

研究报告

一株瘤胃源产丁酸肠道罗斯拜瑞氏菌的筛选鉴定及培养条件优化

张吉贤¹, 范定坤¹, 杨东², 毕研亮¹, 崔凯¹, 张乃锋^{*1}

1 中国农业科学院饲料研究所 农业农村部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081

2 巴彦淖尔市农牧业科学研究所, 内蒙古 巴彦淖尔 015000

张吉贤, 范定坤, 杨东, 毕研亮, 崔凯, 张乃锋. 一株瘤胃源产丁酸肠道罗斯拜瑞氏菌的筛选鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3187-3201.

ZHANG Jixian, FAN Dingkun, YANG Dong, BI Yanliang, CUI Kai, ZHANG Naifeng. Screening, identification, and culture condition optimization of a rumen-derived butyrate-producing *Roseburia intestinalis* strain[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3187-3201.

摘要: 【背景】产丁酸菌是宿主胃肠道中一类重要的功能微生物群, 其代谢产物能够促进反刍动物胃肠道的健康发育。【目的】分离筛选瘤胃源产丁酸菌株, 明确其益生特性并优化培养条件, 为后续开发利用提供菌种资源和理论基础。【方法】自中国农业科学院昌平试验基地采集成年羊新鲜瘤胃内容物, 先用强化梭菌培养基(reinforced *Clostridium* medium, RCM)初筛, 再以丁酸产量为标准复筛得到产丁酸效果最好的菌株, 分析其生长特性、益生特性, 利用单因素和正交试验对菌株培养条件进行优化。【结果】筛选到一株高效产丁酸的菌株, 经鉴定为肠道罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*), 命名为 *R. intestinalis* F12-9。 *R. intestinalis* F12-9 种子液以 3% 的接种量接入 RCM 培养基, 培养温度 37 °C、初始 pH 6.8, 0–10 h 为对数生长期。 *R. intestinalis* F12-9 在 6.0% NaCl 中的存活率高达(63.88±3.16)%, 菌株在 3.0 g/L 胆盐中的存活率为(200.82±11.19)%, 在模拟胃液(pH 2.5、pH 3.0)以及胰液中的存活率分别为(110.11±9.44)%、(100.18±8.44)%和(175.05±5.20)%。经正交试验优化后, 菌株最佳培养条件为: 接种量 5%、pH 7.0、培养时间 12 h, OD₆₀₀ 为 1.913, 较未优化前提升了 1.34 倍。【结论】瘤胃源 *R. intestinalis* F12-9 为一株新的产丁酸菌株, 其产丁酸能力强, 无溶血, 抗生素耐药性风险低, 耐受性强, 具有良好的开发前景。

关键词: 产丁酸菌; 肠道罗斯拜瑞氏菌; 益生特性; 正交试验

资助项目: 内蒙古自治区“科技兴蒙”行动重点专项(NMKJXM202404-1); 国家重点研发计划(2022YFA1304201, 2024YFD1300200)

This work was supported by the Key Project for Action “Development of Inner Mongolia through Science and Technology” of Inner Mongolia Autonomous Region (NMKJXM202404-1) and the National Key Research and Development Program of China (2022YFA1304201, 2024YFD1300200).

*Corresponding author. E-mail: zhangnaifeng@caas.cn

Received: 2024-10-22; Accepted: 2025-01-02; Published online: 2025-01-23

Screening, identification, and culture condition optimization of a rumen-derived butyrate-producing *Roseburia intestinalis* strain

ZHANG Jixian¹, FAN Dingkun¹, YANG Dong², BI Yanliang¹, CUI Kai¹, ZHANG Naifeng^{*1}

¹ Key Laboratory of Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Feed Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

² Bayannur Institute of Agriculture and Animal Husbandry, Bayannur 015000, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] Butyrate-producing bacteria are an important of functional microorganisms in the host gastrointestinal tract, and their metabolites can promote the healthy development of the gastrointestinal tract of ruminants. [Objective] This study aimed to isolate and screen rumen-derived butyrate-producing strains, clarify their probiotic characteristics and optimize culture conditions, thus providing strain resources and a theoretical basis for subsequent development and application. [Methods] Fresh rumen contents were collected from adult sheep at the Changping Base of Chinese Academy of Agricultural Sciences. The strains with high butyrate production were obtained by primary screening with reinforced *Clostridium* medium (RCM) and secondary screening with butyrate production as the standard. Growth and probiotic characteristics of the strains were analyzed, and the optimal culture conditions were determined by single factor and orthogonal tests. [Results] A strain with high butyrate production was screened and identified as *Roseburia intestinalis*, named *R. intestinalis* F12-9. The seed liquid of *R. intestinalis* F12-9 was inoculated into the RCM at an inoculation amount of 3% and cultured at 37 °C and initial pH 6.8, under which the strain exhibited a logarithmic growth phase within 0–10 h. The survival rate of *R. intestinalis* F12-9 exposed to 6.0% NaCl and 3.0 g/L bile salt were (63.88±3.16)% and (200.82±11.19)%, respectively. The survival rates in simulated gastric juice (pH 2.5, pH 3.0) and pancreatic juice were (110.11±9.44)%, (100.18±8.44)%, and (175.05±5.20)%, respectively. The optimized culture conditions of the strain were as follows: inoculation amount of 5%, pH 7.0, and culture time of 12 h, resulted in an OD_{600} value of 1.913, which was 1.34 times higher than that before optimization. [Conclusion] Rumen-derived *R. intestinalis* F12-9 is a new butyrate-producing strain, with a strong ability to produce butyrate, no hemolysis, a low risk of antibiotic resistance, and strong tolerance, demonstrating its broad development prospects.

Keywords: butyrate-producing bacteria; *Roseburia intestinalis*; probiotic characteristics; orthogonal test

产丁酸菌是宿主胃肠道中一类重要的功能微生物群,它们能够通过发酵碳水化合物产生丁酸。产丁酸菌的菌种主要来自梭菌属(*Clostridium*)、罗斯拜瑞氏菌属(*Roseburia*)、真杆菌属(*Eubacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)以及梭杆菌属(*Fusobacterium*)等^[1-3]。产丁酸菌

不仅能够通过其代谢产物(挥发性脂肪酸)调节肠道菌群平衡^[4-5],维护肠上皮屏障功能^[6],还能够通过菌体本身的营养成分和免疫特性来增强共生菌的竞争优势^[7]、增强肠道免疫力^[8-9]。产丁酸菌作为功能性微生物群和下一代益生菌候选菌群,在促进反刍动物瘤胃发育^[10]、增强机体

免疫力和抗氧化能力^[11]等方面都有重要作用,其具有广阔的应用前景和发展潜力。当前产丁酸菌在反刍动物上的应用以丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)为主。在饲料中添加 *C. butyricum* 能够提高荷斯坦奶牛犊的生长性能^[12]、改善热应激山羊的瘤胃发酵^[13],提高饲料利用率。一方面,*C. butyricum* 能够在瘤胃中产生丁酸并分泌消化酶^[14],从而维持瘤胃内环境稳态有关;另一方面,丁酸梭菌胞外多糖具有清除羟基和超氧自由基的能力^[15],在饲料中添加 *C. butyricum* 可以使断奶羔羊血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性有效提高,从而提高机体抗氧化能力^[16]。其他代表性产丁酸菌种,如拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、霍氏真杆菌(*Eubacterium hallii*)、普拉梭菌(*Fusobacterium prausnitzii*)以及肠道罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*)等^[1-3],虽然早已被发现,但由于其分离筛选培养条件严苛,能够用于实际生产中的菌株鲜少报道。本研究从反刍动物瘤胃中分离筛选产丁酸菌株,并对其耐受性、安全性进行评价,采用正交试验对菌株的培养条件进行优化以提高发酵水平,以期丰富产丁酸菌株资源,并为产丁酸菌株的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 43300 由中国农业科学院饲料研究所宠物营养与食品创新团队保藏。15 mL 瘤胃内容物源自中国农业科学院昌平试验基地 6 只健康状况良好的成年羊。本研究动物实验经中国农业科学院饲料研究所实验动物伦理委员会审批,批准号为 IFR-CAAS-20240901。羊的饲料成分主要为 20% 苜蓿干草、25% 玉米秸秆、45% 玉米及 7.5% 豆粕。打开瘰管盖后,迅速收集瘤胃内容物存于厌氧处理过的厌氧管中, -20 °C 保存返回实验室立

