

弯曲广布乳杆菌 HFS9 基因组分析及益生特性

林晓颖^{1,2}, 张素平^{1,2}, 徐明超^{1,2}, 乔蕾², 张舒惟^{1,2}, 杨晶^{2,3}, 孙晖², 张桂², 刘丽云^{*2,3}, 徐建国^{*1,2,3}

1 南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166

2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

3 中国医学科学院未知细菌发现和功能研究创新单元, 北京 102206

林晓颖, 张素平, 徐明超, 乔蕾, 张舒惟, 杨晶, 孙晖, 张桂, 刘丽云, 徐建国. 弯曲广布乳杆菌 HFS9 基因组分析及益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1023-1039.

LIN Xiaoying, ZHANG Suping, XU Mingchao, QIAO Lei, ZHANG Shuwei, YANG Jing, SUN Hui, ZHANG Gui, LIU Liyun, XU Jianguo. Genomic characteristics and probiotic properties of *Latilactobacillus curvatus* HFS9[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1023-1039.

摘要:【背景】近年来, 弯曲广布乳杆菌的健康益处受到广泛关注; 基因组分析结合表型实验的方法为益生菌开发提供了新思路。【目的】探索分离自健康人粪便的弯曲广布乳杆菌 HFS9 基因组特征及益生潜力。【方法】通过泛基因组分析对弯曲广布乳杆菌基因组特征进行描述, 基于功能数据库注释并分析 HFS9 益生相关基因; 通过耐酸耐胆盐实验、自聚集、疏水性和细胞黏附实验、抗生素敏感性试验、自由基清除实验及抑菌试验等对 HFS9 的体外益生特性进行评估; 构建小鼠结肠炎模型初步评估 HFS9 的体内抗炎作用。【结果】弯曲广布乳杆菌具有开放的泛基因组和保守的核心基因组。HFS9 基因组大小为 1.97 Mb, GC 含量为 41.86%, 蛋白质编码区数目为 2 050 个; 含乳杆菌噬菌体 PLE3 编码基因及与细胞黏附、酸耐受、胆盐耐受和抗氧化等相关的益生基因。HFS9 在酸和胆盐环境中的存活率分别为 62.42%和 92.92%; 自聚集能力和疏水性分别为 63.33%和 75.00%, 对人结肠癌细胞(HT-29 细胞)的黏附率为 12.97%; 对选用的大多数抗生素敏感; 对 6 种常见人体致病菌均具有抑制作用; 具有清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼[1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH]自由基和羟自由基的能力。此外, HFS9 可缓解实验性小鼠结肠炎症状, 改善结肠缩短和组织病理学变化。【结论】弯曲广布乳杆菌 HFS9 含有益生相关基因且具有体内外益生特性, 可作为益生菌候选菌株进一步开发利用。

关键词: 弯曲广布乳杆菌; 泛基因组; 核心基因组; 益生基因; 益生菌

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1200505)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1200505).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Liyun, liuliyun@icdc.cn; XU Jianguo, xujianguo@icdc.cn

Received: 2022-07-04; Accepted: 2022-09-12; Published online: 2022-10-21

Genomic characteristics and probiotic properties of *Latilactobacillus curvatus* HFS9

LIN Xiaoying^{1,2}, ZHANG Suping^{1,2}, XU Mingchao^{1,2}, QIAO Lei², ZHANG Shuwei^{1,2}, YANG Jing^{2,3}, SUN Hui², ZHANG Gui², LIU Liyun^{*2,3}, XU Jianguo^{*1,2,3}

1 School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

3 Research Units of Discovery of Unknown Bacteria and Function, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 102206, China

Abstract: [Background] In recent years, the health benefits of *Latilactobacillus curvatus* have received much attention and genome analysis combined with phenotypic test provides a new approach for the development of probiotics. **[Objective]** To explore the genomic characteristics and probiotic properties of *L. curvatus* HFS9 isolated from healthy human feces. **[Methods]** The genome of *L. curvatus* HFS9 was characterized by pan-genome analysis and genomic annotation was performed to identify the probiotic genes. The probiotic properties of *L. curvatus* HFS9 *in vitro* were assessed based on survivability in low pH and 0.3% bile salt, self-aggregation capacity, hydrophobicity and cell adhesion, susceptibility tests, radical scavenging activities, and antibacterial experiments. The mouse model of colitis was established to evaluate the anti-inflammatory effect of HFS9 *in vivo*. **[Results]** *L. curvatus* had an open pan-genome and a conserved core genome. The genome of *L. curvatus* HFS9 was 1.97 Mb, with the GC content of 41.86% and 2 050 coding sequences. It carried *Lactobacillus* phage PLE3 genes and possessed the probiotic genes related to cell adhesion, acid tolerance, bile salt tolerance, and antioxidation. The survival rates of *L. curvatus* HFS9 in acid and bile salt environments were 62.42% and 92.92%, respectively. The self-aggregation capacity and hydrophobicity of *L. curvatus* HFS9 were 63.33% and 75.00%, respectively. *L. curvatus* HFS9 showed the adhesion rate of 12.97% to human colon cancer cells (HT-29 cells), was sensitive to most of the antibiotics tested, had inhibitory effects on six common human pathogens, and possessed the abilities to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals. In addition, *L. curvatus* HFS9 relieved the symptoms and ameliorated colon shortening and histopathological changes in the mouse model of colitis. **[Conclusion]** *L. curvatus* HFS9 contains probiotic genes and has probiotic properties *in vitro* and *in vivo*, which can be further developed and utilized as a candidate probiotic strain.

Keywords: *Latilactobacillus curvatus*; pan-genome; core genome; probiotic genes; probiotics

弯曲广布乳杆菌(*Latilactobacillus curvatus*)是革兰氏阳性,无芽孢,兼性厌氧的弯曲豆形棒状菌,多成对或成短链出现,菌落凸起,不透明,呈乳白色,主要分离自食品和动物组织样本^[1]。

该菌种曾隶属于乳杆菌属,2020年由Zheng等^[2]更名,因具发酵特性^[3]而备受关注,并于2019年被批准为发酵肉制品、发酵乳及乳制品的新食品原料。除在食品工业的应用外,*L. curvatus*还具

有调节机体免疫的功能。*L. curvatus* 可通过下调白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 等细胞因子的分泌发挥抗炎功效, 缓解小鼠结肠炎及大鼠牙周炎症状^[4-5]; 部分 *L. curvatus* 分泌的细菌素 curvacin A 具有较强的抗菌活性, 模拟分析显示 curvacin A 能够竞争性抑制 SARS-CoV-2 与宿主上皮细胞互作, 进而增强机体免疫防御能力^[6]。此外, *L. curvatus* HY7601 和 *L. plantarum* KY1032 的混合制剂可通过抑制脂肪细胞分化和减少脂肪堆积改善肥胖所导致的代谢紊乱^[7]。

高通量测序技术的发展促进了多基因组分析研究的普及, 特别是泛基因组分析。泛基因组是一个物种所有基因的总称, 包括核心基因组(这个物种的全部同源基因)、非必需基因组(存在于两个或多个菌株中的辅助基因)以及菌株特异性基因组(单个菌株的特有基因)^[8]。泛基因组可用于不同菌株之间基因组的比较分析, 有助于对菌株在遗传水平上的代谢能力和功能作用进行更深入的分析^[9]。许多乳杆菌的比较基因组学分析已见报道^[10]。研究表明, 通过基因组注释分析可快速识别细菌素编码基因, 发现部分 *L. curvatus* 菌株可产生细菌素, 细菌素的产生是 *L. curvatus* 菌株作为肉制品发酵过程潜在生物保护剂的原因之一^[11-13]。同时, 基因组分析发现, 已报道的 *L. curvatus* 均编码丝氨酸脱氨酶和鸟嘌呤脱氨酶, 可将肉制品中的丝氨酸和鸟嘌呤转化为 NH_3 , 使环境 pH 值升高, 从而增强该菌耐受酸性环境的能力, 这一特性也是 *L. curvatus* 在肉制品中存活的关键因素之一, 还是与邻近菌种进行鉴别的重要依据^[14]。自 Hebert 等^[15]于 2012 年首次对 *L. curvatus* 全基因组进行测序以来, 目前已有超过 20 条 *L. curvatus* 菌株基因组序列上传至美国国家生物技术信息中心(NCBI)汇编数据库。因此, 基于现有 *L. curvatus* 菌株的研究基础结合基因组比较分析, 探究种内菌株特定

