

## 研究报告

## 新疆双峰驼源枯草芽孢杆菌的分离及全基因组分析

吴贝灵<sup>1</sup>, 杨蓉<sup>1</sup>, 崔卫东<sup>1</sup>, 买尔哈巴·艾合买提<sup>1</sup>, 侯新强<sup>1</sup>, 侯敏<sup>\*1</sup>, 陈钢粮<sup>\*2</sup>

1 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

2 新疆旺源生物科技集团有限公司, 新疆 阿勒泰 836400

吴贝灵, 杨蓉, 崔卫东, 买尔哈巴·艾合买提, 侯新强, 侯敏, 陈钢粮. 新疆双峰驼源枯草芽孢杆菌的分离及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 846-863.

WU Beiling, YANG Rong, CUI Weidong, Maierhaba·Aihemaiti, HOU Xinqiang, HOU Min, CHEN Gangliang. Isolation and genome-wide analysis of *Bacillus subtilis* from Bactrian camels in Xinjiang[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 846-863.

**摘要:**【背景】以常规可培养方法从驼乳和驼粪中分离出3株枯草芽孢杆菌,对体外益生效果较突出的菌株F10431进行全基因组测序。【目的】探究分离菌株的益生潜力,了解其功能基因和遗传基础,为该菌的应用和研究打下理论基础。【方法】采用体外法对枯草芽孢杆菌F10431、2N2N和2N13N的产酶能力、耐受能力、抑菌效果和饲用安全性进行益生评价,利用二代+三代测序技术对其进行全基因组预测和功能注释。【结果】三株枯草芽孢杆菌有一定的耐酸、耐胆盐能力,其中,F10431耐肠液、胃液能力最强;都有较好的产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和抗氧化酶的能力,菌株F10431蛋白酶活性为(3.17±0.26) nmol/(min·mL)、淀粉酶活性为(0.48±0.04) nmol/(min·mL)、纤维素酶活性为(151.02±8.05) μg/(min·mL)、超氧化物歧化酶活性为(1.81±0.31) μmol/(min·mL);菌株F10431对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑制效果明显,但对沙门氏菌抑制较弱;溶血性测试均不产生溶血环,饲用安全。【结论】本研究分离出3株益生性能优良的驼源枯草芽孢杆菌,对体外益生效果较突出的菌株F10431进行全基因组测序,将测序数据提交至NCBI获得GenBank登录号为MW721260。从基因层面阐明了其益生菌特性的功能机制和基因组特征,为相关益生菌制剂的应用提供了理论支持。

**关键词:** 新疆双峰驼源; 枯草芽孢杆菌; 益生菌; 全基因组

资助项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金计划-新疆少数民族科技人才特殊培养(2021D03002); 新疆维吾尔自治区乡村振兴产业发展科技行动项目(2020NC013); 新疆维吾尔自治区重点研发任务专项项目(2022B02042); 新疆维吾尔自治区重点研发计划(2022B02056-2)

This work was supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation Program-Special Cultivation of Ethnic Minority Scientific and Technological Talents in Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D03002), the Xinjiang Uygur Autonomous Region Scientific and Technological Action Project for Rural Revitalization and Industrial Development (2020NC013), the Xinjiang Uygur Autonomous Region Key Research and Development Tasks Special Project (2022B02042), and the Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022B02056-2).

\*Corresponding authors. E-mail: HOU Min, hmde\_092@163.com; CHEN Gangliang, 3297894401@qq.com

Received: 2023-08-22; Accepted: 2023-09-20; Published online: 2023-12-08

# Isolation and genome-wide analysis of *Bacillus subtilis* from Bactrian camels in Xinjiang

WU Beiling<sup>1</sup>, YANG Rong<sup>1</sup>, CUI Weidong<sup>1</sup>, Maierhaba·Aihemaiti<sup>1</sup>, HOU Xinqiang<sup>1</sup>, HOU Min<sup>\*1</sup>, CHEN Gangliang<sup>\*2</sup>