即进行菌株分离。

1.2 主要试剂和仪器

琼脂、刃天青及 NaCl 等,北京索莱宝科技有限公司;细菌、真菌等微生物快速 DNA 制备裂解液,上海朝瑞生物科技有限公司;通用引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;抗菌药物药敏纸片,北京海韵美科技有限公司。

厌氧微耗氧工作站,华粤行仪器有限公司;超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;多功能酶标仪,基因有限公司;油镜,奥林巴斯生物有限公司。

1.3 培养基

菌株筛选与培养使用强化梭菌培养基(reinforced *Clostridium* medium, RCM)^[17],根据需要添加氧指示剂刃天青(1 mg/L)。溶血试验使用哥伦比亚血琼脂培养基^[18]。

1.4 初筛

在厌氧工作站中,取瘤胃内容物样品 2 g,浸泡于 10 mL 无菌厌氧的 PBS 中, 3 000 r/min 涡旋 5 min,重复涡旋 3 次。然后取 100 μ L 瘤胃内容物样品进行浓度梯度稀释(10^{-4} – 10^{-7}),每个浓度梯度 3 个平行,涂布于 RCM 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 48 h 后挑取不同形态特征的菌落进行划线纯化。经过至少 2 次纯化得到初筛菌株。

挑取单菌落于厌氧 RCM 液体培养基中于 37 °C 下静置培养 48 h,利用裂解液提取菌株 DNA。裂解体系(35 μ L):裂解液 30 μ L,菌液 5 μ L。裂解反应体系: 80 °C 20 min; 4 °C 终止反应。用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3')对菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(30 μ L): PCR Master Mix 15 μ L, DNA 模板 6 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.2 μ L, ddH₂O 6.6 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行 16S rRNA 基因序列鉴定。将有效 16S

rRNA 基因序列结果提交至 NCBI 在 GenBank 数据库中进行同源性比对分析,一般比对结果相似度>97%为同种,相似度 95%–97%为同属^[19]。根据鉴定结果筛选出典型的产丁酸菌并使用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。分离菌株进行革兰氏染色,通过油镜观察其形态。

1.5 复筛

挑取筛选出的产丁酸菌株单菌落接入厌氧 RCM 液体培养基中,37 °C 静置培养 12 h 作为种子培养液($OD_{600}=1.0$),将种子液以 3%的接种量接入厌氧 RCM 液体培养基,37 °C 恒温厌氧培养 72 h 送至北京正方兴达科技发展有限公司进行挥发酸测定。根据产酸含量选取一株最优菌株。

1.6 益生特性

1.6.1 生长曲线及丁酸动力学曲线的测定

种子液培养同 1.5,将种子液以 3%的接种量接入厌氧 RCM 液体培养基,37 °C 恒温厌氧培养。0–24 h 每 2 h 取样 1 次,24–36 h 每 6 h 取样 1 次,36–48 h 每 12 h 取样 1 次。测定菌液吸光度(OD_{600})与丁酸含量,丁酸含量测定方法同 1.5。

1.6.2 耐受性试验

NaCl 耐受性试验:将种子液以 3%的接种量接入 NaCl 浓度分别为 1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%的厌氧 RCM 液体培养基中,37 °C 恒温厌氧培养。分别于 0 h 和 12 h 进行平板菌落计数。实验重复 3 次并计算存活率。存活率(%)=最终测得的活菌数/初始测得的活菌数 $\times 100$ ^[20]。

胆盐耐受性试验:将种子液以 3%的接种量接入胆盐质量浓度分别为 0.3、0.5、1.0、1.5、3.0 g/L 的厌氧 RCM 液体培养基中,37 °C 恒温厌氧培养。分别于 0 h 和 10 h 进行平板菌落计数。实验重复 3 次并计算存活率(%)。

胃胰液耐受性试验:配制 pH 2.5、pH 3.0 的模拟胃液和 pH 8.0 的模拟胰液,将种子液以 3%的接种量接入人工胃液和人工胰液中,37 °C

恒温厌氧培养。分别于 0 h 和 5 h 进行平板菌落计数。实验重复 3 次并计算存活率(%)。

1.7 安全性评价

1.7.1 溶血试验

将已活化的阳性对照菌金黄色葡萄球菌与目标菌的单菌落在哥伦比亚血琼脂平板中进行划线,于 37 °C 恒温厌氧培养 48 h 后观察平板中菌落周围有无溶血圈。

1.7.2 药敏试验

采用纸片扩散法测定菌株对万古霉素、多黏菌素 B、四环素、青霉素、氨苄青霉素、头孢唑啉、氯霉素共 7 种常用抗菌药物的敏感性。在厌氧环境下,取活化后 OD_{600} 1.0 的目标菌株菌液 100 μ L,均匀涂布于厌氧 RCM 固体培养基中。将药敏片用无菌镊子贴至固体培养基表面,于 37 °C 恒温厌氧培养 48 h 后,用精确度为 0.02 mm 的游标卡尺测量并记录抑菌圈直径。抗生素的抗性参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)公布的药敏试纸最新标准进行判断^[21]。

1.8 培养条件优化

1.8.1 单因素试验

将种子液分别以 1%、3%、5%、7%、9% 的接种量接入厌氧 RCM 液体培养基中,37 °C 恒温厌氧培养,于 24 h 测定菌液吸光度(OD_{600})。

将种子液以 3%的接种量接入厌氧 RCM 液体培养基中,37 °C 恒温厌氧培养。在 0–24 h 每 2 h 取样 1 次,24–36 h 每 6 h 取样 1 次,36–48 h 每 12 h 取样 1 次,测定菌液吸光度(OD_{600})。

将种子液以 3%的接种量接入 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的厌氧 RCM 液体培养基中,37 °C 恒温厌氧培养,于 10 h 测定菌液吸光度(OD_{600})。

1.8.2 正交试验

以时间、pH、接种量为变异因素,以菌液吸光度(OD_{600})为指示,采用三因素三水平正交试验进行培养条件的优化,从中选出菌株的最佳培养条件。

1.9 统计分析

采用 Excel 2022 对实验数据进行整理, 数据采用 SPSS 27 中单因素方差分析, 结果以平均值±标准差表示, 其中 $P \geq 0.05$ 表示差异不显著, $P < 0.05$ 表示差异显著; 采用 Origin 2022 进行图表制作。

2 结果与分析

2.1 产丁酸菌的分离筛选结果

2.1.1 产丁酸菌的形态和种属鉴定结果

从样品中分离得到 9 株来源于毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 的不同属以及真杆菌属、梭菌属的菌株。9 株菌在厌氧 RCM 固体培养基上生长的形态及革兰氏染色结果见表 1 和图 1。革兰氏染色镜检细胞形态结果显示为球菌和杆菌, 其中革兰氏阳性菌(G^+) 8 株, 分别为菌株 R7、C2、XR8、B1、R1、R2、B2、F12-9; 革兰氏阴性菌(G^-) 1 株, 为菌株 S12。通过 MEGA 11.0 软件绘制 9 株菌株的系统发育树如图 2 所示, 初步将菌株 R7 归类为 *C. beijerinckii*; 菌株 C2 归类为溶纤维真杆菌(*Eubacterium cellulosolvens*); 菌株 XR8 归类为 *C. butyricum*; 菌株 B1、B2 归类为猪解胆盐菌(*Bilifactor porci*)、菌株 R1、R2 归类为瘤胃假丁酸弧菌(*Pseudobutyrvibrio ruminis*); 菌株 F12-9 归类为 *R. intestinalis*; 菌株 S12 归类为糖变互营球菌(*Syntrophococcus sucromutans*)。

2.1.2 产丁酸菌产酸量

表 2 为 9 株产丁酸菌株的产酸结果, 9 株产丁酸菌株的产酸量差别较大。共测定乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、戊酸的含量。其中丙酸、异丁酸、异戊酸和戊酸盐含量低或检测不到而未在表 2 中显示。菌株 XR8、菌株 F12-9 的乙酸产量分别为 (1.99 ± 0.33) g/L、 (1.86 ± 0.08) g/L, 显著高于其他 7 株产丁酸菌株($P < 0.05$)。菌株 F12-9 的丁酸产量显著高于其他 8 株产丁酸菌株($P < 0.05$), 丁酸产量为 (3.29 ± 0.38) g/L。综上, 分离筛选获得一株高产丁酸的菌株 F12-9。