性状的遗传基础以及潜在益生功能变得可行。益生菌作为适量摄取对宿主健康有益的活微生物^[16], 其在宿主体内发挥积极作用主要依赖两类因素, 编码这两类因素的基因统称为益生相关基因: 一类是适应因素, 帮助菌株适应新生态位, 即在宿主的胃肠道中存活并定殖; 另一类是益生因素, 与促进宿主健康直接相关^[17]。

本研究旨在利用基因组比较分析了解分离自健康人粪便样本 *L. curvatus* HFS9 的基因组特性, 通过基因组注释锚定益生相关基因, 结合体外实验探索其生物学特性和益生潜力, 并初步评估其体内益生功效, 为 *L. curvatus* HFS9 的进一步研究提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

L. curvatus HFS9 分离自健康人粪便样本; 以与 *L. curvatus* 模式株 DSM 20019 基因组序列的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)值 $>96\%$ ^[18] 为依据, 自 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载 25 株符合该条件的 *L. curvatus* 菌株基因组纳入本研究, 菌株基本信息如表 1 所示。6 种常见人体致病菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 43895、单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC BAA-679、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、猪链球菌(*Streptococcus suis*) ATCC 43765 和福氏志贺菌(*Shigella flexneri*) 301 作为指示菌用于抑菌试验, 商业菌株鼠李糖乳杆菌(*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG) ATCC 53103 作为阳性对照菌用于抑菌试验; 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) ATCC 49619 作为质控菌用于抗生素敏感性试

验; *L. curvatus* HFS9 和 *S. flexneri* 301 保存于传染病国家重点实验室, 其余参考菌株均购自美国模式菌种保藏中心(ATCC)。

六周龄雌性 C57BL/6N 小鼠[(16±2) g], 北京维通利华实验动物技术有限公司; 在特定的无病原体(specific-pathogen free, SPF)环境下开展实验。已通过中国疾病预防控制中心实验动物福利伦理委员会批准(批准号为 2022-017)。

1.1.2 培养基

De man rogosa sharpe (MRS)+5% (体积分数)脱纤维羊血培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸取物 10.0, 酵母提取液 5.0, 葡萄糖 20.0, 乙酸钠 5.0, 柠檬酸二胺 2.0, 吐温-80 1.0, 磷酸氢二钾 0.4, 硫酸镁 0.58, 硫酸锰 0.29, 碳酸钙 20.0, 琼脂 15.0, 脱纤维羊血 50.0 mL, pH 6.3±0.2; 脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 脱水小牛脑浸粉 12.5, 脱水牛心浸粉 5.0, 氯化钠 5.0, 葡萄糖 2.0, 磷酸氢二钠 2.5, pH 7.4±0.2。

1.1.3 主要试剂和仪器

金牌 Mix (Green), 北京擎科生物科技有限公司; Wizard[®] Genomic DNA Purification 试剂盒, Promega 公司; MRS 培养基、BHI 培养基、E-test 条, Oxoid 公司; 胃蛋白酶, 上海信帆生物科技有限公司; 胆盐、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 北京索莱宝科技有限公司; Opti-minimal essential medium (Opti-MEM), Gibco 公司; Triton-X100、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼[1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH], Sigma-Aldrich 公司; 葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt, DSS), MP Biomedicals 公司。

超微量紫外分光光度计, NanoDrop 公司; 麦氏浊度仪, 生物梅里埃公司; 二氧化碳培养箱, 易思高科技有限公司。

1.2 菌株的分离、纯化及初步鉴定

取适量冻存于-80 °C 冰箱中的健康人粪便样本置于冰上缓慢解冻, 用 PBS 梯度稀释后, 移取适量悬浮液至 BHI+5% (体积分数)脱纤维羊血培养基, 均匀涂布, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 3 d, 挑取乳白色不透明单菌落进行传代纯化后, 100 °C 金属浴 10 min 获得基因组 DNA 模板, 以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')和 1492R (5'-AAGTCGTAACAAGGT AGCCGT-3')为引物进行 PCR。PCR 反应体系(30 μL): 金牌 Mix (Green) 15 μL, ddH₂O 12 μL, 27F 和 1492R (10 μmol/L)各 1 μL, 基因组 DNA 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 0.5 min, 55 °C 0.5 min, 72 °C 0.5 min, 30 个循环; 72 °C 1 min。将 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序, 所得序列提交至 NCBI 数据库并进行同源性比对, 初步确定所分离菌株为 *L. curvatus*, GenBank 登录号为 OP223417。

1.3 基因组 DNA 的提取、测序和组装

依照 Wizard[®] Genomic DNA Purification 试剂盒说明书提取 *L. curvatus* HFS9 基因组 DNA, 使用超微量紫外分光光度计测量 DNA 样品的浓度和质量, 委托上海美吉生物医药科技有限公司基于 Illumina HiSeq 4000 测序平台进行全基因组框架图测序。对获取的原始数据进行质量评估后, 过滤低质量 Reads 并去除接头和引物, 获得高质量的 Reads 序列, 使用 SOAP denovo V1.06^[19] 软件进行序列拼接, Gap Closer^[20] 软件填充内部 Gap、矫正单个碱基, 最终完成基因组的组装。

1.4 比较基因组分析

首先, 使用 CheckM V0.9.7^[21] 软件对 *L. curvatus* 基因组质量进行评估, 进而使用 Prokka V1.14.6^[22] 对基因组序列进行基因预测, 提取各基因组 16S rRNA 基因进行本地 BLASTn 序列一致性比对,

明确 *L. curvatus* HFS9 菌株的分类学位置, 最后使用 pyani^[23] 计算基因组间 ANI 值并对生成的矩阵进行聚类 and 热图绘制。将 Prokka 注释结果输入到 Roary V3.13.0^[24], 基于默认参数进行泛基因组和核心基因分析, 通过 ggplot2 可视化分析结果。利用 eggNOG-mapper^[25] 结合直系同源蛋白组(cluster of orthologous groups of proteins, COG)数据库对 26 株 *L. curvatus* 进行核心基因和菌株特异性基因功能类别注释。使用在线分析工具 Prophage Hunter^[26] (<https://pro-hunter.bgi.com/>) 预测 *L. curvatus* HFS9 所携噬菌体。基于 BAGEL3^[27] 挖掘产细菌素的基因簇。

1.5 体外益生功能评价

1.5.1 溶血实验^[28]

在 MRS+5% (体积分数) 脱纤维羊血培养基表面接种 *L. curvatus* HFS9, 37 °C 培养 24 h 后, 观察培养基是否出现溶血现象。 α 溶血: 菌落周围出现绿色区域; β 溶血: 菌落周围出现透明区域; γ 溶血: 不会引起溶血。

1.5.2 耐酸、耐胆盐实验^[29]

将 MRS+5% (体积分数) 脱纤维羊血平板 37 °C 培养过夜的 *L. curvatus* HFS9 悬浮于 PBS 中(10^8 CFU/mL) 并分别置于含 3 g/L 胃蛋白酶的 MRS 液体培养基(pH 3.0) 和含 0.3% (质量体积分数) 胆盐的 MRS 液体培养基, 以 MRS 液体培养基为空白对照, 于 37 °C 分别静置培养 3 h 和 4 h, 将菌悬液梯度稀释后接种于 MRS 平板表面并计数其存活细菌量。

存活率(%) = $(\lg \text{CFU } N_1 / \lg \text{CFU } N_0) \times 100$

式中: N_1 为培养后计数所得菌量; N_0 为初始菌量。

1.5.3 自聚集、疏水性和细胞黏附实验

自聚集能力通过测定麦氏浊度为 1.0 (A_0 , 约 1×10^6 CFU) 的菌悬液在 37 °C 培养 24 h 后浊度(A_1) 的变化程度进行评价。疏水性实验则需在 A_0 的菌悬液中加入等体积的二甲苯, 涡旋混匀 2 min 后于 37 °C 中放置 1 h, 弃去有机溶剂层,

测定其水相浊度(A_1)。自聚集能力/细胞表面疏水性(%) = $(1 - A_1/A_0) \times 100\%$ 。选取人结肠癌细胞系 HT-29 细胞进行黏附实验, 以 1×10^5 cell/mL 的量接种于 24 孔细胞培养板 37 °C 孵育过夜后, *L. curvatus* HFS9 以 1×10^7 CFU/mL 的量混入 Opti-MEM, 并设置阴性对照孔, 在 37 °C、5% CO_2 的培养箱中孵育 3 h。洗细胞 3 次后, 加入 0.5% Triton-X 100 裂解细胞, 通过平板计数法评估其黏附率^[30]。黏附率(%) = $3 \text{ h 细菌数} / 0 \text{ h 细菌数} \times 100$ 。