1 Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

2 Xinjiang Wangyuan Biotechnology Group Limited Company, Aletai 836400, Xinjiang, China

**Abstract: [Background]** Three strains of *Bacillus subtilis* were isolated from camel milk and feces by the conventional culture method, and genome sequencing was performed for strain F10431 with strong probiotic effects *in vitro*. **[Objective]** To explore the probiotic potential, functional genes, and genetic basis of the isolates, so as to lay a theoretical foundation for the application and research of *B. subtilis*. **[Methods]** The enzyme production, stress tolerance, antimicrobial effect, and feeding safety of *B. subtilis* F10431, 2N2N, and 2N13N were evaluated *in vitro*. The second- and third-generation sequencing was performed for the whole genome and functional gene annotation of the isolates. **[Results]** The three strains of *B. subtilis* had tolerance to acids and bile salt, and strain F10431 had the strongest tolerance to intestinal and gastric fluids. All of the strains were capable of producing protease, amylase, cellulase, and antioxidant enzymes. Particularly, strain F10431 showed the protease activity of  $(3.17 \pm 0.26)$  nmol/(min·mL), the amylase activity of  $(0.48 \pm 0.04)$  nmol/(min·mL), the cellulase activity of  $(151.02 \pm 8.05)$   $\mu$ g/(min·mL), and the superoxide dismutase activity of  $(1.81 \pm 0.31)$   $\mu$ mol/(min·mL). The strains exerted strong inhibitory effects on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and weak inhibitory effects on *Salmonella*. None of the strains produced hemolysis ring, thus being safe for feeding. **[Conclusion]** In this study, three camel-derived *B. subtilis* strains with excellent probiotic properties were isolated. F10431 with outstanding probiotic effects *in vitro* was sequenced, and the sequencing data were submitted to NCBI to obtain the GenBank accession number of MW721260. This study elucidated the functional mechanism and genomic characterization of F10431, providing theoretical support for the application of relevant probiotic preparations.

**Keywords:** isolates derived from Bactrian camel in Xinjiang; *Bacillus subtilis*; probiotics; whole genome

益生菌作为一种对宿主健康有益的天然治疗剂, 具有安全、无污染和不含残留化合物等特点<sup>[1]</sup>, 其通过平衡宿主的肠道微生态系统, 丰富肠道菌群, 进而提高免疫力并缓解疾病症状<sup>[2-3]</sup>。枯草芽孢杆菌是一种代表性益生菌, 广泛分布在土壤及腐败的有机物中<sup>[4]</sup>, 具有生长速度快、营养丰富等特点, 由于其产生的孢子对外界环境有

极强的耐受力, 并能产生对多种革兰氏阳性和阴性细菌具有抗菌活性的多肽, 因此芽孢杆菌拥有广阔的应用前景<sup>[5-8]</sup>。此外, 枯草芽孢杆菌可以提高机体免疫力<sup>[9]</sup>、调节肠道微生态平衡<sup>[10]</sup>、提高机体抗氧化能力<sup>[11]</sup>和饲料转化率<sup>[12]</sup>等。

骆驼是新疆重要的畜种资源, 这些反刍动物在寒冷、干旱的环境中生活繁衍, 自然选择

造就了骆驼耐寒、耐旱、耐粗饲和适应性强的特性<sup>[13]</sup>，它特有的肠道微生物菌系也促进了其适应恶劣环境的能力，是极好的抗逆材料和益生菌来源<sup>[14]</sup>。根据前人的研究发现骆驼乳能够辅助治疗糖尿病、肝炎等<sup>[15]</sup>，因此，挖掘驼源微生物资源，了解其生理特征和基因组信息，对骆驼奶的开发以及应用驼源益生菌作为饲料添加剂有重要意义。

在此之前，枯草芽孢杆菌的基因组分析主要来自土壤、植物等，从骆驼身上研究较少，本试验拟通过形态学观察、16S rRNA 基因测序等方法，从骆驼乳和粪便中分离出可培养菌株，通过其耐酸能力、耐胆盐能力、耐肠胃液能力、产酶能力、抑菌性和是否溶血等指标进行体外益生特性评价。此外，本研究基于 Illumina 平台和 Nanopore 平台对益生效果较突出的 *Bacillus subtilis* F10431 进行了全基因组二代+三代测序，通过分析其基因组组成成分、系统进化关系和基因功能注释等，为作为益生菌的潜力提供进一步的研究和参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

