whole genome. Numbers in brackets indicate GenBank accession number of each strain; The number on the branch indicates the bootstrap value of the maximum likelihood, unlabeled number on the branch indicates that the bootstrap value of the maximum likelihood is 1; The scale bar represents the number of substitutions per nucleotide position.

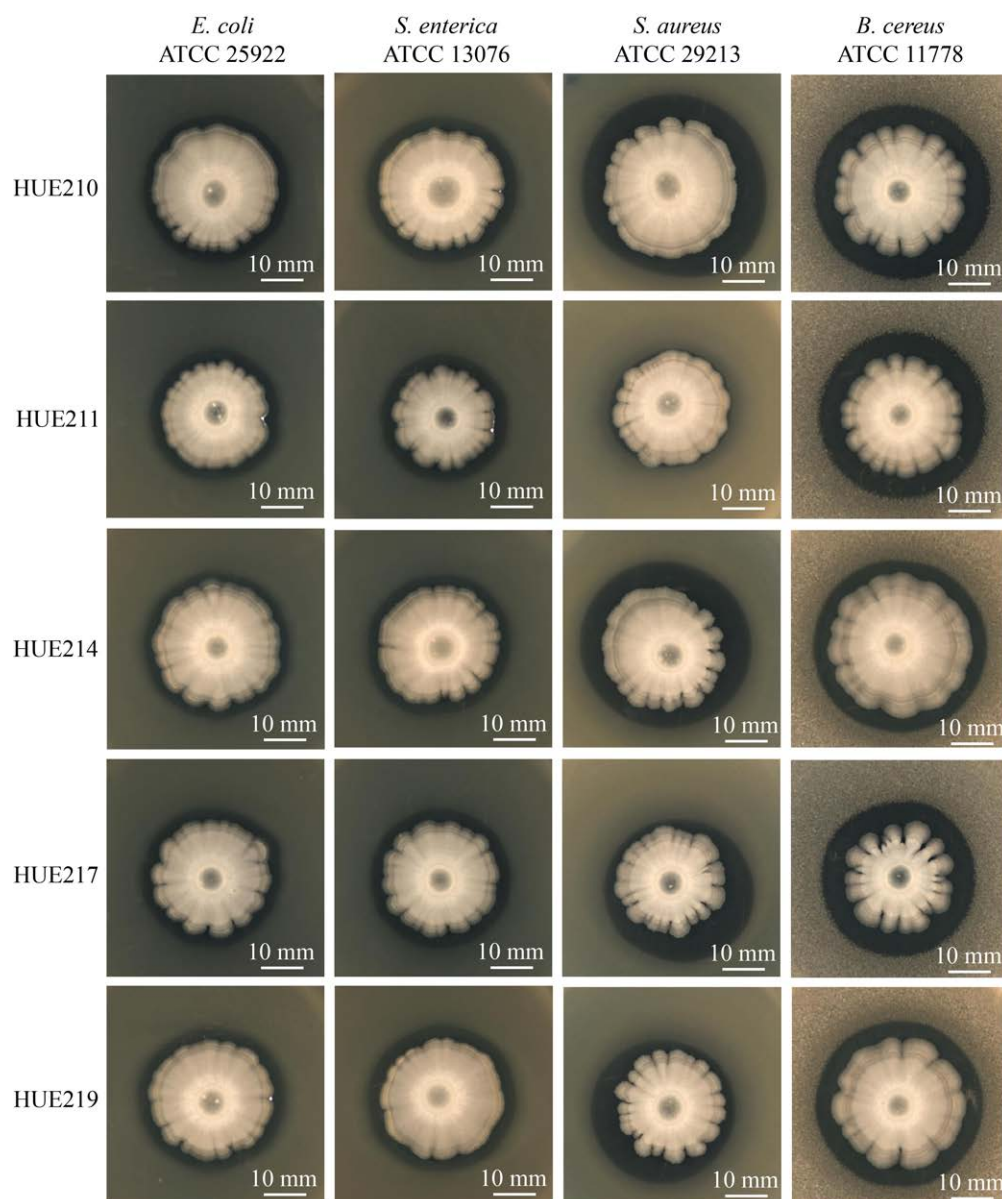


图3 双层琼脂平板法测定贝莱斯芽孢杆菌对病原菌的抑菌活性 底层为贝莱斯芽孢杆菌，上层为测定的病原菌，比例尺为10 mm。

Figure 3 Antimicrobial activity of *Bacillus velezensis* against pathogens by double-layer agar assay. *B. velezensis* cultured in bottom-layer agar, pathogens cultured in upper-layer agar. Scale bar=1 cm.