2.2 菌株的益生特性

2.2.1 生长曲线及丁酸动力学曲线的测定结果

如图 3 所示, 菌株 F12-9 在厌氧 RCM 液体培养基中 37 °C 恒温厌氧培养时, 0–10 h 为菌株 F12-9 生长对数期, OD_{600} 最高为 1.48。其平台期较短, 对数生长触顶后死亡率增加, OD_{600} 下降, 菌株 F12-9 进入衰亡期。拟合生长曲线方程为 $OD_{600} = 0.186 + 1.442 \times \exp(0.07 - t/57.711) \times (\operatorname{erf}((2.46 \times t - 1.643)/\sqrt{t})) + 1)/2$, $R^2 = 0.992$ 。产丁酸量在 0–10 h 同样呈对数增长, 之后持续平缓增长。

2.2.2 菌株的耐受性

如图 4 所示, 菌株 F12-9 在 1.0% NaCl 中的存活率高达 $(1201.45 \pm 16.60)\%$, 在 6.0% NaCl 中的存活率高达 $(63.88 \pm 3.16)\%$ 。菌株对 3.0 g/L

表 1 九株产丁酸菌株的基本形态特征

Table 1 Morphological characteristics of nine butyrate-producing bacterial strains

Strain	Gram stain	The distinctive features of microbial colony
R7	G^+	Irregular round, protuberance, edge integrity, translucent, shiny
C2	G^+	Round, edge complete, colorless translucent, glossy
XR8	G^+	Irregular round, convex, white, viscous
B1	G^+	Round, edge complete, flat, colorless translucent, shiny
S12	G^-	Round, edge complete, flat, translucent, shiny
R1	G^+	Round, complete margin, raised, white, glossy
R2	G^+	Round, edge integrity, protrusions, translucent white, shiny
B2	G^+	Round, edge complete, flat, colorless translucent, shiny
F12-9	G^+	Round, neat edges, smooth surface, raised, milky white, sticky

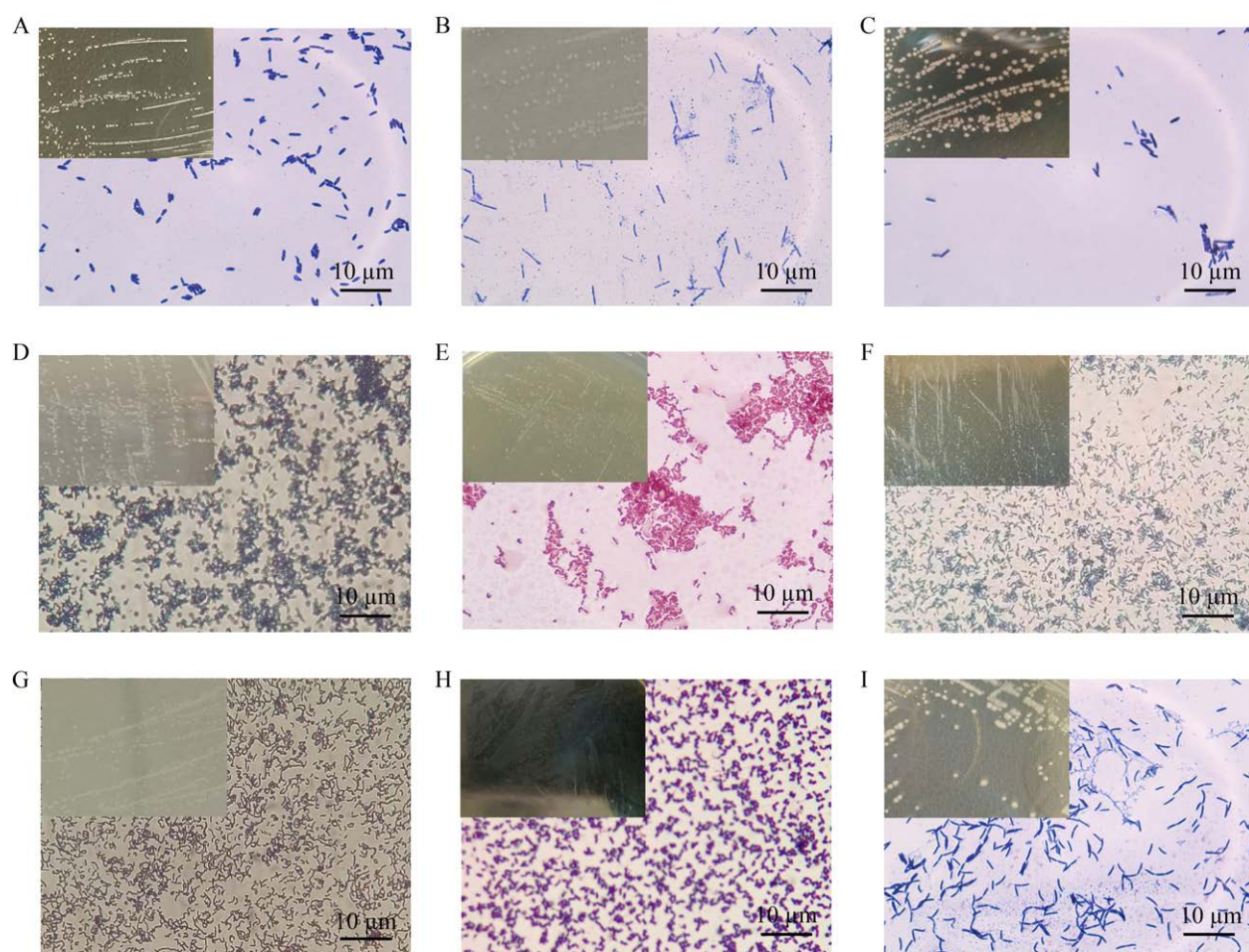


图 1 九株产丁酸菌株的菌落形态和革兰氏染色结果(染色图左上角窗口为菌落形态图) A: 菌株 R7; B: 菌株 C2; C: 菌株 XR8; D: 菌株 B1; E: 菌株 S12; F: 菌株 R1; G: 菌株 R2; H: 菌株 B2; I: 菌株 F12-9。

Figure 1 Colonial morphology and Gram staining results of nine strains of butyrate-producing bacteria. The upper left corner window is the colony morphology map. A: Strain R7; B: Strain C2; C: Strain XR8; D: Strain B1; E: Strain S12; F: Strain R1; G: Strain R2; H: Strain B2; I: Strain F12-9.

的胆盐表现出良好的耐受性(200.82 ± 11.19)%。菌株在模拟胃液(pH 2.5、pH 3.0)和胰液中的存活率分别为(110.11 ± 9.44)%、(100.18 ± 8.44)%和(175.05 ± 5.20)%。

2.3 菌株的安全性评价

2.3.1 溶血试验结果

如图 5 所示,金黄色葡萄球菌菌落周围出现明显的透明溶血圈,结果为阳性;而菌株 F12-9 呈乳白色不规则菌落,周围无溶血圈,结果为阴性,表明菌株 F12-9 对动物的健康无危害。

2.3.2 药敏试验结果

菌株 F12-9 的药敏标准及检测结果分别如表 3 和图 6 所示,选取的抗生素种类包括多肽类的万古霉素、多黏菌素 B;四环素类的四环素;β-内酰胺类的青霉素、氨苄西林、头孢唑啉;氯霉素类的氯霉素。检测依据为美国 CLSI 制定的相关标准。如图 6 药敏试验结果所示,菌株 F12-9 对青霉素中度敏感;对其他各类抗生素产生的抑菌圈直径均敏感,即菌株 F12-9 对 7 种常用抗菌药物均不具有抗性。