采自新疆阿勒泰地区吉木乃县万驼园(10±2)岁健康双峰泌乳骆驼直肠粪便、驼乳，通过传统可培养方式，共分离出63株驼源细菌，根据参考文献[16]中的规定进行同源性比对，通过MEGA 7.0软件中的Neighbor-Joining (NJ)法构建系统发育树，筛选出3株与枯草芽孢杆菌具有高度亲缘性的菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 进行后续试验，登录号分别为 MW721260 (F10431)、OL989244 (2N2N) 和 MW721308 (2N13N)<sup>[17]</sup>。

活化指示菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌)和芽孢杆菌由新疆农业科学院微

生物应用研究所提供。

### 1.2 培养基和主要试剂、仪器

血琼脂培养基，广东环凯微生物科技有限公司；LB培养基，赛默飞世尔科技公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司；胃蛋白酶、胰蛋白酶和牛胆碱，国药集团化学试剂有限公司。恒温培养箱，上海福玛实验设备有限公司；摇床和离心机，上海博迅医疗生物仪器公司；酶标仪和PCR扩增仪，杭州博日科技有限公司。

模拟胃液：生理盐水 100 mL，pH 3.0，胃蛋白酶 0.3 g，0.22 μm 无菌滤膜过滤。

模拟肠液：生理盐水 100 mL，pH 8.0，胰蛋白酶 0.1 g，牛胆碱 0.9 g，0.22 μm 无菌滤膜过滤。

### 1.3 枯草芽孢杆菌的分离鉴定

#### 1.3.1 菌株的分离培养

取 10 g 新鲜粪便和 10 mL 驼乳分别置于 100 mL 和 90 mL 无菌水中，混合均匀后取上层悬浮液 1 mL 置于 9 mL 无菌水中混匀，重复以上步骤，稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup> 后分别取 100 μL 涂布于 LB 固体培养基表面，37 °C 恒温培养箱中培养 24 h，挑取疑似枯草芽孢杆菌的单个菌落，多次接种于 LB 培养基上划线分离纯化，并进行甘油保藏。

#### 1.3.2 16S rRNA 基因序列分析鉴定

细菌基因组的提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明进行。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 来扩增 16S rRNA 基因序列，PCR 反应体系：1×Taq PCR Green Mix 预混液 25 μL，引物 27F 和 1492R (10 μmol/L) 各 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 23 μL。PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 30 s，54 °C 30 s，72 °C 1 min 30 s，35 个循环；72 °C 10 min<sup>[18]</sup>。反应结束后用 2.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物，

将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司检测,扩增产物测序结果在 EzBioCloud 中与典型菌种进行比对,选取与分离菌株相似度最高的标准株,并通过 MEGA 7.0 构建系统发育树。

## 1.4 菌株的生物学特性测定

### 1.4.1 产酶活性测定

将所筛的 3 株芽孢杆菌从 LB 培养平板上挑取下来,分别接种至装有 50 mL 的液体 LB 培养基锥形瓶中,于 37 °C、180 r/min 培养 24 h,制成培养液;按照 5%的接种量接种至 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养 24 h,于 4 000 r/min、4 °C离心 10 min,上清液即为粗酶液,测粗酶液蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、氨基比林-*N*-脱甲基酶活性和细胞色素 b5 含量,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

### 1.4.2 耐受性测定

#### 1) 耐酸性试验

将枯草芽孢杆菌点接到 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 条件下培养 24 h,制成菌悬液。将菌悬液按 2%的接种量分别接种到 pH 2.0、pH 3.0 的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养,分别在 0、2、4 和 6 h 测其  $OD_{600}$  值。

#### 2) 耐胆盐试验

将菌悬液按 2%的接种量分别接种到胆盐含量为 0.5%、1.0% (质量体积分数)的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养,分别在 0、2、4 和 6 h 测其  $OD_{600}$  值<sup>[19]</sup>。