1.5.4 抗生素敏感性试验

综合临床和实验室标准协会(CLSI) M45 和 M100 标准^[31], 选用乳杆菌推荐测试抗生素, 即青霉素、氨苄西林、亚胺培南、美罗培南、万古霉素、达托霉素、红霉素、克林霉素和利奈唑胺进行抗生素敏感性试验; 并根据 *L. curvatus* HFS9 基因组抗生素耐药性综合数据库(the comprehensive antibiotic resistance database, CARD) 注释结果选取氟喹诺酮类抗生素莫西沙星进行测试, 结果依据标准中对厌氧菌的标准进行判定。*S. pneumoniae* ATCC 49619 作为质量控制菌株, 采用抗生素浓度梯度法(E-test 法), 读取其最小抑制浓度(MIC) 值。

1.5.5 抑菌试验

选择 6 种常见人体致病菌进行本实验: *E. coli* ATCC 43895、*L. monocytogenes* ATCC BAA-679、*S. typhimurium* ATCC 14028、*S. aureus* ATCC 25923、*S. suis* ATCC 43765 和 *S. flexneri* 301。将对数生长期(10^8 CFU/mL) 的 *L. curvatus* HFS9 和致病菌调至相同麦氏浊度(1×10^8 CFU), 涂布致病菌于 MRS 平板表面, 晾干后接种 15 μL *L. curvatus* HFS9 菌悬液于平板表面, 37 °C 孵育 24 h 后观察其抑菌圈大小^[32]。以 LGG 作为阳性对照^[33], PBS 作为阴性对照。

1.5.6 抗氧化试验

通过对 DPPH 和羟自由基的清除活性评价菌株抗氧化能力。将菌株 HFS9 在 MRS 液体培养基

中 37 °C、220 r/min 培养 24 h 后, 4 000 r/min 离心 10 min 获得发酵上清液, 与等体积 0.4 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液混匀(A_s), 设置对照组(A_c , 以 MRS 液体培养基替换发酵上清液)和空白组(A_b , 以无水乙醇溶液替换 0.4 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液), 避光孵育 30 min, 测定其在 517 nm 处的吸光度。DPPH 自由基清除活性(%)=[1-(A_s - A_b)/ A_c]×100。羟自由基清除活性根据 Zhang^[34]描述的方法进行, 将反应时间调整为 0.5 h, 选用亮绿作为染料并在 624 nm 处测量其吸光度。

1.6 DSS 诱导小鼠结肠炎试验

实验小鼠在 25 °C、12 h 光/暗循环的 SPF 环境适应 3 d 后, 随机分成 3 组($n=5$), 即对照组(CT 组)、模型组(DSS 组)和 *L. curvatus* HFS9 干预组(DSS/HFS9 组)。DSS 组和 DSS/HFS9 组分别以 200 μ L PBS 和 *L. curvatus* HFS9 菌悬液(1×10^8 CFU)预灌胃 7 d 后, 于两组小鼠的饮用水中添加 3% (质量体积分数) DSS, 并继续灌胃 7 d。每日记录小鼠的体重、粪便性状和潜血状况, 据此计算疾病活动指数(disease activity index, DAI)^[35]。实验结束后, 测量小鼠结肠长度, 取远端结肠浸泡于 4%多聚甲醛供后续组织病理学分析, 评分标准参照 Wang 等^[36]研究。

1.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.4.2 软件分析数据, 结果以均值±标准差或均值±标准误的形式表现。使用单因素方差分析和 Dunnett-*t* 检验进行多组比较和组间两两比较, 以 $P<0.05$ 作为统计学差异的标准。

2 结果与分析

2.1 弯曲广布乳杆菌基因组一般特征

为了解 *L. curvatus* 遗传多样性和基因组一般特征, 使用实验菌株 *L. curvatus* HFS9 及 25 株下载自 NCBI 数据库的 *L. curvatus* 基因序列进行

比较分析。结果显示, *L. curvatus* HFS9 与所下载菌株的 16S rRNA 基因序列的相似性为 99.68%–100.00%, 高于种间阈值 98.75%^[37], 进一步明确了该实验菌株分类学位置; 各菌株间 ANI 值为 98.01%–99.99%, 充分证实所选菌株均为 *L. curvatus* (图 1)。26 株 *L. curvatus* 分离自不同生态位, 包括发酵食品、牛奶、动物组织及人类肠道等; 基因组大小为 1.80–2.18 Mb, 平均基因组大小为 1.97 Mb; GC 含量在 41.68%–42.10%之间, 平均为 41.89%; 蛋白质编码区数量为 1 742–3 766 个(表 1)。*L. curvatus* HFS9 基因组框架图大小为 1.97 Mb, GC 含量为 41.86%, 含 66 个 scaffold、56 个 tRNA 和 2 050 个蛋白质编码区。于 scaffold2 中预测到一个质粒, 其长度为 39 672 bp, 与乳杆菌噬菌体 PLE3 序列一致性(97%)最高; 经注释发现, 该质粒所携基因多编码噬菌体组装、结构、裂解、免疫和复制相关蛋白, 未发现耐药基因。

2.2 弯曲广布乳杆菌比较基因组分析

对 26 株 *L. curvatus* 基因组进行泛基因组和核心基因组分析, 从基因层面探索 *L. curvatus* 潜在的生物学功能及表型。结果表明, *L. curvatus* 泛基因组由 7 043 个基因组成, 整体呈上升趋势, 即物种泛基因组大小随着基因组数量的增加而增加(图 2A); 新基因增加数从初始的 1 914.7 个逐渐减少至最后一组的 187.5 个, 表明 *L. curvatus* 泛基因组处于一个相对开放的状态。相比之下, 核心基因组的拟合曲线则趋于平稳, 共有 1 054 个核心基因, 占基因总数的 14.97%(图 2B); 每个 *L. curvatus* 的菌株特异性基因数量由 5–887 个不等, 其中 *L. curvatus* HFS9 含 96 个菌株特异性基因(图 2C)。

核心基因组 COG 功能注释结果显示, 多数核心基因涉及细菌基本生命活动, 参与新陈代谢, 遗传信息和环境信息处理等, 如 J

类(翻译、核糖体结构和生物发生)、F类(核苷酸运输和代谢)和M类(细胞壁/膜/包膜的生物发生)等(图2D)。*L. curvatus* HFS9菌株特异性基因主要编码涉及碳水化合物转运和能量代谢、防御机制以及复制、重组和修复功能(图2E)。据表2所示,核心基因组中存在大量益生相关基因,主要包括与细胞黏附性、酸耐

受和胆盐耐受等适应因素相关基因,以及与抗氧化功能等益生因素相关基因。*L. curvatus* HFS9的菌株特异性基因中含有ATP驱动的钾转运系统(kdp)相关基因(*kdpA*、*kdpB*、*kdpC*、*kdpD*、*kdpE*、*kup*等),大量噬菌体相关基因,以及抗氧化相关益生基因(*ytpP*、*frnE*、*trxB*、*trxA*等)。