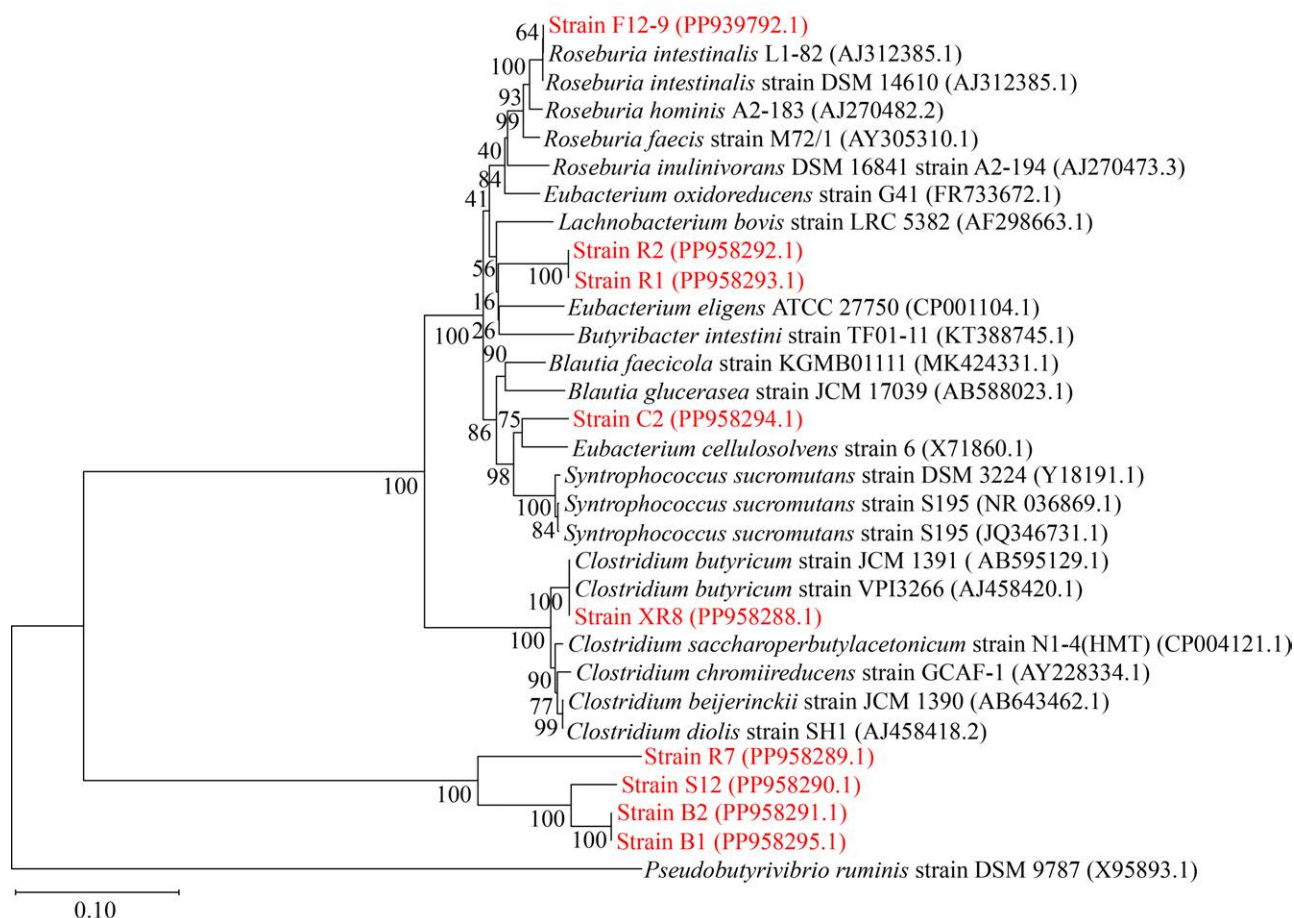


图 2 九株产丁酸菌基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支数是自扩展值；距离尺度数是相对进化长度；括号中的数字为菌株的 GenBank 序列号。

Figure 2 Phylogenetic tree of nine butyrate-producing bacteria based on 16S rRNA gene sequences. Branch numbers are self-expansion values; distance scale numbers are relative evolutionary lengths; The number in parentheses is the GenBank sequence number of the strain.

表 2 九株产丁酸菌株的产酸结果(平均值±标准误, $n=3$)

Table 2 The acid-producing results of nine strains of butyrate-producing bacteria (mean±SE, $n=3$)

Strain	Item		Strain	Item	
	Acetate (g/L)	Butyrate (g/L)		Acetate (g/L)	Butyrate (g/L)
R7	1.57±0.09b	1.52±0.10b	R1	0.09±0.08d	0.06±0.05e
C2	0.74±0.14c	0.53±0.1d	R2	0.08±0.07d	0.06±0.05e
XR8	1.99±0.33a	1.00±0.16c	B2	0.72±0.08c	0.50±0.07d
B1	0.92±0.07c	0.52±0.02d	F12-9	1.86±0.08a	3.29±0.38a
S12	0.85±0.04c	0.34±0.02d			

共检测了 6 个指标, 包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、戊酸; 丙酸盐、异丁酸盐、异戊酸盐和戊酸盐由于其含量低或检测不到而没有在表中出现。不同字母表示不同处理间数值差异显著($P<0.05$)。

A total of six indicators were tested, including acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate, and valerate. However, propionate, isobutyrate, isovalerate, and valerate were not presented in the table due to their low levels or undetectable amounts. Different letters represent significant differences in different treatment at 0.05 level.

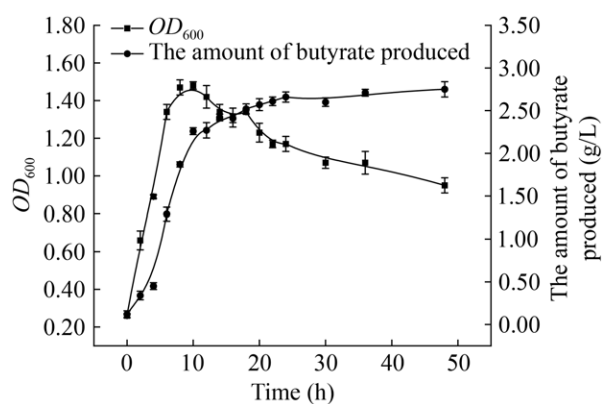


图3 菌株 F12-9 的生长曲线及丁酸动力学曲线
Figure 3 Growth curve and butyrate kinetic curve of strain F12-9.

2.4 菌株培养条件的优化

2.4.1 单因素生长特性

图 7A 为不同接种量对菌株 F12-9 生长的影响。 OD_{600} 随接种量的增加而增加,当接种量为 7% 时, OD_{600} 达到最大值, $OD_{600}=1.42$, 随后下降。图 7B 为不同培养时间对菌株 F12-9 生长的影响。在 2–10 h 时,随着培养时间的延长, OD_{600} 呈上升趋势,到 10 h 时 OD_{600} 达到最大值 1.48。10 h 后菌株进入衰亡期, OD_{600} 开始呈下降趋势,到 48 h 时 OD_{600} 为 0.95。图 7C 为不同 pH 值对菌株 F12-9 生长的影响。当 pH 值为 2.0–5.0 时, OD_{600} 在 0.3 左右。当 pH 7.0 时, OD_{600} 达

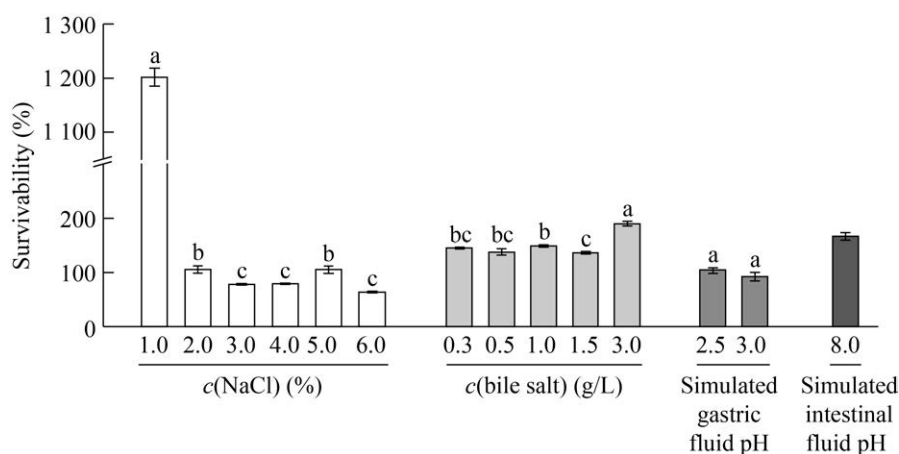


图4 菌株 F12-9 在不同 NaCl 浓度、胆盐浓度、模拟胃液 pH 和模拟胰液 pH 的存活率结果 不同小写字母表示不同处理间数值差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 Survivability of strain F12-9 at different NaCl concentrations, bile salt concentrations, and simulated gastric fluid pH and simulated pancreatic juice pH. Different lowercase letters represent significant differences in different treatment at 0.05 level.