#### 3) 人工胃液耐受

将菌悬液按 2%的接种量接入人工胃液中,37 °C、180 r/min 培养,在 0、2、4 和 6 h 进行活菌平板菌落计数。

#### 4) 人工肠液耐受

将菌悬液按 2%的接种量接入人工肠液中,37 °C、180 r/min 培养,在 0、2、4 和 6 h

进行活菌平板菌落计数。

### 1.4.3 体外抑菌试验

采用打孔法测定 F10431、2N2N 和 2N13N 菌株的抑菌活性。调整活化指示菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌)和芽孢杆菌的菌浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL,取指示菌 100  $\mu$ L 用涂布棒均匀涂布于 NA 平板,用无菌打孔器在平板上打孔后往孔中加入 100  $\mu$ L 枯草芽孢杆菌菌液,将平板置于 37 °C 恒温箱培养 24 h 后测抑菌圈直径<sup>[20]</sup>。

### 1.5 溶血性试验

将活化好的枯草芽孢杆菌点接在血琼脂培养基上,37 °C 静置培养 16 h,观察是否有溶血圈出现,判断其是否具有溶血性。

## 1.6 全基因组分析

### 1.6.1 DNA 的提取

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取样本的基因组 DNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性,DNA 样品检测合格后送北京诺禾致源生物科技有限公司采用 Illumina NovaSeq 6000 测序系统进行全基因组测序<sup>[21]</sup>。

### 1.6.2 基因组的测序与组装

使用 Qubit 2.0 进行初步定量,稀释文库至 2 ng/ $\mu$ L,随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段进行检测,插入片段符合预期后,使用 q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,库检合格后将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量进行 Nanopore PromethION 和 Illumina NovaSeq PE150 测序。原始下机数据经 fastp<sup>[22]</sup> 软件进行数据过滤和质控,利用 SPAdes<sup>[23]</sup> 软件对质控生成的有效数据进行组装和拼接,通过 GapFiller<sup>[24]</sup> 软件对 scaffolds 进行补洞。采用 QUAST 软件<sup>[25]</sup> 对基因组的基本信息进行统计;使用 CheckM 软件<sup>[26]</sup> 评估基因组的完整度和污染率;利用 GCView 软件<sup>[27]</sup> 绘制分离菌株

的基因组环形图谱。

### 1.6.3 基因组功能注释与预测

用 Prokka 软件对细菌基因组草图进行注释, 并与 carbohydrate-active enzymes (CAZy)、Koyto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)、clusters of orthologous genes (COG)、gene ontology (GO)、non-redundant protein database (NR)和 transporter classification database (TCDB)等数据库比对进行细菌基因组的快速注释。使用 BLAST Ring Image Generator (BRIG)软件绘制菌株基因组环形图谱。最后使用 PhyloPhlAn 对菌株的遗传进化关系进行分析, 通过系统发育树可视化工具 Interactive Tree of Life (iTOL)进行编辑。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离鉴定结果

通过稀释涂布平板法和划线法从驼粪中得到一株枯草芽孢杆菌 F10431, 驼乳中得到 2 株

枯草芽孢杆菌 2N2N 和 2N13N。菌落形态呈圆形、表面平整、不光滑、无光泽、边缘不整齐。分子鉴定方面, 通过将扩增片段的测序结果与 EzBioCloud 标准株进行比对, 其与枯草芽孢杆菌具有极高的相似性(图 1), 由此确定该 3 株菌为枯草芽孢杆菌, 并将其序列上传至 GenBank, 分别获得登录号 MW721260 (F10431)、OL989244 (2N2N)和 MW721308 (2N13N)。

### 2.2 菌株的生物学特性

#### 2.2.1 耐受性试验结果

动物胃中的 pH 值为 2.0–4.0, 食物在胃中的排空时间为 2–3 h。益生菌需在 pH 3.0 的条件下存活 1.5–2.0 h, 因此筛选具有耐酸潜力的益生菌至关重要<sup>[28]</sup>。进一步考察 3 株枯草芽孢杆菌在 pH 2.0、3.0 条件下处理 6 h 后的  $OD_{600}$  值。耐酸试验表明(图 2A、图 2B), 3 株枯草芽孢杆菌在 pH 2.0 和 pH 3.0 的环境中, 随着时间的增长  $OD_{600}$  检测值有不同程度的减小, 其中 2 h 时下降最明显, 随后比较平缓, 综合表现出