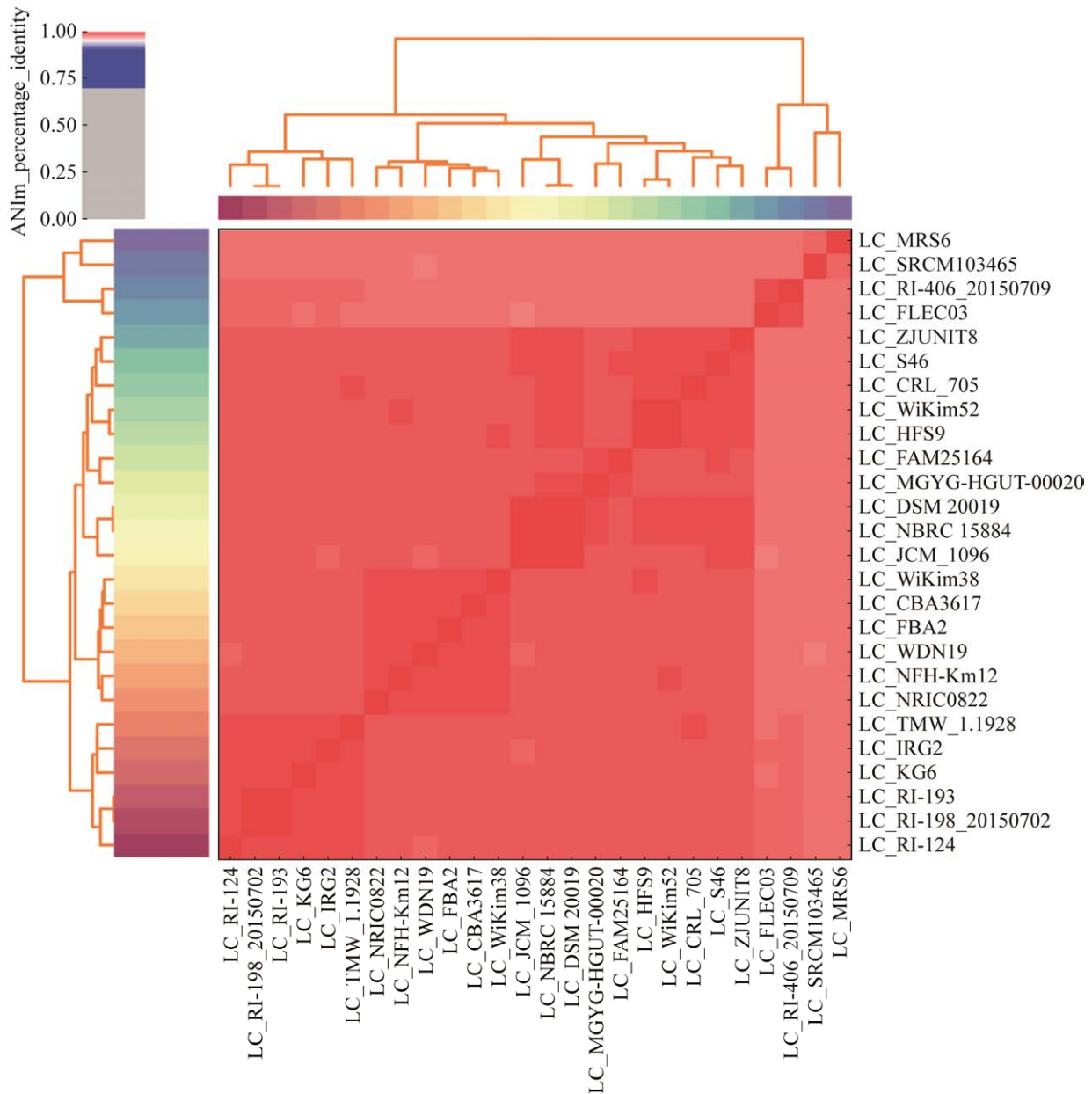


图1 26株弯曲广布乳杆菌的平均核苷酸一致性比对聚类热图

Figure 1 Average nucleotide identity alignment of 26 *Lactilactobacillus curvatus* strains.

表 1 26 株弯曲广布乳杆菌基因组一般特征

Table 1 General genome features of 26 *Latilactobacillus curvatus* strains

菌株 Strain	来源 Source	基因组 大小 Genome size (Mb)	GC 含量 GC content (%)	蛋白质编 码区数 Number of CDS	完整性 Completeness (%)	污染度 Contamination (%)	登录号 Accession No.
HFS9	Human feces	1.97	41.86	2 050	99.46	0	JAMOH000000000
CRL705	Argentinian dry fermented sausage	1.84	41.90	1 890	98.91	0	AGBU000000000.1
NRIC0822	Kabura-zushi	1.94	41.80	2 016	97.46	0	JAFJMA000000000.1
JCM1096	NA	1.81	41.90	2 922	90.29	0.27	BBBQ000000000.1
DSM20019	Milk	1.82	42.00	2 023	99.46	0	AZDL000000000.1
FBA2	Radish and carrot Pickled with rice Bran and salt	1.85	42.10	1 941	99.46	0	CP016028.1
WiKim52	Kimchi	1.99	42.00	2 085	99.46	0	CP016602.1
WiKim38	Baechu-kimchi	1.94	41.90	2 034	99.46	0	CP017124.1
RI-406	Meat	2.00	41.70	2 061	99.46	0	MKDG000000000.1
RI-198	Meat	1.80	42.00	1 862	98.91	0	MKGC000000000.1
RI-124	Meat	1.81	42.00	1 850	99.46	0	MKDR000000000.1
RI-193	Meat	1.81	42.00	1 868	98.91	0	MKGD000000000.1
FLEC03	Beef carpaccio	1.90	41.70	1 950	98.91	0	LT841333.1
MRS6	Fermented sausage Salsiz	2.11	41.70	2 114	99.46	0	CP022474.1
KG6	Salami	2.00	42.03	2 106	99.46	0.54	CP022475.1
NFH-Km12	Kabura-zushi	1.99	41.81	2 091	99.46	0	AP018699.1
ZJUNIT8	Chinese pickle	1.95	42.08	2 069	99.46	0	CP029966.1
TMW1.1928	Raw fermented sausage	2.18	41.70	2 321	99.46	0	CP031003.1
IRG2	Adult feces	1.99	41.88	2 109	99.46	0	CP025476.1
SRCM103465	Food	2.04	41.80	2 048	99.46	0	CP035110.1
S46	Nasopharynx	1.87	41.90	1 915	99.46	0	SUMW000000000.1
NBRC15884	Milk	1.81	42.00	1 854	98.91	0	BJOQ000000000.1
CBA3617	Kimchi	1.92	42.00	2 042	99.46	0	CP042389.1
MGYG- HGUT-00020	Human gut	1.93	41.80	1 965	99.18	0	CABIVZ000000000.1
WDN19	Pickled cabbage food product	2.03	41.68	2 188	99.46	0.54	AP024685.1
FAM25164	Cheese	1.97	41.80	2 046	99.46	0	JAFJMA000000000.1

NA: 未报道

NA: Not reported.