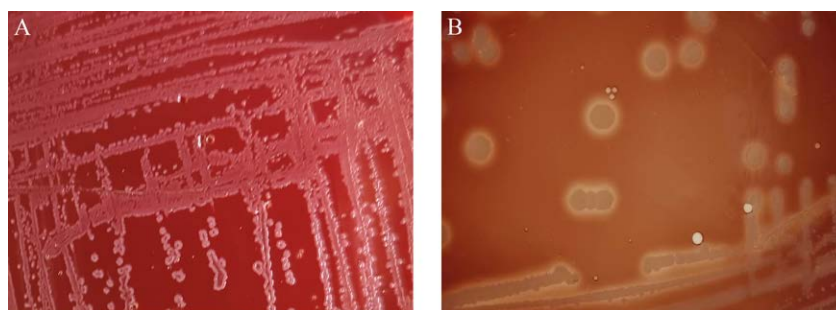


图5 菌株 F12-9 的溶血试验结果 A: 阳性对照菌株(*S. aureus* ATCC 43300); B: 目标菌株 F12-9。

Figure 5 Hemolysis test results of strain F12-9. A: Positive control bacteria (*S. aureus* ATCC 43300); B: Target bacteria (strain F12-9).

表 3 药敏片含药量及耐药性判断标准

Table 3 Drug content of drug sensitive tablets and drug resistance judgment standard

Antibiotic	Drug content ($\mu\text{g/slice}$)	Judgment standard of inhibition zone diameter (mm)		
		R	I	S
Vancomycin	30	—	—	≥ 17
Polymyxin B	30	≤ 8	8–11	≥ 12
Tetracycline	30	≤ 11	12–14	≥ 15
Penicillin	10	—	—	≥ 25
Ampicillin	10	≤ 13	14–16	≥ 17
Cefazolin	30	≤ 14	15–17	≥ 18
Chloramphenicol	30	≤ 12	13–17	≥ 18

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感; —: 判断抑菌圈直径的标准未作规定。

R: Resistant; I: Intermediative resistant; S: Susceptible; —: This criterion for judging the diameter of the inhibition zone was not specified.

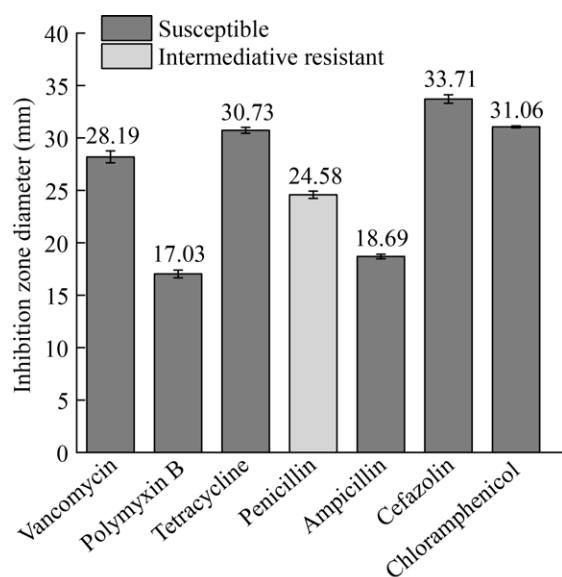


图 6 菌株 F12-9 的抑菌圈直径及抗性结果

Figure 6 The diameter of inhibition zone and resistance results of strain F12-9.

到最大值 1.69。当 $\text{pH} > 8.0$ 时, 菌株 F12-9 的生长受到抑制, OD_{600} 为 0.47。

2.4.2 正交试验结果

基于以上单因素试验结果, 确定了培养条件正交试验的接种量水平为 3%、5%、7%; 时

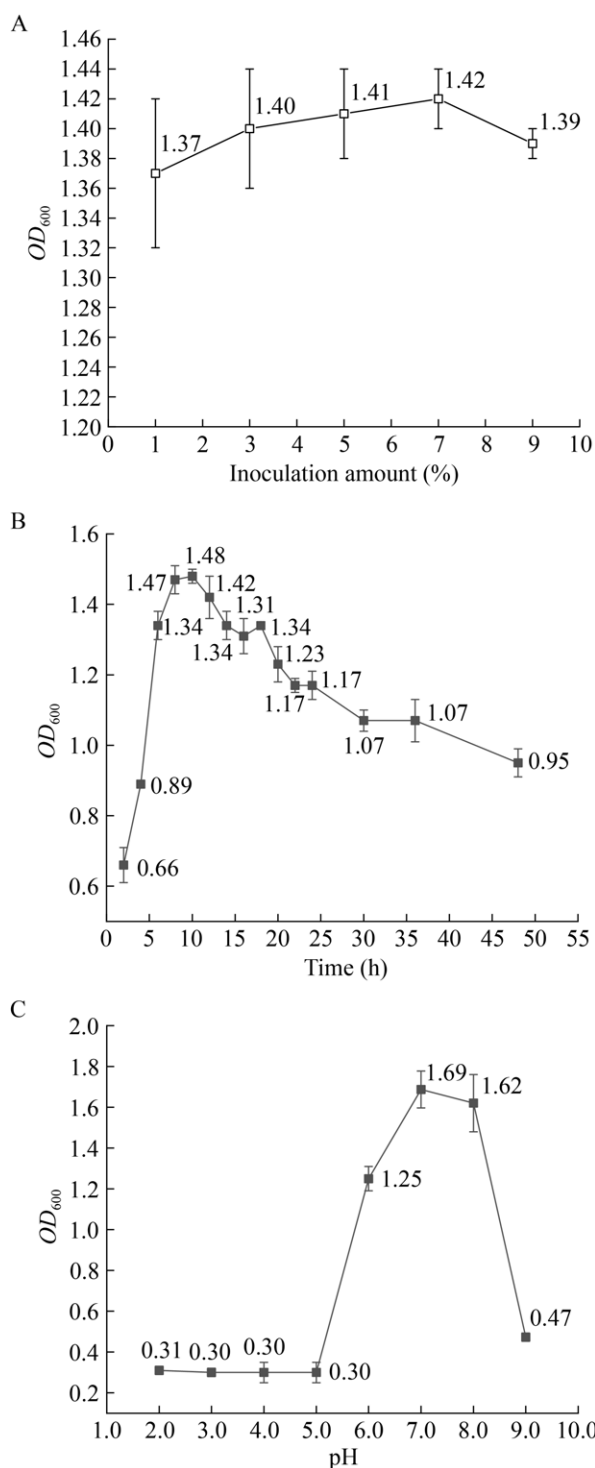


图 7 不同因素对菌株 F12-9 生长的影响 A: 接种量; B: 时间; C: pH。

Figure 7 Effects of different factors on the growth of strain F12-9. A: Inoculation amount; B: Time; C: pH.

间为 8、10、12 h; pH 水平为 6.0、7.0、8.0, 根据表 4 所示, 每个分组设定 3 个重复。

由极差分析法(表 5)可知, 影响菌株 F12-9 生长的主次关系为时间>pH>接种量, 表明时间是影响菌株 F12-9 生长的主要因素。由各因素与试验结果关系图(图 8)确定, 菌株 F12-9 的最优培养条件为接种量 5%、时间 12 h、pH 7.0。方差分析结果(表 6)显示, pH 和时间有极显著影响($P<0.01$), 接种量有显著影响($P<0.05$)。

2.4.3 验证试验结果

根据优化后的配方进行验证试验, 每个试验组 5 个重复, 每个重复 3 个平行。由图 9 可知, 菌株 F12-9 在优化后的培养条件下培养所达到的

表 4 正交试验因素及水平

Table 4 Factors and levels of orthogonal experiment

Level	Factor		
	Inoculation amount (%)	Time (h)	pH
1	3	8	6.0
2	5	10	7.0
3	7	12	8.0

表 5 正交试验结果

Table 5 Results of orthogonal experiment

Group	Inoculation amount	Culture time	pH	OD_{600i1}	OD_{600i2}	OD_{600i3}
1	1	1	1	0.623	0.680	0.734
2	1	2	2	1.356	1.338	1.318
3	1	3	3	1.496	1.501	1.515
4	2	1	2	1.031	1.044	1.057
5	2	2	3	1.371	1.342	1.404
6	2	3	1	1.285	1.304	1.312
7	3	1	3	0.984	1.027	1.010
8	3	2	1	1.210	1.033	1.172
9	3	3	2	1.527	1.496	1.514
k_1	1.173	0.910	1.039			
k_2	1.239	1.283	1.298			
k_3	1.219	1.439	1.294			
R	0.065	0.529	0.259			

k : 各水平因素试验结果之和的平均值; R : 因素的极差值。

k : The mean value of the sum of the test results of the factors at each level; R : The range value of factors.