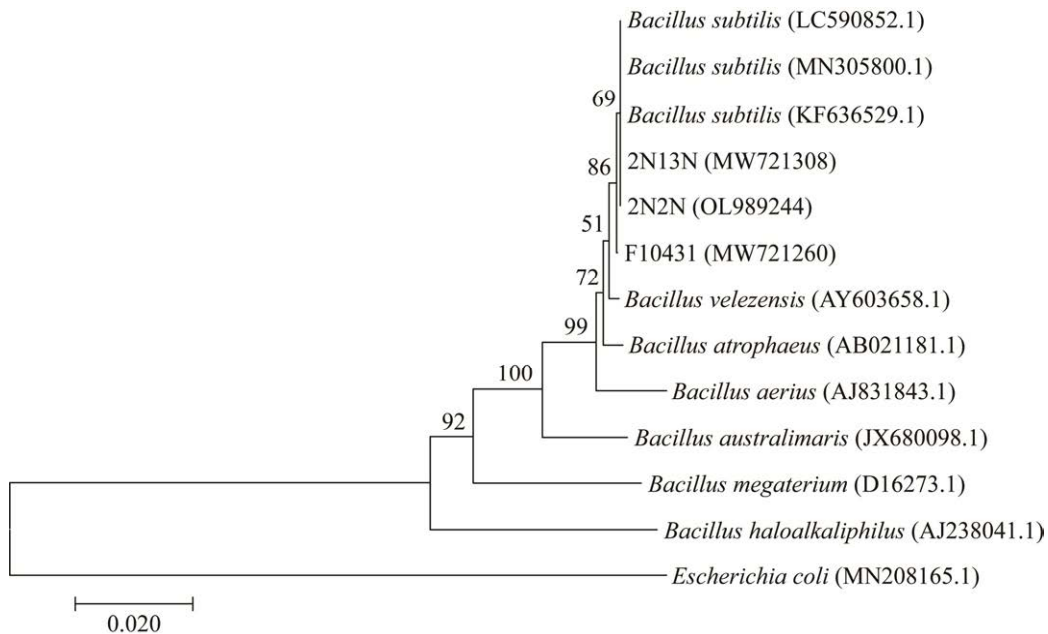


图 1 三株驼源菌株的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 3 camel-derived strains.