4–16 h 迅速增殖，处于对数生长期；17–24 h 菌体密度逐渐趋于稳定，进入稳定期。

不同 pH、胆盐浓度和温度的孵育影响 5 株芽孢杆菌的存活情况，但仍具有较高的存活率(图 5)。在 pH 2.0 孵育后的存活率为

55.61%–75.98%，在 0.6%胆盐浓度孵育后的存活率为 34.16%–49.04%，经过 60 °C 孵育后的存活率为 55.29%–100.70%。以上的结果表明，5 株芽孢杆菌具有较好的耐酸、耐胆盐和耐高温特性。

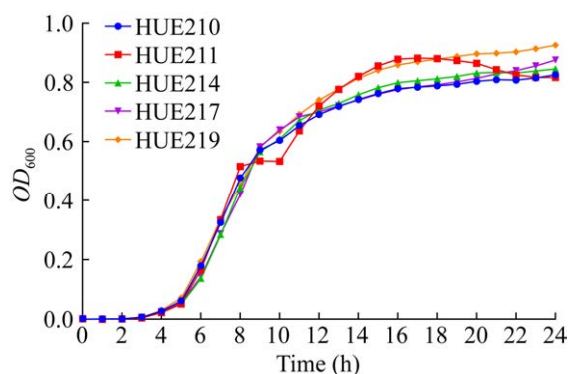


图4 贝莱斯芽孢杆菌的生长曲线

Figure 4 Growth curve of *Bacillus velezensis*.

2.4 菌株药物敏感性

采用 14 种抗菌药物进行药物敏感性试验,结果显示 5 株菌对四环素、氨苄西林和头孢噻肟等 12 种抗菌药物均敏感,对林可霉素和泰妙菌素均耐药(表 2)。

2.5 全基因组分析结果

如图 6 所示,对二代测序结果进行组装和注释后绘制全基因组图谱,5 株贝莱斯芽孢杆菌具有基本相似的基因组骨架。通过 ResFinder 数据库、CARD 数据库和 VFDB 数据库筛查发