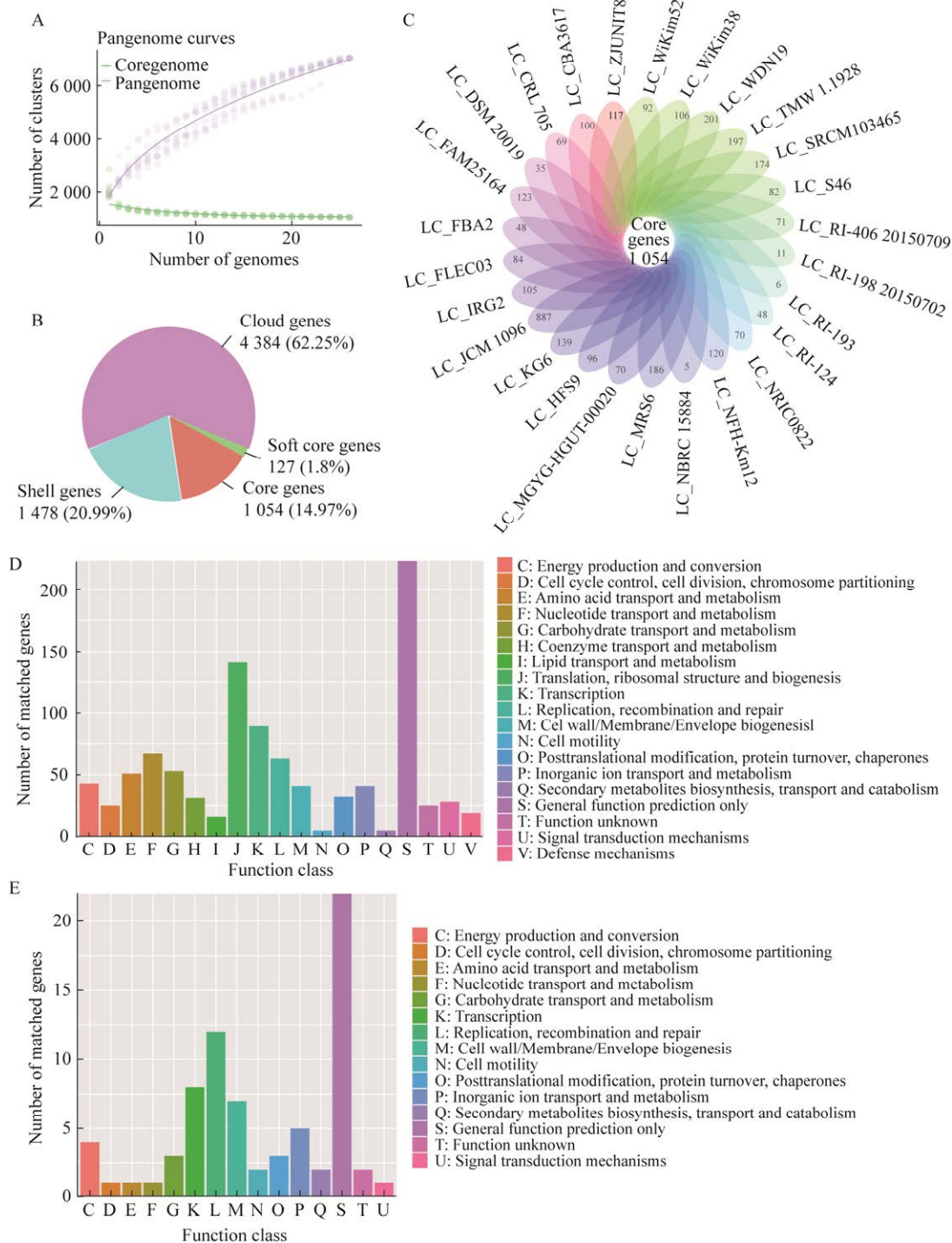


图 2 26 株弯曲广布乳杆菌的比较基因组学分析 A: 泛基因和核心基因曲线. B: 基因数量的饼图. C: 韦恩图. D: 核心基因组蛋白质功能的分类. E: 菌株特异性基因组蛋白质功能的分类

Figure 2 Comparative genomic analysis of 26 *Latilactobacillus curvatus* strains. A: Pan-genome and core-genome curve. B: Pie chart of the number of genes belonging to the core, the soft core, the shell, or the cloud. C: Venn diagram representing the core and unique gene families. D: Classification of protein functions of core genome. E: Classification of protein functions of unique genome.

表 2 弯曲广布乳杆菌 HFS9 的益生相关基因

Table 2 Probiotic genes of *Latilactobacillus curvatus* HFS9

功能	基因	基因产物	位置
Function	Genes	Gene products	Locus
黏附	<i>srtA</i>	Class A sortase	Core genome
Adhesion	<i>fbpA</i>	Fur-regulated basic FbpA	Core genome
	<i>dltD</i>	Methionine sulfoxide reductase-alanylation of LTA	Core genome
	<i>dltA</i>	D-alanylation of LTA	Core genome
酸胁迫	<i>recA</i>	Recombinase RecA	Core genome
Acid stress	<i>sodA</i>	Speroxide dismutase [Mn]	Core genome
	<i>relA</i>	GTP diphosphokinase	Core genome
	<i>groES</i>	Co-chaperone GroES	Core genome
	<i>atpC</i>	ATP synthase F1 complex subunit epsilon	Core genome
	<i>atpD</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit delta	Core genome
	<i>atpG</i>	ATP synthase F1 complex subunit gamma	Core genome
	<i>atpH</i>	ATP synthase CF0 C subunit	Core genome
	<i>atpF</i>	ATP synthase CF0 B subunit	Core genome
	<i>atpB</i>	ATP synthase CF1 beta subunit	Core genome
	<i>atpE</i>	ATP synthase CF1 epsilon subunit	Core genome
胆汁酸	<i>gpmA</i>	2,3-diphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	Core genome
耐受	<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ	Core genome
Bile acid resistance	<i>glmU</i>	Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine phosphate	Core genome
	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	Core genome
	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	Core genome
	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	Core genome
	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	Core genome
	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	Core genome
氧化	<i>tpx</i>	Thiol-specific peroxidase	Core genome
Oxidant	<i>ytpP</i>	Thioredoxin	Core/Unique genome
	<i>frnE</i>	Dithiol-disulfide isomerase involved in polyketide biosynthesis	Unique genome
	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	Unique genome
	<i>trxA</i>	Belongs to the thioredoxin family	Unique genome
其他	<i>dps</i>	DNA protection during starvation and other stresses	Core genome
Others			

2.3 弯曲广布乳杆菌 HFS9 具有潜在益生特性

为验证基因组分析结果,本研究对 *L. curvatus* HFS9 益生特性进行了系列体外实验。如表 3 所示, *L. curvatus* HFS9 在低 pH (pH 3.0)环境中的存活率为 62.42%, 在 0.3%胆盐环境中的存活率为 92.92%, 均保持较高的存活能力。自聚集能力和疏水性分别为 63.33%和 75%, 对 HT-29 细胞

的黏附率达 12.97%。研究发现,作为抗氧化剂的抗坏血酸 DPPH 自由基清除活性为 94.31%^[38], 而本研究中 *L. curvatus* HFS9 的 DPPH 自由基清除活性为 92.34%, 与抗坏血酸活性相当。同时, *L. curvatus* HFS9 的羟自由基清除活性为 54.41%, 与其他 *L. curvatus* 菌株相近^[38]。

此外, *L. curvatus* HFS9 在 MRS+5% (体积分数)脱纤维羊血培养基上无溶血现象; 对本研

表 3 弯曲广布乳杆菌 HFS9 的体外益生特性
Table 3 Probiotic properties of *Latilactobacillus curvatus* HFS9 *in vitro*

体外益生特性 Prebiotic properties <i>in vitro</i>	HFS9 (%)
低 pH 耐受性 Low pH resistance	62.42±12.33
0.3%胆盐耐受性 0.3% bile salt resistance	92.92±3.75
自聚集 Auto-aggregation	63.33±5.77
疏水性 Hydrophobicity	63.33±5.77
黏附率 Adhesion rate	12.97±1.63
DPPH 自由基清除率 DPPH radical scavenging activity	92.34±4.03
羟自由基清除率 Hydroxyl radical scavenging activity	54.41±9.27

究选取的 8 种抗生素敏感, 仅对万古霉素表现出耐药现象, CARD 注释结果显示基因组中存在氟喹诺酮类药物的耐药基因, 但表型结果表明 *L. curvatus* HFS9 对莫西沙星敏感。图 3 表明, *L. curvatus* HFS9 能抑制 6 种常见人体病原菌, 而且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有一定的抑制作用。其中, 对 *S. aureus* 的抑制效果最佳 [(22.07±2.66) mm], 且抑制效果优于阳性对照菌株 LGG [(16.13±0.42) mm], 其次为 *S. dysenteriae* [(20.80±0.50) mm]、*E. coli* [(20.23±1.70) mm] 和 *S. suis* [(19.73±1.76) mm], 对 *S. typhimurium* [(16.03±1.62) mm] 的抑制效果与 *S. suis* 相近, 对 *L. monocytogenes* [(12.53±1.70) mm] 的抑制效果较弱。值得注意的是, 虽对 *L. monocytogenes* 的抑制作用为 6 种致病菌最弱, 但与 LGG [(11.13±1.70) mm] 的抑制效果相当。

2.4 弯曲广布乳杆菌 HFS9 有效缓解小鼠急性结肠炎症状

通过构建小鼠急性结肠炎模型, 初步评估 *L. curvatus* HFS9 的体内安全性并进一步验证其益生功能。结果表明, *L. curvatus* HFS9 预灌胃 7 d 未发现动物死亡情况, 小鼠活动性及精神状态良好, 实验组与对照组体重变化无差异(图 4A)。

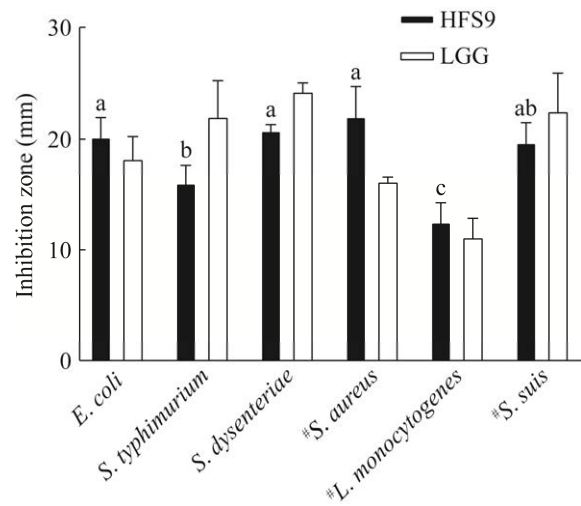


图 3 弯曲广布乳杆菌 HFS9 对 6 种常见人体致病菌的抑制作用 # : 革兰氏阳性菌; 不同小写字母表示差异显著. 下同

Figure 3 The antimicrobial effects of *Latilactobacillus curvatus* HFS9 against six common human pathogens. #: Gram-stain-positive bacteria; Different lowercase letters indicate significant differences. The same below.