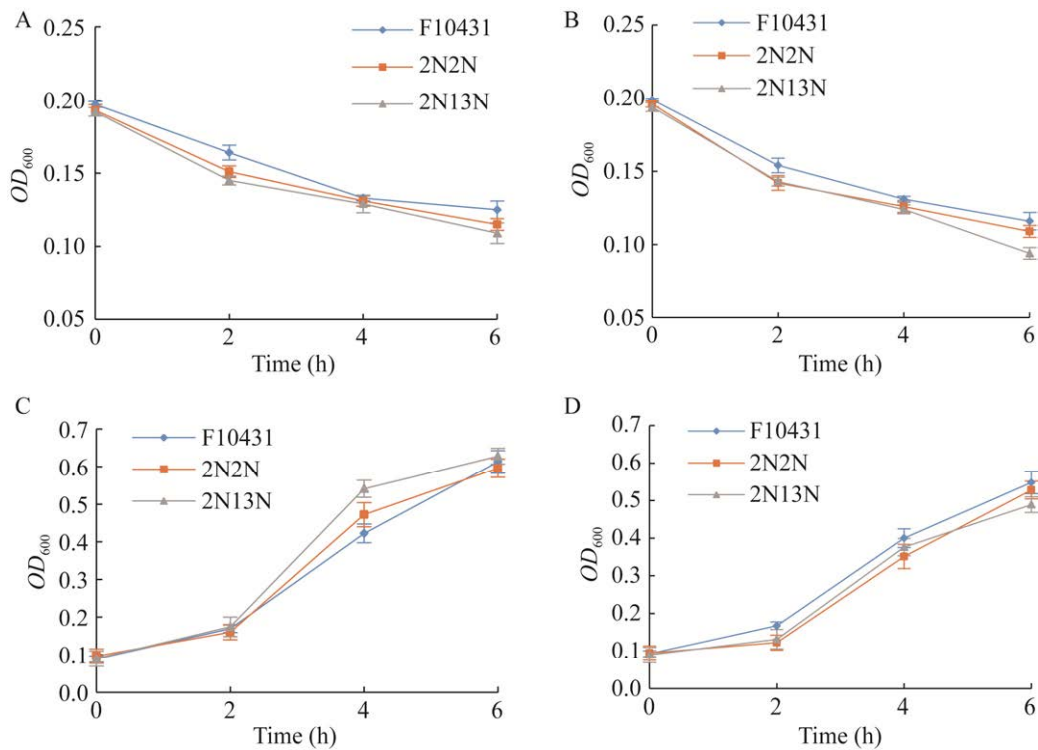


图2 不同条件下细菌生长变化情况 A: pH 2.0. B: pH 3.0. C: 胆盐浓度 0.5% (质量体积分数). D: 胆盐浓度 1.0% (质量体积分数)

Figure 2 Bacterial growth under different conditions. A: pH 2.0. B: pH 3.0. C: Bile salt concentration 0.5% (mass volume fraction). D: Bile salt concentration 1.0% (mass volume fraction).

一定的耐受性, 同比, 菌株 F10431 的耐酸性更佳。

高浓度的胆盐可以改变细胞膜的通透性, 分解膜蛋白, 从而导致细胞破裂和死亡, 拮抗益生菌的生长<sup>[29]</sup>。从耐胆盐试验看出(图2C、2D), 3株菌株的耐盐性差别不大, 其 OD<sub>600</sub> 值在 0.5%和 1.0% (质量体积分数)的胆盐浓度中随着时间的增长逐渐增大, 在 4 h 时增长最明显, 表明菌仍能生长, 只是相对于 0.5%胆盐浓度环境, 1.0%的胆盐浓度环境延缓了菌的生长。这些表明这 3 株枯草芽孢杆菌具有较强的耐胆盐能力。

低 pH 的胃液是益生菌进入肠道的首要关口, 通常胃酸的 pH 值为 2.0–3.0<sup>[30]</sup>。由表 1 可知, 3 株菌在模拟胃液中的差异性较大, 且存活

率随着时间的增长逐渐降低。其中菌株 F10431 初始活菌数为  $1.21 \times 10^7$  CFU/mL, 胃液处理 6 h 后为  $1.19 \times 10^7$  CFU/mL, 存活率为 98.35%, 菌株 2N2N 处理 6 h 的存活率为 88.06%, 菌株 2N13N 的存活率下降最明显, 胃液处理 6 h 后存活率仅为 4.67%。因此, 在胃液耐受能力方面菌株 F10431 > 菌株 2N2N > 菌株 2N13N, 表明菌株 F10431 和菌株 2N2N 在与食糜混合后能够在胃环境存活并到达肠道发挥作用。

由表 2 可知, 在肠液耐受试验中, 菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 都表现出很好的肠液耐受性, 模拟肠液处理 6 h 后存活率均大于 70%, 其中菌株 F10431 表现强势, 初始的活菌数为  $1.35 \times 10^7$  CFU/mL, 经过人工肠液 6 h 处理后活菌数为  $1.46 \times 10^7$  CFU/mL, 增长 8.15%。

菌株 2N2N 和菌株 2N13N 在肠液中处理 6 h 后存活率分别为 71.33% 和 92.41%。因此, 在肠液耐受能力方面菌株 F10431 > 菌株 2N13N > 菌株 2N2N, 3 株菌均能在动物肠道中存活, 足以保证有足够数量的菌株在宿主肠道发挥潜在作用。