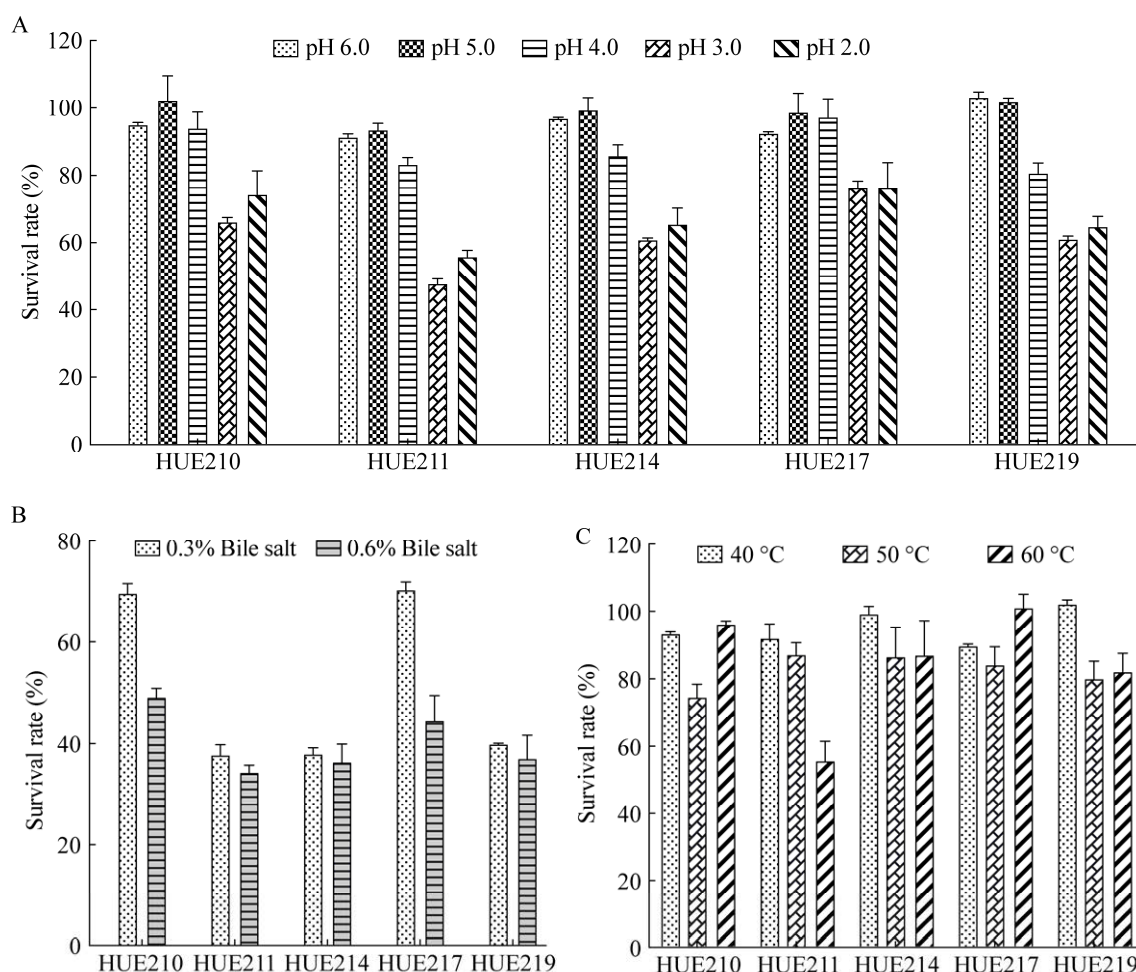


图5 贝莱斯芽孢杆菌在不同条件孵育后的存活率 A: pH; B: 胆盐; C: 温度。

Figure 5 Survival rates of *Bacillus velezensis* after incubation in several situations. A: pH; B: Bile salt; C: Temperature.

表 2 14 种抗菌药物对 5 株菌株的最小抑菌浓度

Table 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) of 14 antibacterial drugs against 5 strains

Antibacterial agents	MIC (μg/mL)					Susceptibility
	Strain HUE210	Strain HUE211	Strain HUE214	Strain HUE217	Strain HUE219	
Ampicillin	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	S
Cefotaxime	1	2	1	1	1	S
Streptomycin	2	1	4	2	2	S
Gentamicin	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	S
Amikacin	0.25	<0.12	0.50	0.50	0.50	S
Tetracycline	4	4	4	4	4	S
Erythromycin	<0.06	<0.06	<0.06	0.12	0.12	S
Florfenicol	1	1	1	1	1	S
Lincomycin	32	32	16	16	16	R
Tiamulin	128	128	256	128	128	R
Ciprofloxacin	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	S
Linezolid	1	1	1	0.50	0.50	S
Rifampicin	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	S
Vancomycin	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	S

S 表示敏感；R 表示耐药。

Susceptible is expressed as S, resistance is expressed as R.