喂食 DSS 后小鼠体重明显下降, DSS/HFS9 组小鼠体重下降较 DSS 组缓慢, 从第 5 天开始 DSS/HFS9 组体重高于 DSS 组 ($P < 0.05$), 且与 CT 组无明显差异; 与 CT 组相比, DSS 组小鼠 DAI 评分第 5 天起明显升高, 灌服 *L. curvatus* HFS9 6 d 后, 急性结肠炎小鼠 DAI 评分显著降低 ($P < 0.05$) (图 4B)。

结肠表型结果表明(图 4C), 在 DSS/HFS9 组, HFS9 可以恢复由 DSS 造成的结肠炎症性状的变化。结肠长度是 DSS 诱导急性结肠炎重要的定量指标^[39], 如图 4D 所示, DSS 组和 DSS/HFS9 组结肠长度与 CT 组相比明显缩短, 且 DSS/HFS9 组结肠显著长于 DSS 组 ($P < 0.01$)。组织病理学评分结果显示(图 4E), DSS 组 3-4 分评分占比高于 DSS/HFS9 组, 0-2 分评分占比低于 DSS/HFS9 组 ($P < 0.05$); 结肠组织镜观察表明,

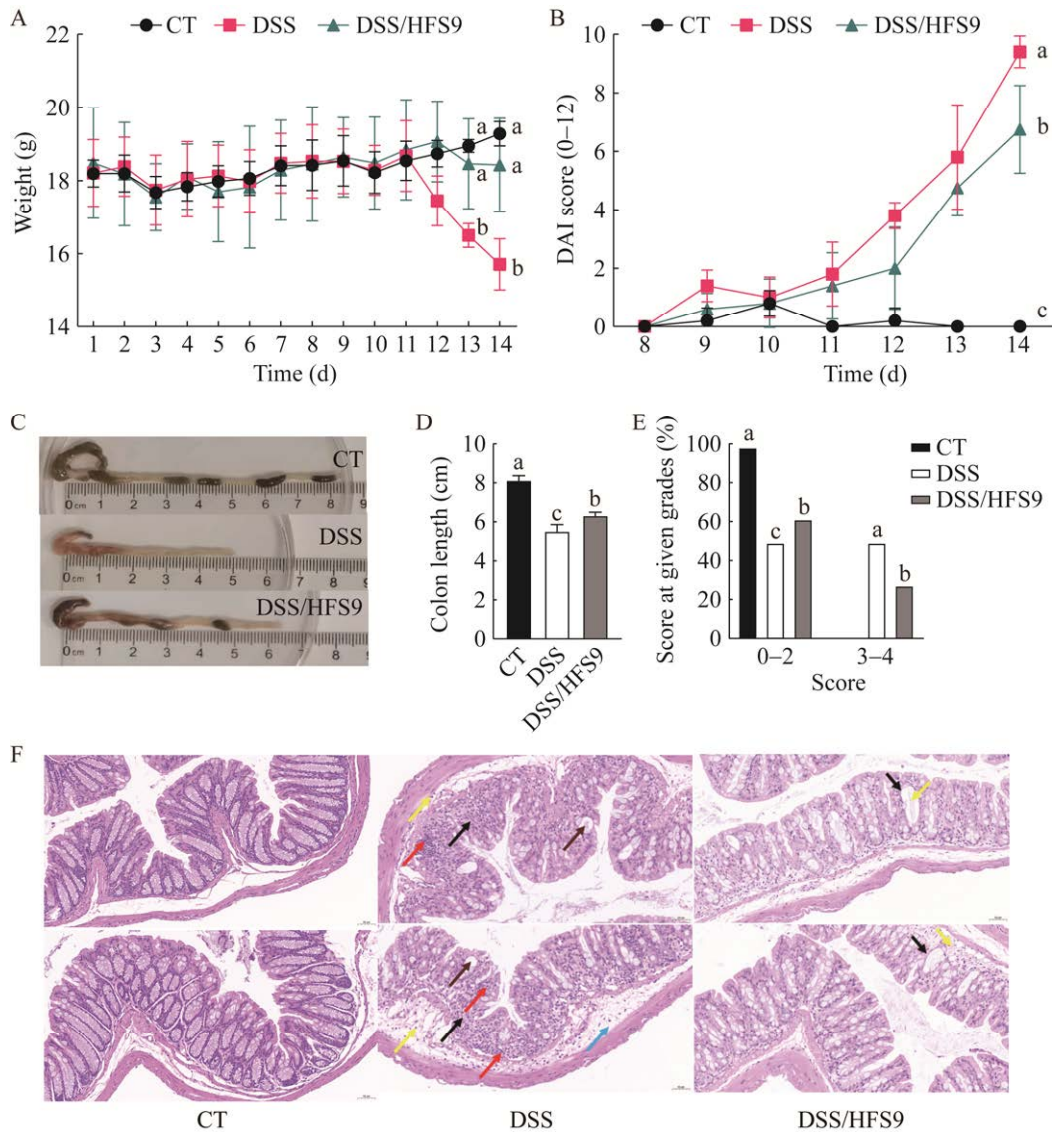


图 4 弯曲广布乳杆菌 HFS9 有效缓解 DSS 诱导小鼠结肠炎症状 A: 14 d 的体重变化. B: 7 d 的 DAI 评分. C: 结肠性状. D: 结肠长度. E: 组织病理学评分. F: 结肠 HE 染色切片图. CT: 正常对照组, 无病理; DSS: DSS 诱导的结肠炎组, 中度至重度组织病理学损伤; DSS/HFS9: HFS9 干预组, 轻微的组织病理学损伤. 黑色箭头: 结缔组织增生; 红色和黄色箭头: 分散的淋巴细胞浸润; 棕色箭头: 嗜碱性絮状物; 蓝色箭头: 黏膜下水肿, 结缔组织排列松弛; Bar=50 μ m. $n=5$

Figure 4 Administration of *Latilactobacillus curvatus* HFS9 alleviated the symptoms of DSS-induced colitis. A: Weight change for 14 days. B: DAI scores for 7 days. C: Representative images of colons. D: Quantification of the colon length. E: Histopathological score. F: Representative images of H&E stained sections of ascending colons from indicated groups. Control: Normal control group, no pathology; DSS: DSS-induced colitis group, moderate to severe histopathological damage; DSS/HFS9: DSS-induced colitis mice dosed with *Latilactobacillus curvatus* HFS9 group, slight histopathological damage. Black arrows: Proliferative connective tissue; Red & Yellow arrows: Scattered lymphocytic infiltration; Brown arrows: Basophilic flocs; Blue arrow: Submucosa edema, loose connective tissue arrangement; Bar=50 μ m. $n=5$.

DSS 组结肠组织大面积溃疡, 黏膜上皮脱落, 伴不同程度淋巴细胞浸润, 炎症多侵及黏膜下层; 而 DSS/HFS9 组结肠组织显示出较轻的病理症状, 可见局灶性溃疡, 伴散在淋巴细胞浸润, 偶见黏膜下层水肿(图 4F)。

3 讨论与结论

分布较广的物种通常具有开放的泛基因组, 不断从环境中获取遗传物质以适应恶劣的周围环境^[40]。同时, 开放的泛基因组也意味着物种内的基因交换频率更高^[41]。本研究基因组分析结果显示, *L. curvatus* 具有开放的泛基因组和保守的核心基因组, 其中核心基因约占 15%, 大部分的基因是可变的, 约占总基因含量的 85%, 这表明 *L. curvatus* 具有丰富的种内多样性。*L. curvatus* 核心基因多与细菌的基本生理功能相关, 反映了其对细菌生命活动调控的必要性。在此基础上, *L. curvatus* HFS9 的菌株特异性基因(*kdp* 系统)所富集代谢途径与环境适应性密切相关。*kdp* 系统能催化 ATP 的水解和 K^+ 进入细胞质的电转运, 保障各种生命活动的有序进行^[42], 该系统相关基因 *kdpA*、*kdpB*、*kdpC*、*kdpD*、*kdpE*、*kup* 等与钾离子的结合、能量耦合、催化、转录调节及跨膜转运等功能相关^[43-45]。*L. curvatus* 核心基因组仅注释到 *kup* 基因, 而 *L. curvatus* HFS9 菌株特异性基因中则注释到较为完整的 *kdp* 系统相关基因, 因此有助于 *kdp* 系统功能的发挥, 使 *L. curvatus* HFS9 更好地适应各类生境。