耐受性试验表明, 菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 都具有一定的耐酸、耐胆盐和耐肠胃液能力, 而菌株 F10431 的综合耐受能力更强, 具备开发成为益生菌的潜力。

### 2.2.2 产酶活性测定结果

从表 3 可知, 3 株枯草芽孢杆菌具有较好的产酶能力, 其中菌株 2N2N 表现出较高的蛋白酶活性、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性和细胞色素 b5 含量, 分别为 3.59 nmol/(min·mL), 1.75 nmol/(min·mL) 和 1.02 nmol/mL; 菌株 2N13N 有较高的纤维素酶活性, 为 151.95  $\mu$ g/(min·mL); 菌株 F10431 的淀粉酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和氨基比林-N-脱甲基酶活性最高。综合来看, 菌

表 1 菌株在胃液中的活菌数

Table 1 Viable bacterial counts of strains in gastric fluid (CFU/mL)

Time (h)	F10431	2N2N	2N13N
0	(1.21±0.02)×10 <sup>7</sup>	(1.34±0.05)×10 <sup>7</sup>	(1.05±0.01)×10 <sup>7</sup>
2	(1.22±0.11)×10 <sup>7</sup>	(1.27±0.14)×10 <sup>7</sup>	(1.41±0.05)×10 <sup>7</sup>
4	(1.20±0.04)×10 <sup>7</sup>	(1.27±0.01)×10 <sup>7</sup>	(3.63±0.08)×10 <sup>6</sup>
6	(1.19±0.03)×10 <sup>7</sup>	(1.18±0.07)×10 <sup>7</sup>	(4.90±0.12)×10 <sup>5</sup>

表 2 菌株在肠液中的活菌数

Table 2 Viable bacterial counts of the strains in the intestinal fluid (CFU/mL)

Time (h)	F10431	2N2N	2N13N
0	(1.35±0.08)×10 <sup>7</sup>	(1.43±0.02)×10 <sup>7</sup>	(1.45±0.02)×10 <sup>7</sup>
2	(1.29±0.03)×10 <sup>7</sup>	(1.38±0.05)×10 <sup>7</sup>	(1.41±0.06)×10 <sup>7</sup>
4	(1.17±0.03)×10 <sup>7</sup>	(1.16±0.05)×10 <sup>7</sup>	(1.38±0.10)×10 <sup>7</sup>
6	(1.46±0.06)×10 <sup>7</sup>	(1.02±0.04)×10 <sup>7</sup>	(1.34±0.08)×10 <sup>7</sup>

表 3 三株驼源菌产酶能力测定

Table 3 Determination of enzyme-producing ability of 3 camelidogenic bacteria strains

Item	F10431	2N2N	2N13N
蛋白酶活性 Protease activity (nmol/(min·mL))	3.17±0.26	3.59±0.18	2.73±0.31
淀粉酶活性 Amylase activity (mg/(min·mL))	0.48±0.04	0.44±0.05	0.39±0.05
纤维素酶活性 Cellulase activity ( $\mu$ g/(min·mL))	151.02±8.05	143.87±9.89	151.95±10.32
超氧化物歧化酶活性 Superoxide dismutase activity ( $\mu$ mol/(min·mL))	1.81±0.31	1.09±0.26	0.86±0.11
过氧化氢酶活性 Catalase activity (nmol/(min·mL))	1.37±0.22	1.10±0.08	0.73±0.06
$\alpha$ -葡萄糖苷酶活性 $\alpha$ -glucosidase activity (nmol/(min·mL))	1.56±0.17	1.75±0.13	1.36±0.09
氨基比林-N-脱甲基酶活性 Aminopyrine-N-demethylase activity (nmol/(min·mL))	9.36±0.29	4.14±0.18	5.85±0.10
细胞色素 b5 含量 Cytochrome b5 content (nmol/mL)	0.67±0.18	1.02±0.20	0.63±0.11



株 F10431 的综合产酶能力较突出, 且具有优良的消化和抗氧化能力, 有成为饲用益生菌的潜力。

### 2.2.3 体外抑菌试验结果

以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌为指示菌进行抑菌性分析, 如图 3A–3C 所示, 菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 在金黄色葡萄球菌和大肠杆菌平板上能形成鲜明的透明圈, 具有明显的抑菌效果, 对沙门氏菌抑制效果不明显。