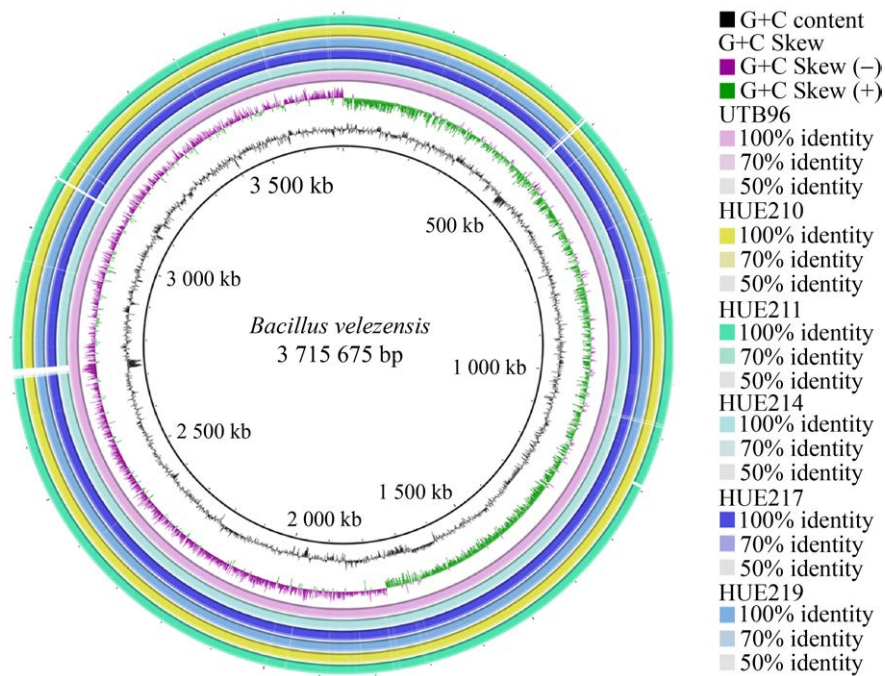


图 6 贝莱斯芽孢杆菌的全基因组圈图 由内到外分别是基因组序列位置坐标、G+C 含量、G+C skew 值和基因组(菌株 UTB96、HUE214、HUE217、HUE219、HUE210 和 HUE211)。

Figure 6 Whole genome map of *B. velezensis*. Images from the inside to the outside are genomic sequence position coordinates, G+C content, G+C skew values, and genomes of *B. velezensis* UTB96, *B. velezensis* HUE214, *B. velezensis* HUE217, *B. velezensis* HUE219, *B. velezensis* HUE210 and *B. velezensis* HUE211.

现, 5 株芽孢杆菌均未携带可移动耐药基因和毒力基因。

2.6 次级代谢产物合成基因簇分析

通过 antiSMASH 在线预测分析, 在 5 株菌株基因组中分别检测到 16–20 个次级代谢产物合成相关的基因簇, 包括以非核糖体途径合成的芬芥素(fengycin)、表面活性素(surfactin)、杆菌巴汀(bacillibactin)等; 以聚酮途径合成的大环内酰亚胺 H (macrolactin H)、多烯类化合物杆菌烯(bacillaene)及地非西丁(difficidin)等。如图 7 和图 8 所示, 5 株芽孢杆菌 bacilysin、bacillaene、macrolactin H 和 bacillibactin 的预测合成基因簇与已知基因簇的相似性均为 100%, fengycin 预测合成基因簇与已知基因簇的相似性均 $\geq 80\%$ 。另外, HUE217 中 surfactin 和 HUE210 中 difficidin 的预测合成基因簇与已知基因簇的相似性分别为 82% 和 100%。

3 讨论

贝莱斯芽孢杆菌作为芽孢杆菌属的一个新种出现在大众视野中, 越来越多的研究表明贝莱斯芽孢杆菌可抑制病原菌、提高宿主免疫力、促进动植物生长性能^[12-13]。当用作生物防治剂时, 助力植物抵抗病虫害的侵扰^[13]。作为抗生素替代品能显著提高畜禽的饲料转化率, 改善免疫机能, 并抑制病原菌定殖。例如, La 等^[14]的研究发现在日粮添加贝莱斯芽孢杆菌 CML532 可促进 AA 肉鸡的生长, 改善肠道吸收功能, 减少回肠中产气荚膜梭菌的定殖。贝莱斯芽孢杆菌具有广谱的抑菌活性。例如, Cui 等^[15]的研究发现环境源贝莱斯芽孢杆菌 CAU277 的上清液对大肠杆菌、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)和蜡样芽孢杆菌均有较好的抑菌效果。本研究获得 5 株鸡源贝莱斯芽孢杆菌同样表现出对大肠杆菌、肠炎沙门氏

菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌有一定的抑菌活性。

畜禽口服的益生菌需首先评估其进入宿主肠道能力。在模拟的胃酸和胆盐孵育下, 5 株贝莱斯芽孢杆菌均具有良好的耐受性。另外, 菌株自身携带的毒力基因或可移动耐药基因带来潜在的安全性问题, 不适宜用作益生菌。Cui 等^[16]对市售芽孢杆菌制剂进行安全性评估, 发现芽孢杆菌制剂中有近 50% 携带毒力基因, 且存在多种可移动耐药基因。本研究获得的 5 株贝莱斯芽孢杆菌除对林可霉素和泰妙菌素耐药外, 对 12 种抗菌药物均敏感。然而全基因组序列中未发现林可霉素和泰妙菌素对应的可移动耐药基因, 由此推测对林可霉素和泰妙菌素耐药是由 ATP 转运蛋白介导的固有耐药^[17]。

益生芽孢杆菌拮抗病原菌与其产生的代谢产物(酶、抗菌肽或蛋白)密切相关^[18]。Piewngam 等^[19]的研究发现枯草芽孢杆菌产生的芬芥素可阻断金黄色葡萄球菌群体感应, 抑制金黄色葡萄球菌在宿主体内的定殖。Liu 等^[20]从土壤源枯草芽孢杆菌 CAU21 中获得一种新型的代谢产物 bacaucin, 对包含金黄色葡萄球菌、粪肠球菌等革兰氏阳性菌有较强的抑制作用, 基于 bacaucin 改造后的产物 bacaucin-1 能够特异地抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。目前, 越来越多的研究表明贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等枯草芽孢杆菌亚群具有多样化的代谢产物合成基因簇, 这也可作为抗菌药物的开发提供重要的来源^[18,21]。通过 antiSMASH 在线预测分析发现 5 株贝莱斯芽孢杆菌存在 16–20 个与次级代谢产物合成相关的基因簇, 通过比对发现与具有抗菌活性的表面活性素和芬芥素等的合成基因簇高度相似, 推测 5 株贝莱斯芽孢杆菌可产生抗菌活性的产物抑制病原菌的生长。