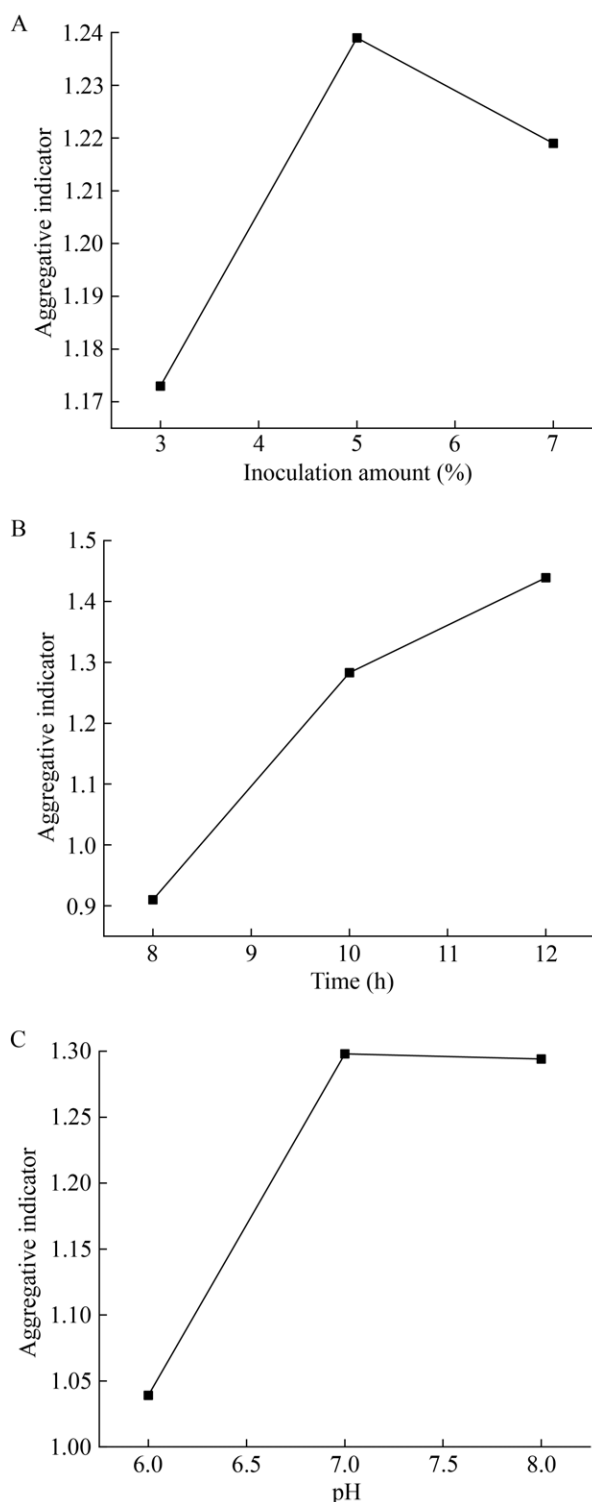


图 8 因素与指标关系的试验结果图 A: 接种量; B: 时间; C: pH。

Figure 8 The relationship between factors and indicators. A: Inoculation amount; B: Time; C: pH.

表 6 正交试验方差分析

Table 6 Variance analysis of orthogonal experiment

Source of variance	Square sum	Degree of freedom	Average of variance	F-value	P-value	Significance level
Inoculation amount	0.020	2	0.010	5.033	0.018	*
Time	1.329	2	0.665	329.559	0.000	**
pH	0.396	2	0.198	98.240	0.000	**
Error	0.036	18	0.002			

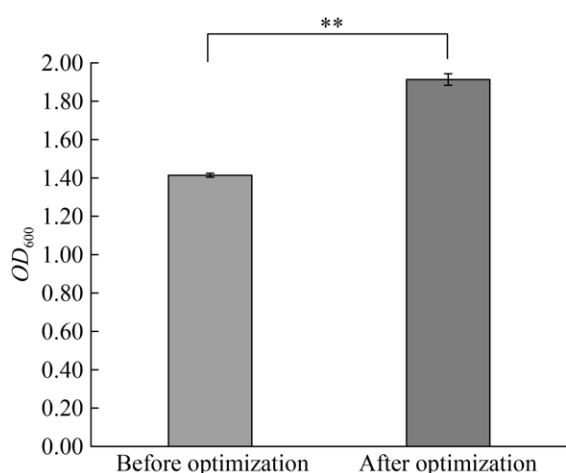
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

图 9 正交试验最优培养条件下菌株 F12-9 的吸光度

Figure 9 The absorbance of strain F12-9 under the optimal culture conditions was determined by orthogonal test. **: $P < 0.01$.

OD₆₀₀ 为 1.913, 较未优化前提升了 1.34 倍, 证明优化后的培养条件可靠。

3 讨论

Roseburia 作为一种重要的产丁酸菌, 存在于反刍动物胃肠道中。在犍牛瘤胃中其相对丰度为 $(0.4 \pm 0.03)\%$ ^[22]。罗斯拜瑞氏菌属包括 *R. intestinalis*、人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia inulinivorans*)、粪便罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia faecis*)、盲肠罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia cecicola*)^[23]。*R. intestinalis* 是厚壁菌门(*Firmicutes*)中的一种专性革兰氏阳性厌氧菌, 轻微弯曲, 杆状, 并通过多个亚末端鞭毛运动^[24]。*R. intestinalis* 作为 *Roseburia* 中的

一个重要菌种, 能够分解不可消化的碳水化合物生成短链脂肪酸, 特别是丁酸^[25]。丁酸是 *R. intestinalis* 与机体相互作用的关键因子^[26], 其可通过底物水平的磷酸化和质子梯度促进肠上皮产生能量^[27]、维持肠道菌群稳定^[28]、调控细胞代谢^[29]以及调节肠道免疫应答^[30-31]。大量研究表明 *R. intestinalis* 在肠道菌群中具有重要的地位和意义, 能够作为潜在的益生菌应用。

不同种属之间的产丁酸菌株在丁酸产量上存在差异。从健康婴儿粪便中分离得到的 *R. intestinalis* L1-952 的丁酸产量为 1.2 g/L^[32]。从仔猪盲肠内容物中筛选得到的 *C. butyricum* ZJU-F1 在 RCM 液体培养基中的丁酸产量为 1.83 g/L^[33]。本研究从反刍动物瘤胃样品中成功分离筛选出菌株 F12-9, 其在厌氧 RCM 液体培养基中的丁酸产量可达到 3.29 g/L, 产丁酸量优于上述研究中的产丁酸菌。本研究发现菌株 F12-9 的生长曲线中几乎无平台期, 当其对数生长触顶后, 生长速率下降, 死亡率增加, 迅速进入衰亡期。这应该与培养基中养分的快速消耗以及菌株本身产生的大量代谢产物有关^[34]。在 0–10 h, 菌株 F12-9 的丁酸动力学曲线与生长曲线增长趋势相同, 呈对数增长, 这与 *C. beijerinckii* R8 的研究结果相似^[35]。菌株 F12-9 在进入衰亡期后, 产丁酸量开始持续平缓增长。在衰亡期, 虽然营养成分减少, 代谢产物增多, 细胞死亡数量持续增加, 但死亡的细胞在溶解或破裂后, 会将内容物泄漏到环境中, 这些营养物质可供菌株生长并产生丁酸^[36]。

益生菌对消化系统的耐受能力是其发挥益

生作用的重要指标^[37-38]。本研究发现,菌株 F12-9 在 1.0% 的 NaCl 中存活率高达 1 201.45%。有研究表明, *R. intestinalis* 基因组存在 2 种活跃的原噬菌体^[39], 原噬菌体的存在被认为对宿主有益^[40], 能够帮助细菌抵抗高渗、耐酸性环境并促进细菌生长^[41-42]。本研究发现, 菌株 F12-9 对 0.3–3.0 g/L 的胆盐均表现出良好的耐受性。张超^[39]研究发现, *R. intestinalis* L1-82 基因组中存在编码胆盐水解酶的基因, 胆盐水解酶在肠道微生物调节宿主体内胆汁酸平衡中至关重要^[43], 其能够通过水解酰胺键、释放类固醇核侧链的甘氨酸/牛磺酸来转化和灭活胆盐^[44]。菌株 F12-9 模拟胃液以及胰液中的存活率均大于 100%。丁长河等^[45]和吴永威等^[46]筛选得到的 *C. butyricum* B-3、*C. butyricum* YX 模拟胃肠道存活率大于 80%, 但小于 100%。相较于 *C. butyricum* B-3 和 *C. butyricum* YX, 菌株 F12-9 对模拟胃胰液的耐受性更高。张超^[39]对 *R. intestinalis* 与长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、普氏栖粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)共 6 种益生菌进行基因组对比分析, 结果表明, *R. intestinalis* 具有较多与胃肠道生存相关的基因, 如维持细胞 pH 稳态的质子泵 ATP 酶^[47]、Na⁺/H⁺反向转运体等。