益生功能普遍存在菌株特异性, 基因组分析有助于发现特定菌株的益生相关基因与功能^[17]。研究表明, *atp* 基因有助于维持细菌细胞质的中性环境^[46], *relA* 基因与不同压力所诱导的耐受性建立相关^[47]; 而热休克蛋白 *groES* 和 *dnaJ* 则对长期抗酸胁迫起较大作用^[48]。同样地, *srtA* 基因在宿主表面的黏附机制中起作用^[49], *fbpA*

的缺失突变会导致菌株的体外黏附率降低 76%^[50]。*L. curvatus* HFS9 核心基因组中存在 *atp*、*relA*、*groES* 和 *dnaJ* 等耐受性相关基因, 以及 *srtA* 和 *fbpA* 等黏附相关基因, 表明该菌株可能具有在胃肠道恶劣环境中的存活能力和黏附于宿主肠道的能力^[51]。体外实验结果进一步证明 *L. curvatus* HFS9 对酸和胆盐的耐受性较强, 具有较高的自聚集能力和疏水性, 且对肠上皮细胞的黏附率也处于较高水平, 与相关研究报道的结果^[52-53]一致。因此可认为 *L. curvatus* HFS9 具有在肠道定殖的潜力, 这是益生菌株发挥相应功能的前提。

由于内源性抗氧化系统的抗氧化能力有限, 机体需要外源性调节剂或补充剂来减少氧化应激反应^[17]。微生物具有抗氧化系统来维持自由基水平的稳定, 因此被认为是调节氧化应激的重要工具^[54]。*L. curvatus* HFS9 核心基因组中存在抗氧化相关基因 *tpx* 和 *ytpP*, 分别编码硫醇特异性过氧化物酶和硫氧还蛋白, 可通过半胱氨酸硫醇-二硫键交换促进其他蛋白还原而起抗氧化剂作用^[55]。同时, *L. curvatus* HFS9 的菌株特异性基因中还存在 *ytpP*、*frnE*、*trxB* 和 *trxA* 等抗氧化相关益生基因。其中, *trxB* 基因编码硫氧还蛋白还原酶, 在氧气或二硫化物环境中起保护作用^[56]; *trxA* 则编码硫氧还蛋白 1, 参与抵抗二酰胺或 H_2O_2 引起的氧化应激反应^[57]。*L. curvatus* HFS9 在体外实验中也表现出较强的 DPPH 和羟自由基清除活性, 因此可认为具备一定的抗氧化能力。

研究表明, 益生菌可以通过竞争性结合受体、产生抗菌物质如细菌素和有机酸、加强肠道黏膜屏障作用和调节免疫系统等方式, 阻遏致病菌破坏肠道上皮屏障而抑制致病作用^[58]。作为抵御微生物入侵的第一道防线, 肠道上皮屏障损伤可导致肠道微生物紊乱, 也是炎症性

肠病发病的关键因素^[59]。目前,从 *L. curvatus* 分离得到的细菌素 curvacin A、sakacin G 和 curvaticin DN317 等,能抑制广泛的致病菌和腐败细菌,如单核细胞增多性李斯特菌,金黄色葡萄球菌和屎肠球菌等^[60-62]。乳杆菌能通过发酵胃肠道中的碳水化合物,产生甲酸、乙酸、琥珀酸和乳酸等有机酸,降低肠道 pH 值从而抑制致病菌的生长^[58]。体外实验结果显示, *L. curvatus* HFS9 对选取的 6 种常见人体致病菌具有一定的抑菌活性,但其基因组中并未发现产细菌素基因的存在;鉴于该菌株在 MRS 液体培养基中培养 24 h 后上清液 pH 值明显降低(由 6.18 降至 4.49),推测 *L. curvatus* HFS9 可能通过产生酸性物质发挥抑菌作用,但具体机制仍有待进一步研究。

候选益生菌菌株应当是安全且表现出很少或无抗生素耐药性^[63]。*L. curvatus* HFS9 对羊红细胞无裂解活性,且对本研究选用的大多数抗生素敏感,仅对万古霉素表现出抗性,此结果与 Zhang 等^[64]对 *L. curvatus* Z12 的研究一致;分析 *L. curvatus* HFS9 基因组发现其可移动元件噬菌体中并未注释到耐药基因,表明对万古霉素耐药性的转移风险较低;同时,灌服 *L. curvatus* HFS9 一周后的结果也表明该菌株在 1×10^8 CFU 剂量下对小鼠无明显毒副作用,但高剂量是否具有毒性作用还需证实。

基因组分析结合体外表型实验验证提示 *L. curvatus* HFS9 是一株较有潜力的益生菌,参照 Jo 等^[65]对 *L. curvatus* Wikim38 的研究,该菌株在小鼠体内发挥一定的抗炎作用,因此本研究选择 DSS 诱导小鼠急性结肠炎模型对 *L. curvatus* HFS9 体内益生作用进行初步评估。结果表明, *L. curvatus* HFS9 在 1×10^8 CFU 剂量下,缓解了 DSS 诱导结肠炎所导致的小鼠体重减轻和粪便性状改变,也对结肠组织病理学变化有所改善。

因此, *L. curvatus* HFS9 在体内具有一定的抗炎作用,其作用机制还需进一步探索研究。

综上所述,本研究采用基因组分析和表型实验相结合的方法明确了 *L. curvatus* HFS9 作为潜在益生菌的作用,并利用 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型初步证实了该菌株的体内抗炎功效,为 *L. curvatus* HFS9 进一步的研究与开发提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] CHEN Y, YU LL, QIAO NZ, XIAO Y, TIAN FW, ZHAO JX, ZHANG H, CHEN W, ZHAI QX. *Lactobacillus curvatus*: a candidate probiotic with excellent fermentation properties and health benefits[J]. *Foods*: Basel, Switzerland, 2020, 9(10): 1366.
- [2] ZHENG JS, WITTOUCK S, SALVETTI E, FRANZ CMAP, HARRIS HMB, MATTARELLI P, O' TOOLE PW, POT B, VANDAMME P, WALTER J, WATANABE K, WUYTS S, FELIS GE, Gänzle MG, LEBEER S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel Genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2782-2858.
- [3] HE YL, DING Y, WU QP, CHEN MT, ZHAO SE, ZHANG JM, WEI XH, ZHANG YX, BAI JL, MO SP. Identification of the potential biological preservative tetramycin A-producing strain and enhancing its production[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2925.
- [4] WANG X, LI DY, MENG ZY, KIM K, OH S. *Lactobacillus curvatus* BYB₃ isolated from kimchi alleviates dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice by inhibiting IL-6 and TNF-R1 production[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 32(3): 348-354.
- [5] JUNG JI, KIM YG, KANG CH, IMM JY. Effects of *Lactobacillus curvatus* MG5246 on inflammatory markers in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-sensitized human gingival fibroblasts and periodontitis rat model[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2022, 31(1): 111-120.
- [6] MANNA S, CHOWDHURY T, CHAKRABORTY R, MANDAL SM. Probiotics-derived peptides and their