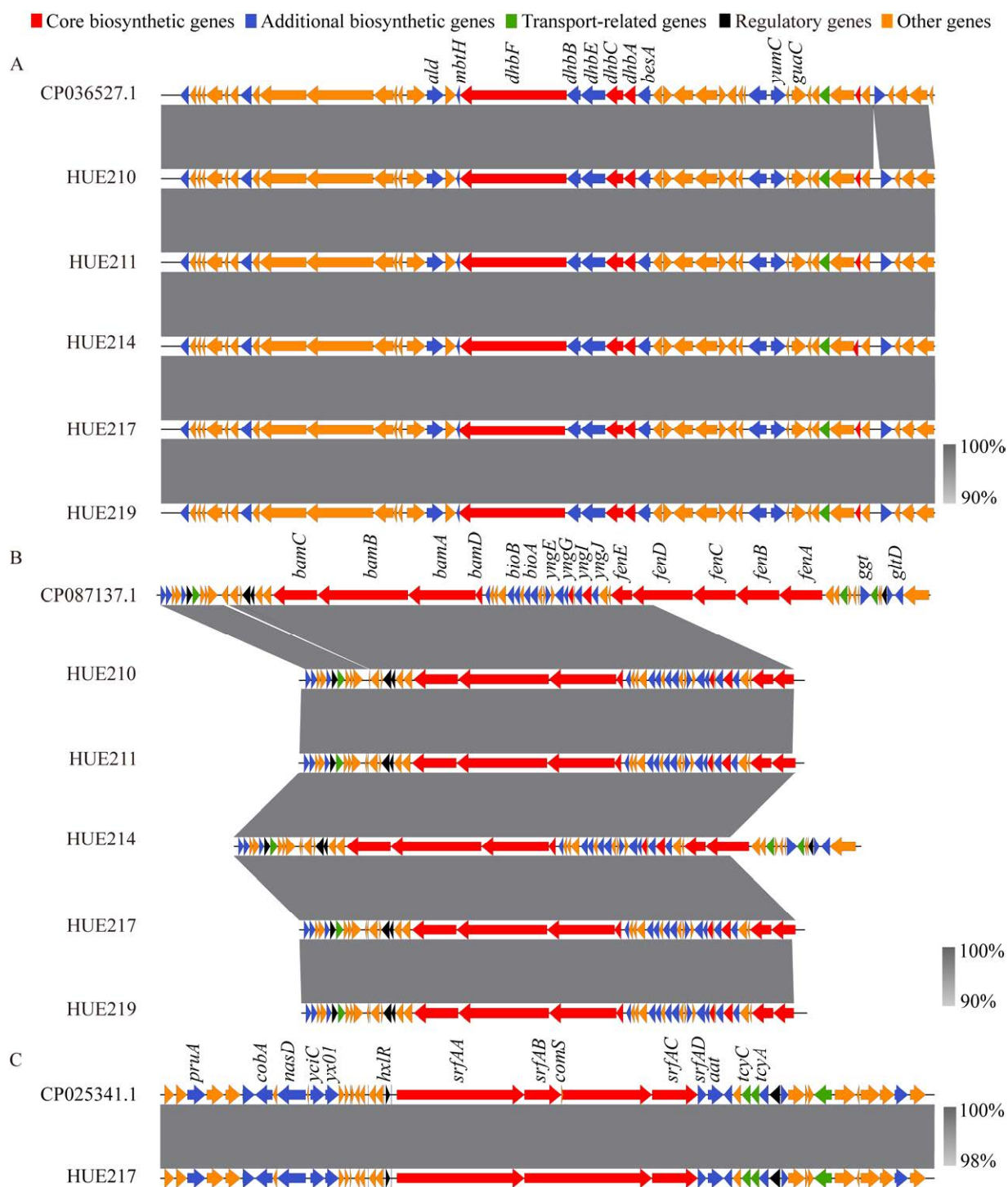


图 7 贝莱斯芽孢杆菌中非核糖体合成类型产物的生物合成基因簇 A: 杆菌巴汀的生物合成基因簇; B: 芬芥素的生物合成基因簇; C: 表面活性素的生物合成基因簇。

Figure 7 Products in biosynthetic gene clusters of non-ribosomal peptides synthesis in *B. velezensis*. A: Biosynthetic gene clusters of bacillibactin; B: Biosynthetic gene clusters of fengycin; C: Biosynthetic gene clusters of surfactin.