致病菌在生长过程中能够分泌溶血素使红细胞发生裂解, 所以溶血试验是益生菌安全性的重要指标。另外《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》指出, 益生菌不得参与体内不良的抗生素抗性基因转移级联反应^[48]。因此, 本研究调查了菌株 F12-9 对 7 种抗生素的敏感性: 多黏菌素 B 损伤细胞膜影响通透性; 四环素、氯霉素阻断核糖体蛋白质合成; 万古霉素、青霉素、氨苄西林、头孢唑啉阻断细胞壁合成^[49]。张超^[39]研究发现, *R. intestinalis* 基因组中有 2 个四环素抗性基因。

但在本研究中菌株 F12-9 对四环素敏感。这可能是由于四环素抗性基因表达水平低或基因需要在特定的环境下才能被诱导表达^[50]。菌株 F12-9 无溶血, 抗生素耐药风险低, 表明菌株 F12-9 可以安全应用。

益生菌的生长代谢往往受到接种量、时间、pH 等培养条件的影响, 适宜的培养条件能够显著提高益生菌的活性和扩繁速率^[51]。培养条件的优化方法主要有正交试验、均匀设计、神经网络和响应面法等, 其中最常用的统计优化方法为正交试验。正交试验用于研究多个因素对试验结果的影响, 同时减少所需要的试验次数。本研究通过单因素试验和正交试验, 发现在所选的 3 种因素中, 时间对菌株 F12-9 的影响最大, 适宜的培养时间能够确保菌株 F12-9 充分繁殖并避免进入衰亡期影响其产酸性能^[39]。其次, pH 的作用效果仅次于培养时间, 菌株 F12-9 具有一定的耐酸能力, 但在 pH≤5.0 的酸性环境下能够生长但其耐受性迅速下降。接种量对菌株 F12-9 的影响最小, 接种量决定菌株在发酵过程中生长繁殖的速度, 接种量过大或者过小均会影响其生长。菌株 F12-9 的最优培养条件为接种量 5%、pH 7.0、培养时间 12 h。菌株 F12-9 在优化后的培养条件下培养所达到的 OD₆₀₀ 为 1.913, 与未优化相比具有显著差异, 较未优化前提升了 1.34 倍, 证明优化后的培养条件可靠。

4 结论

本研究从瘤胃内容物分离筛选出一株高效产丁酸的 *R. intestinalis* F12-9, 其具有耐 NaCl、耐胆盐、耐人工模拟胃胰液等特性, 具有良好的生物安全性。该菌株的最佳培养条件为: 接种量 5%、时间 12 h、pH 7.0。该条件下, *R. intestinalis* F12-9 的吸光度(OD₆₀₀)为 1.913, 与未优化前相比提升了 1.34 倍。本研究进一步丰富了产丁酸的菌株, 并为该菌株开发成为新型微生物添加剂提供了理论基础。

作者贡献声明

张吉贤：执行试验研究及论文撰写；范定坤：指导数据分析；杨东：指导试验安排；毕研亮：提供样品和资金；崔凯：提供资源；张乃锋：总体研究目标的制定及论文修改指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] MOORE WE, MOORE LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(9): 3202-3207.
- [2] LOUIS P, FLINT HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 294(1): 1-8.
- [3] CASSIR N, BENAMAR S, SCOLA BL. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(1): 37-45.
- [4] MACHIELS K, JOOSSENS M, SABINO J, de PRETER V, ARIJS I, EECKHAUT V, BALLEST V, CLAES K, van IMMERSEEL F, VERBEKE K, FERRANTE M, VERHAEGEN J, RUTGEERTS P, VERMEIRE S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2014, 63(8): 1275-1283.
- [5] ZHAO JB, LIU P, WU Y, GUO PT, LIU L, MA N, LEVESQUE C, CHEN YQ, ZHAO JS, ZHANG J, MA X. Dietary fiber increases butyrate-producing bacteria and improves the growth performance of weaned piglets[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(30): 7995-8004.
- [6] GEIRNAERT A, CALATAYUD M, GROOTAERT C, LAUKENS D, DEVRIESE S, SMAGGHE G, de VOS M, BOON N, van de WIELE T. Butyrate-producing bacteria supplemented *in vitro* to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11450.
- [7] CHEN DF, JIN DC, HUANG SM, WU JY, XU MQ, LIU TY, DONG WX, LIU X, WANG SN, ZHONG WL, LIU Y, JIANG RH, PIAO MY, WANG BM, CAO HL. *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota[J]. *Cancer Letters*, 2020, 469: 456-467.
- [8] 金多晨. 产丁酸菌通过重塑肠道菌群抑制 Wnt 通路防治高脂饮食诱导的肠腺瘤恶变[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- JIN DC. Butyrate-producing bacteria inhibits high-fat diet-induced intestinal carcinogenesis by remodeling gut microbiota and inhibiting Wnt signaling pathway[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2018 (in Chinese).
- [9] ALAMEDDINE J, GODEFROY E, PAPARGYRIS L, SARRABAYROUSE G, TABIASCO J, BRIDONNEAU C, YAZDANBAKHS K, SOKOL H, ALTARE F, JOTEREAU F. *Faecalibacterium prausnitzii* skews human DC to prime IL10-producing T cells through TLR2/6/JNK signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 induction[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 143.
- [10] YU Y, LI Q, ZHANG HR, WU YP, ZHANG RQ, YUE M, YANG CM, CAO GT. *Clostridium butyricum* alone or combined with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ improved early-stage broiler health by modulating intestinal flora[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(1): 155-166.
- [11] 华学春. 丁酸梭菌对断奶仔猪的生长性能、免疫、抗氧化能力及肠道健康的作用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- HUA XC. Study on the effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, immunity, antioxidant capacity and intestinal health of weaned piglets[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019 (in Chinese).
- [12] 李正猛, 杨毅, 卜登攀, 王建平, 马露. 丁酸梭菌对哺乳犊牛生长性能、血清抗氧化指标及腹泻频率的影响[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(6): 3772-3780.
- LI ZM, YANG Y, BU DP, WANG JP, MA L. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, serum antioxidant indexes and diarrhea frequency of lactating calves[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2024, 36(6): 3772-3780 (in Chinese).
- [13] CAI LY, HARTANTO R, ZHANG J, QI DS. *Clostridium butyricum* improves rumen fermentation and growth performance of heat-stressed goats *in vitro* and *in vivo*[J]. *Animals*, 2021, 11(11): 3261.
- [14] XU LP, SUN XL, WAN XH, LI KK, JIAN FC, LI WT, JIANG RR, HAN RL, LI H, KANG XT, WANG YB. Dietary supplementation with *Clostridium butyricum* improves growth performance of broilers by regulating intestinal microbiota and mucosal epithelial cells[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(4): 1105-1114.
- [15] CAI GL, GENG YZ, LIU YF, YANG SJ, LI XM, SUN HY, LU J. Structure, antioxidant properties, and protective effects on DNA damage of exopolysaccharides from *Clostridium butyricum*[J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(6): 2704-2712.
- [16] 李稳稳. 益生菌对断奶羔羊生长性能、消化吸收能力、免疫功能和肠道微生态的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
- LI WW. Effects of probiotics on growth performance, digestion and absorption ability, immune function and intestinal microecology of weaned lambs[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [17] 夏会丽, 陈思思, 陈雄, 代俊, 黄亚男, 谢婷, 李爱玲, 王志. 丁酸梭菌的鉴定与发酵培养基配方优化[J]. *食品科学*, 2017, 38(8): 56-62.
- XIA HL, CHEN SS, CHEN X, DAI J, HUANG YN, XIE T, LI AL, WANG Z. Identification of *Clostridium butyricum* and optimization of fermentation medium for its growth[J]. *Food Science*, 2017, 38(8): 56-62 (in Chinese).