- immunomodulatory molecules can play a preventive role against viral diseases including COVID-19[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(3): 611-623.
- [7] YOO SR, KIM YJ, PARK DY, JUNG UJ, JEON SM, AHN YT, HUH CS, MCGREGOR R, CHOI MS. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity[J]. *Obesity: Silver Spring, Md*, 2013, 21(12): 2571-2578.
- [8] CHAUDHARI NM, GUPTA VK, DUTTA C. BPGA-an ultra-fast pan-genome analysis pipeline[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24373.
- [9] DING W, BAUMDICKER F, NEHER RA. panX: Pan-genome analysis and exploration[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(1): e5.
- [10] HUANG Z, ZHOU XY, STANTON C, ROSS RP, ZHAO JX, ZHANG H, YANG B, CHEN W. Comparative genomics and specific functional characteristics analysis of *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1992.
- [11] ZOMMITI M, ALMOHAMMED H, FERCHICHI M. Purification and characterization of a novel anti-*Campylobacter* bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* DN₃₁₇[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2016, 8(4): 191-201.
- [12] BOUTTEFROY A, LINDER M, MILLIERE JB. Predictive models of the combined effects of curvaticin 13, NaCl and pH on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(6): 919-929.
- [13] VERLUYTEN J, MESSENS W, de VUYST L. Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2271-2278.
- [14] OLIVEIRA LC, SARAIVA TDL, SILVA WM, PEREIRA UP, CAMPOS BC, BENEVIDES LJ, ROCHA FS, FIGUEIREDO HCP, AZEVEDO V, SOARES SC. Analyses of the probiotic property and stress resistance-related genes of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 through comparative genomics and *in vitro* assays[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175116.
- [15] HEBERT EM, SAAVEDRA L, TARANTO MP, MOZZI F, MAGNI C, NADER MEF, FONT de VALDEZ G, SESMA F, VIGNOLO G, RAYA RR. Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 538-539.
- [16] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2014, 11(8): 506-514.
- [17] LEBEER S, VANDERLEYDEN J, de KEERSMAECKER SCJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2008, 72(4): 728-764.
- [18] CIUFO S, KANNAN S, SHARMA S, BADRETDIN A, CLARK K, TURNER S, BROVER S, SCHOCH CL, KIMCHI A, DICUCCIO M. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(7): 2386-2392.
- [19] LI RQ, LI YR, KRISTIANSEN K, WANG J. SOAP: Short oligonucleotide alignment program[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2008, 24(5): 713-714.
- [20] PATEL S, LU ZX, JIN XZ, SWAMINATHAN P, ZENG EL, FENNEL AY. Comparison of three assembly strategies for a heterozygous seedless grapevine genome assembly[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 57.
- [21] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [22] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [23] PRITCHARD L, GLOVER RH, HUMPHRIS S, ELPHINSTONE JG, TOTH IK. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(1): 12-24.
- [24] PAGE AJ, CUMMINS CA, HUNT M, WONG VK, REUTER S, HOLDEN MTG, FOOKES M, FALUSH D, KEANE JA, PARKHILL J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [25] CANTALAPIEDRA CP, HERNÁNDEZ-PLAZA A, LETUNIC I, BORK P, HUERTA-CEPAS J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic

- scale[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(12): 5825-5829.
- [26] SONG WC, SUN HX, ZHANG C, CHENG L, PENG Y, DENG ZQ, WANG D, WANG Y, HU M, LIU WE, YANG HM, SHEN Y, LI JH, YOU LC, XIAO MF. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W74-W80.
- [27] van HEEL AJ, JONG AD, MONTALBÁN-LÓPEZ M, KOK J, KUIPERS OP. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Web Server issue): W448-W453.
- [28] KONG YD, LI M, LI RM, SHAN XF, WANG GQ. Evaluation of cholesterol lowering property and antibacterial activity of two potential lactic acid bacteria isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa argus*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100342.
- [29] YANG SJ, KIM KT, KIM TY, PAIK HD. Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju[J]. *Foods: Basel, Switzerland*, 2020, 9(9): 1154.
- [30] RAGUL K, SYIEM I, SUNDAR K, SHETTY PH. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 54(13): 4473-4483.
- [31] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321.
- [32] SCHILLINGER U, LÜCKE FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 1901-1906.
- [33] ZULKHAIRI AMIN FA, SABRI S, ISMAIL M, CHAN KW, ISMAIL N, MOHD ESA N, MOHD LILA MA, ZAWAWI N. Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 17(1): 278.
- [34] ZHANG SW. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(29): 5194-5201.
- [35] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, GERLACH K, WEIGMANN B, FICHTNER-FEIGL S, NEURATH MF. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(7): 1295-1309.
- [36] WANG LF, XIE H, XU L, LIAO Q, WAN S, YU ZL, LIN DT, ZHANG BB, LV ZY, WU ZD, et al. rSj16 protects against DSS-induced colitis by inhibiting the PPAR- α signaling pathway[J]. *Theranostics*, 2017, 7(14): 3446-3460.
- [37] PETTI CA, POLAGE CR, SCHRECKENBERGER P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(12): 6123-6125.
- [38] DÜZ M, DOĞAN YN, DOĞAN İ. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains isolated from fermented Turkish Sucuk[J]. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 2020, 92(4): e20200105.
- [39] BIAN XY, WU WR, YANG LY, LV LX, WANG Q, LI YT, YE JZ, FANG DQ, WU JJ, JIANG XW, SHI D. Administration of *Akkermansia muciniphila* ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2259.
- [40] LI ZZ, SONG Q, WANG MM, REN JL, LIU SL, ZHAO SC. Comparative genomics analysis of *Pediococcus acidilactici* species[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(6): 573-583.
- [41] KELLEHER P, BOTTACINI F, MAHONY J, KILCAWLEY KN, van SINDEREN D. Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights into evolution and niche adaptation[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 267.
- [42] BALLAL A, BASU B, APTE SK. The Kdp-ATPase system and its regulation[J]. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(3): 559-568.
- [43] LIU XF, WANG C, YAN B, LYU LD, TAKIFF HE, GAO Q. The potassium transporter KdpA affects persister formation by regulating ATP levels in *Mycobacterium marinum*[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 129-139.
- [44] SWEET ME, LARSEN C, ZHANG XH, SCHLAME M, PEDERSEN BP, STOKES DL. Structural basis for potassium transport in prokaryotes by KdpFABC[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(29): e2105195118.
- [45] SILBERBERG JM, COREY RA, HIELKEMA L,

- STOCK C, STANSFELD PJ, PAULINO C, HÄNELT I. Deciphering ion transport and ATPase coupling in the intersubunit tunnel of KdpFABC[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 5098.
- [46] DUARY RK, BATISH VK, GROVER S. Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* acidic conditions using RT-qPCR[J]. *Research in Microbiology*, 2010, 161(5): 399-405.
- [47] SRIVATSAN A, WANG JD. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(2): 100-105.
- [48] LORCA GL, FONT de VALDEZ G, LJUNGH A. Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2002, 4(6): 525-532.
- [49] MARRAFFINI LA, DEDENT AC, SCHNEEWIND O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2006, 70(1): 192-221.
- [50] BUCK BL, ALTERMANN E, SVINGERUD T, KLAENHAMMER TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8344-8351.
- [51] GHATTARGI VC, GAIKWAD MA, METI BS, NIMONKAR YS, DIXIT K, PRAKASH O, SHOUCHE YS, PAWAR SP, DHOTRE DP. Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 652.
- [52] LUAN C, JIANG N, ZHOU XL, ZHANG C, ZHAO YP, LI ZQ, LI C. Antibacterial and anti-biofilm activities of probiotic *Lactobacillus curvatus* BSF206 and *Pediococcus pentosaceus* AC1-2 against *Streptococcus mutans*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 164: 105446.
- [53] KIM SK, JANG WJ, KIM CE, LEE SJ, JEON MH, KIM TY, LEE HT, PARK JH, KIM CH, LEE JM, LEE EW. Characterization of *Latilactobacillus curvatus* MS2 isolated from Korean traditional fermented seafood and cholesterol reduction effect as synbiotics with isomalto-oligosaccharide in BALB/c mice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 571: 125-130.
- [54] FARR SB, KOGOMA T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(4): 561-585.
- [55] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75-87.
- [56] BALLAL A, MANNA AC. Control of thioredoxin reductase gene (*trxB*) transcription by *SarA* in *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 336-345.
- [57] LI KY, PASTERNAK C, KLUG G. Expression of the *trxA* gene for thioredoxin 1 in *Rhodobacter sphaeroides* during oxidative stress[J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(6): 484-489.
- [58] van ZYL WF, DEANE SM, DICKS LMT. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1831339.
- [59] LEE M, CHANG EB. Inflammatory bowel diseases (IBD) and the microbiome—Searching the crime scene for clues[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(2): 524-537.
- [60] CASTELLANO P, BELFIORE C, FADDA S, VIGNOLO G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in *Argentina*[J]. *Meat Science*, 2008, 79(3): 483-499.
- [61] RIVAS FP, CASTRO MP, VALLEJO M, MARGUET E, CAMPOS CA. Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface[J]. *Meat Science*, 2014, 97(4): 475-479.
- [62] CASTRO MP, PALAVECINO NZ, HERMAN C, GARRO OA, CAMPOS CA. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production[J]. *Meat Science*, 2011, 87(4): 321-329.
- [63] GUEIMONDE M, SÁNCHEZ B, de LOS REYES-GAVILÁN CG, MARGOLLES A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 202.
- [64] ZHANG Y, LIANG S, ZHAO MD, YANG X, CHOI SH, LI GY. Screening and identification of *Latilactobacillus curvatus* Z12 from rumen fluid of an adult female Sika Deer as a potential probiotic for feed additives[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 753527.
- [65] JO SG, NOH EJ, LEE JY, KIM G, CHOI JH, LEE ME, SONG JH, CHANG JY, PARK JH. *Lactobacillus curvatus* WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice[J]. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2016, 54(7): 503-509.