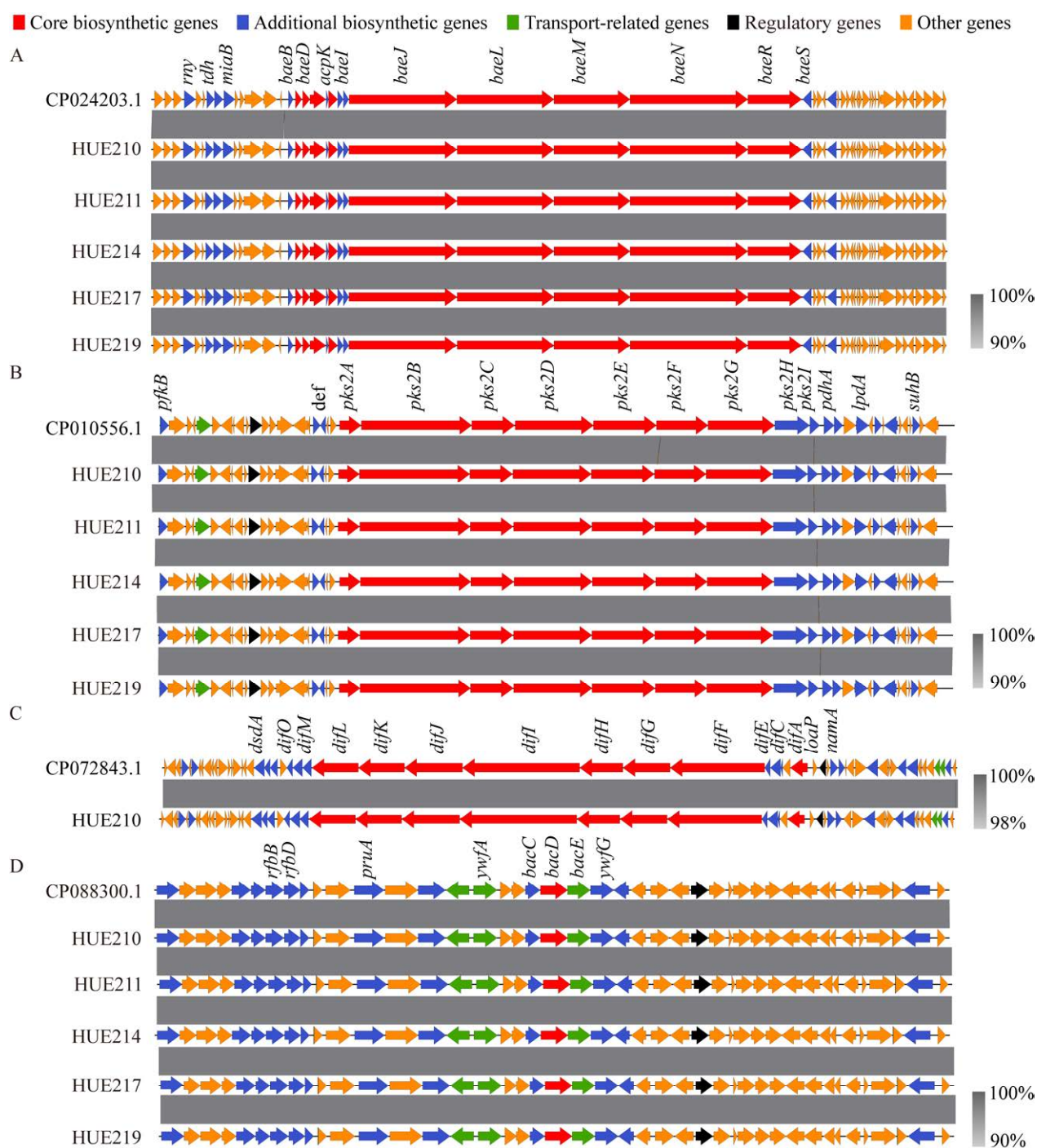


图8 贝莱斯芽孢杆菌中聚酮类产物的生物合成基因簇 A: 杆菌烯类 bacillaene 的生物合成基因簇; B: 大环内酰胺 H 的生物合成基因簇; C: 地非西丁的生物合成基因簇; D: 芽孢杆菌溶素的生物合成基因簇。

Figure 8 Products in biosynthetic gene clusters of polyketide synthase synthesis in *B. velezensis*. A: Biosynthetic gene clusters of bacillaene; B: Biosynthetic gene clusters of macrolactin H; C: Biosynthetic gene clusters of difficidin; D: Biosynthetic gene clusters of bacilysin.

4 结论

本研究从邯郸地区健康太行鸡的新鲜粪便中分离获得 5 株具有广谱抑菌活性且较强耐受性的贝莱斯芽孢杆菌。全基因组测序分析显示 5 株贝莱斯芽孢杆菌均不携带可移动耐药基因和毒力基因, 并存在多种抑菌活性物质的生物合成基因簇。由此可知, 这 5 株太行鸡源贝莱斯芽孢杆菌均可作为替抗益生菌制剂的候选菌株。