- [18] 吴福平, 邵景东, 姚卫蓉, 王毅谦. 食品中 β -溶血性链球菌检验技术的研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2010, 33(1): 47-49.
WU FP, SHAO JD, YAO WR, WANG YQ. Study on testing technology of β -hemolytic *Streptococcus* in food[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2010, 33(1): 47-49 (in Chinese).
- [19] TINDALL BJ, ROSSELLÓ-MÓRA R, BUSSE HJ, LUDWIG W, KÄMPFER P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 1): 249-266.
- [20] ZÁRATE G, CHAIA AP, GONZÁLEZ S, OLIVER G. Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(9): 1214-1221.
- [21] LEWIS LI JS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[M]. 34th ed. Berwyn: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024: 44-54.
- [22] REY M, ENJALBERT F, COMBES S, CAUQUIL L, BOUCHEZ O, MONTEILS V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 116(2): 245-257.
- [23] TAMANAI-SHACOORI Z, SMIDA I, BOUSARGHIN L, LOREAL O, MEURIC V, FONG SB, BONNAURE-MALLET M, JOLIVET-GOUGEON A. *Roseburia* spp. a marker of health?[J]. Future Microbiology, 2017, 12: 157-170.
- [24] NIE K, MA KJ, LUO WW, SHEN ZH, YANG ZY, XIAO MW, TONG T, YANG YY, WANG XY. *Roseburia intestinalis*: a beneficial gut organism from the discoveries in genus and species[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 757718.
- [25] RUAN GC, CHEN MJ, CHEN L, XU FH, XIAO ZF, YI AL, TIAN YT, PING Y, LV LL, CHENG Y, WEI YL. *Roseburia intestinalis* and its metabolite butyrate inhibit colitis and upregulate TLR5 through the SP3 signaling pathway[J]. Nutrients, 2022, 14(15): 3041.
- [26] VILA AV, IMHANN F, COLLIJ V, JANKIPERSADSING SA, GURRY T, MUJAGIC Z, KURILSHIKOV A, BONDER MJ, JIANG XF, TIGCHELAAR EF, DEKENS J, PETERS V, VOSKUIL MD, VISSCHEDIJK MC, van DULLEMEN HM, KESZTHELYI D, SWERTZ MA, FRANKE L, ALBERTS R, FESTEN EAM, et al. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome[J]. Science Translational Medicine, 2018, 10(472): eaap8914.
- [27] SONG WS, JO SH, LEE JS, KWON JE, PARK JH, KIM YR, BAEK JH, KIM MG, KWON SY, KIM YG. Multiomics analysis reveals the biological effects of live *Roseburia intestinalis* as a high-butyrate-producing bacterium in human intestinal epithelial cells[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(12): 2300180.
- [28] McCLORRY S, ZAVALETA N, LLANOS A, CASAPÍA M, LÖNNERDAL B, SLUPSKY CM. Anemia in infancy is associated with alterations in systemic metabolism and microbial structure and function in a sex-specific manner: an observational study[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2018, 108(6): 1238-1248.
- [29] SHEN ZH, LUO WW, TAN B, NIE K, DENG MZ, WU S, XIAO MW, WU X, MENG XR, TONG T, ZHANG C, MA KJ, LIAO YJ, XU JH, WANG XY. *Roseburia intestinalis* stimulates TLR5-dependent intestinal immunity against Crohn's disease[J]. EBioMedicine, 2022, 85: 104285.
- [30] WANG B, MORINOBU A, HORIUCHI M, LIU J, KUMAGAI S. Butyrate inhibits functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells[J]. Cellular Immunology, 2008, 253(1/2): 54-58.
- [31] KELLY CJ, ZHENG L, CAMPBELL EL, SAEEDI B, SCHOLZ CC, BAYLESS AJ, WILSON KE, GLOVER LE, KOMINSKY DJ, MAGNUSON A, WEIR TL, EHRENTAUF SF, PICKEL C, KUHN KA, LANIS JM, NGUYEN V, TAYLOR CT, COLGAN SP. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(5): 662-671.
- [32] DUNCAN SH, HOLD GL, BARCENILLA A, STEWART CS, FLINT HJ. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(Pt 5): 1615-1620.
- [33] 王腾浩, 宗鑫, 宋德广, 汪以真. 产抑菌蛋白的丁酸梭菌的筛选和鉴定及体外益生功能研究[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(13): 75-81.
WANG TH, ZONG X, SONG DG, WANG YZ. Screening, identification and *in vitro* functional study of *Clostridium butyricum* which produce antimicrobial protein[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2015, 51(13): 75-81 (in Chinese).
- [34] BASAN M, HONDA T, CHRISTODOULOU D, HÖRL M, CHANG YF, LEONCINI E, MUKHERJEE A, OKANO H, TAYLOR BR, SILVERMAN JM, SANCHEZ C, WILLIAMSON JR, PAULSSON J, HWA T, SAUER U. A universal trade-off between growth and lag in fluctuating environments[J]. Nature, 2020, 584(7821): 470-474.
- [35] 付域泽, 焦帅, 张乃锋. 一株产丁酸羊源拜氏梭菌的筛选及其培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5184-5193.
FU YZ, JIAO S, ZHANG NF. Screening and culture condition optimization of a butyrate-producing *Clostridium beijerinckii* strain from sheep[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5184-5193 (in Chinese).
- [36] 曹阳阳. 细菌生长曲线的模型拟合及聚类分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2020.
CAO YY. Model fitting and clustering analysis of bacterial growth curve[D]. Shanghai: East China Normal University, 2020 (in Chinese).
- [37] LEBEER S, VANDERLEYDEN J, de KEERSMAECKER SCJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(4): 728-764.
- [38] DIVYASHREE S, ANJALI PG, SOMASHEKARAI AH R, SREENIVASA MY. Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*[J]. Biotechnology

- Reports, 2021, 32: e00672.
- [39] 张超. 肠道罗斯拜瑞氏菌安全性和益生菌特性评估及其微胶囊制备[D]. 长沙: 中南大学, 2023.
ZHANG C. Evaluation of the safety and probiotic characteristics of *Roseburia intestinalis* and preparation of its microcapsules[D]. Changsha: Central South University, 2023 (in Chinese).
- [40] MANRIQUE P, DILLS M, YOUNG MJ. The human gut phage community and its implications for health and disease[J]. *Viruses*, 2017, 9(6): 141.
- [41] CASJENS S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(2): 277-300.
- [42] WANG XX, KIM Y, MA Q, HONG SH, POKUSAIEVA K, STURINO JM, WOOD TK. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments[J]. *Nature Communications*, 2010, 1: 147.
- [43] HUANG KL, SHI WB, YANG B, WANG JK. The probiotic and immunomodulation effects of *Limosilactobacillus reuteri* RGW1 isolated from calf feces[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 12: 1086861.
- [44] BEGLEY M, SLEATOR RD, GAHAN CGM, HILL C. Contribution of three bile-associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(2): 894-904.
- [45] 丁长河, 高军, 白璐佳, 孟珺, 樊俊敏, 魏书音. 人源性丁酸梭菌的筛选及益生特性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2024, 45(3): 69-77.
DING CH, GAO J, BAI LJ, MENG J, FAN JM, WEI SY. Screening of *Clostridium butyricum* of human origin and study on its beneficial properties[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2024, 45(3): 69-77 (in Chinese).
- [46] 吴永威. 肠道来源丁酸梭菌的分离、鉴定和培养工艺及其与 AKK 菌对糖尿病小鼠的影响[D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2022.
WU YW. Isolation, identification and culture process improvement of intestinal-derived *Clostridium butyrate* and its effects with *Akkermansia muciniphila* on diabetic mice[D]. Shanghai: China State Institute of Pharmaceutical Industry, 2022 (in Chinese).
- [47] BRETON S, BROWN D. Regulation of luminal acidification by the V-ATPase[J]. *Physiology*, 2013, 28(5): 318-329.
- [48] 中华人民共和国农业农村部. 直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南[EB/OL]. (2021-11-01) [2024-11-07]. https://www.moa.gov.cn/nybg/b/2021/202111/202112/t20211221_6385218.htm. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Guideline for identification and safety evaluation of direct-fed microbial and fermented product producers[EB/OL]. (2021-11-01) [2024-11-07]. https://www.moa.gov.cn/nybg/b/2021/202111/202112/t20211221_6385218.htm (in Chinese).
- [49] CHARTERIS WP, KELLY PM, MORELLI L, COLLINS JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species[J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(12): 1636-1643.
- [50] NIU C, YU D, WANG YL, REN HG, JIN Y, ZHOU W, LI BP, CHENG YY, YUE JJ, GAO ZX, LIANG L. Common and pathogen-specific virulence factors are different in function and structure[J]. *Virulence*, 2013, 4(6): 473-482.
- [51] 钟蔚. 枯草芽孢杆菌微生态制剂制备工艺研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
ZHONG W. Studies on the processing technology of the probiotic with *Bacillus subtilis*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).