REFERENCES

- [1] LU S, NA K, LI YR, ZHANG L, FANG Y, GUO XH. *Bacillus*-derived probiotics: metabolites and mechanisms involved in bacteria-host interactions[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(6): 1701-1714.
- [2] ZHU JJ, CHEN YS, IMRE K, ARSLAN-ACAROS D, ISTANBULLUGIL FR, FANG YW, ROS G, ZHU K, ACAROS U. Mechanisms of probiotic *Bacillus* against enteric bacterial infections[J]. One Health Advances, 2023, 1(1): 21.
- [3] TIAN Y, JI SH, ZHANG ER, CHEN YQ, XU GX, CHEN X, FAN JQ, TANG XX. Complete genome analysis of *Bacillus subtilis* TY-1 reveals its biocontrol potential against tobacco bacterial wilt[J]. Marine Genomics, 2023, 68: 101018.
- [4] AFRIN S, BHUIYAN MNI. Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea*[J]. Current Research in Microbial Sciences, 2023, 5: 100206.
- [5] PALACIOS-RODRIGUEZ AP, ESPINOZA-CULUPÚ A, DURÁN Y, SÁNCHEZ-ROJAS T. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BS4 against gram-negative pathogenic bacteria[J]. Antibiotics, 2024, 13(4): 304.
- [6] PEDRETTI N, ISEPPI R, CONDÒ C, SPAGGIARI L, MESSI P, PERICOLINI E, Di CERBO A, ARDIZZONI A, SABIA C. Cell-free supernatant from a strain of *Bacillus siamensis* isolated from the skin showed a broad spectrum of antimicrobial activity[J]. Microorganisms, 2024, 12(4): 718.
- [7] MORROW CJ. Antimicrobial resistance (AMR): an important one health issue for layer and meat poultry industries worldwide[J]. Poultry Science, 2024, 103(7): 103690.
- [8] YASSIN AK, GONG JS, KELLY P, LU GW, GUARDABASSI L, WEI LJ, HAN XG, QIU HX, PRICE S, CHENG DR, WANG CM. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185326.
- [9] YUE QX, CHEN H, XU YJ, HUANG CX, XI JZ, ZHOU RY, XU LJ, WANG H, CHEN Y. Effect of housing system and age on products and bone properties of Taihang chickens[J]. Poultry Science, 2020, 99(3): 1341-1348.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 30th ed, CLSI supplement M100[S]. CLSI, Wayne, PA, USA, 2020.
- [11] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters[S]. EUCAST, Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>.
- [12] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [13] RABBEE MF, ALI MS, CHOI J, HWANG BS, JEONG SC, BAEK KH. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1046.
- [14] LA ALTZ, WEN Q, XIAO YX, HU D, LIU D, GUO YM, HU YF. A new *Bacillus velezensis* strain CML532 improves chicken growth performance and reduces intestinal *Clostridium perfringens* colonization[J]. Microorganisms, 2024, 12(4): 771.
- [15] CUI YF, ZHU JJ, LI PX, GUO FF, YANG B, SU X, ZHOU HZ, ZHU K, XU FZ. Assessment of probiotic *Bacillus velezensis* supplementation to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in chickens[J]. Poultry Science, 2024, 103(8): 103897.
- [16] CUI YF, WANG SL, DING SY, SHEN JZ, ZHU K. Toxins and mobile antimicrobial resistance genes in *Bacillus* probiotics constitute a potential risk for One Health[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 382: 121266.
- [17] TAKADA H, MANDELL ZF, YAKHNIN H, GLAZYRINA A, CHIBA S, KURATA T, WU KJY, TRESCO BIC, MYERS AG, AKTINSON GC, BABITZKE P, HAURYLIUK V. Expression of *Bacillus subtilis* ABCF antibiotic resistance factor VmlR is regulated by RNA polymerase pausing, transcription attenuation, translation attenuation and (p)ppGpp[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6174-6189.
- [18] PUAN SL, ERRIAH P, BAHARUDIN MMA, YAHAYA NM, KAMIL WNIWA, ALI MSM, AHMAD SA, OSLAN SN, LIM S, SABRI S. Antimicrobial peptides from *Bacillus* spp. and strategies to enhance their yield[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(18): 5569-5593.
- [19] PIEWNGAM P, ZHENG Y, NGUYEN TH, DICKEY SW, JOO HS, VILLARUZ AE, GLOSE KA, FISHER EL, HUNT RL, LI B, CHIOU J, PHARKJAKSU S, KHONGTHONG S, CHEUNG GYC, KIRATISIN P, OTTO M. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference[J]. Nature, 2018, 562(7728): 532-537.
- [20] LIU Y, DING SY, DIETRICH R, MÄRTLBAUER E, ZHU K. A biosurfactant-inspired heptapeptide with improved specificity to kill MRSA[J]. Angewandte Chemie (International Ed), 2017, 56(6): 1486-1490.
- [21] LIU Y, DING SY, SHEN JZ, ZHU K. Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrug-resistant bacteria[J]. Natural Product Reports, 2019, 36: 573-592.