### 2.2.4 溶血性试验结果

一些菌株在血平板上培养时菌落周围会形成明显的透明溶血环, 大多数溶血性菌株是致病性的。供试菌的溶血性试验结果见图 3D, 3 株菌落呈灰白色, 不透明, 似白色毛玻璃状, 菌落周围未出现溶血环, 说明其是安全的, 缺乏

溶血素, 不会产生机会性毒力<sup>[31]</sup>。

## 2.3 全基因组分析结果

### 2.3.1 测序与组装分析

采用二代+三代技术对菌株 F10431 进行全基因组测序, 绘制了菌株 F10431 的基因组环形图谱, 如图 4 所示。菌株 F10431 染色体全基因组序列全长为 4 377 942 bp, N50 的长度为 21 827 bp, G+C 含量为 43.51%。预测到编码基因个数为 4 642 个, 长度 3 895 227 bp, 平均长度为 839 bp, 占整个基因组序列的 88.97%。其中预测到 8 个基因岛(genomics islands, GIs), 10 个前噬菌体(prophage)和 1 条 CRISPR 结构。重复序列在基因组中共观察到 270 个散在重复序列, 130 个串联重复序列。非编码 RNA 中 tRNA 有 99 个、rRNA 有 30 个、sRNA 有 16 个被注释, 菌株 F10431 的登录号为 MW721260。

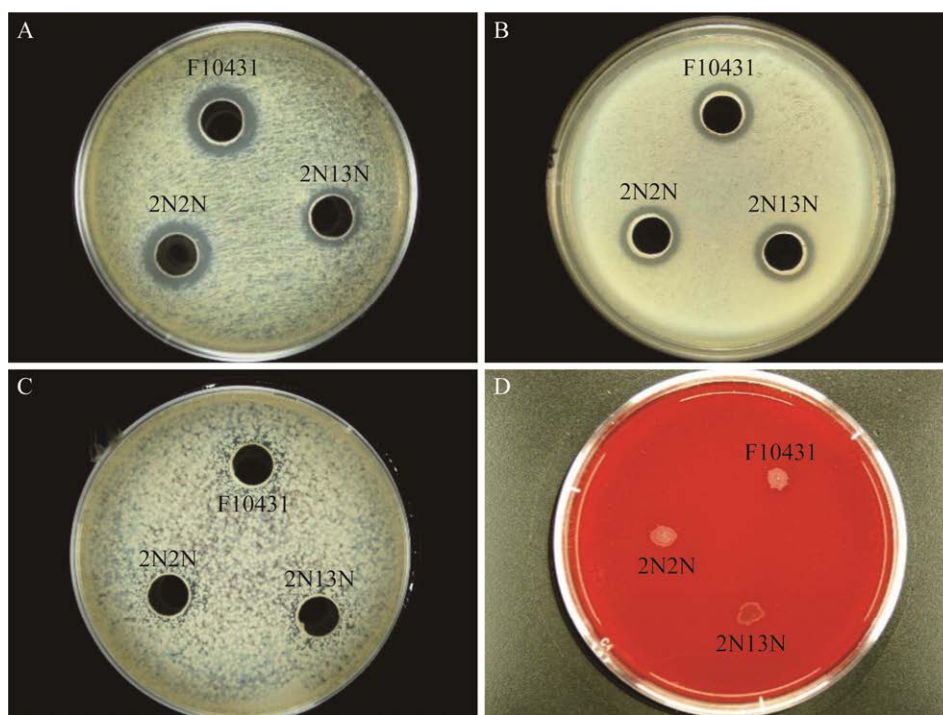


图 3 菌株的抑菌效果及溶血性试验 A: 金黄色葡萄球菌. B: 大肠杆菌. C: 沙门氏菌. D: 溶血试验

Figure 3 Bacteriostatic effect and hemolytic test of strain. A: *Staphylococcus aureus*. B: *Escherichia coli*. C: *Salmonella*. D: Hemolytic test.



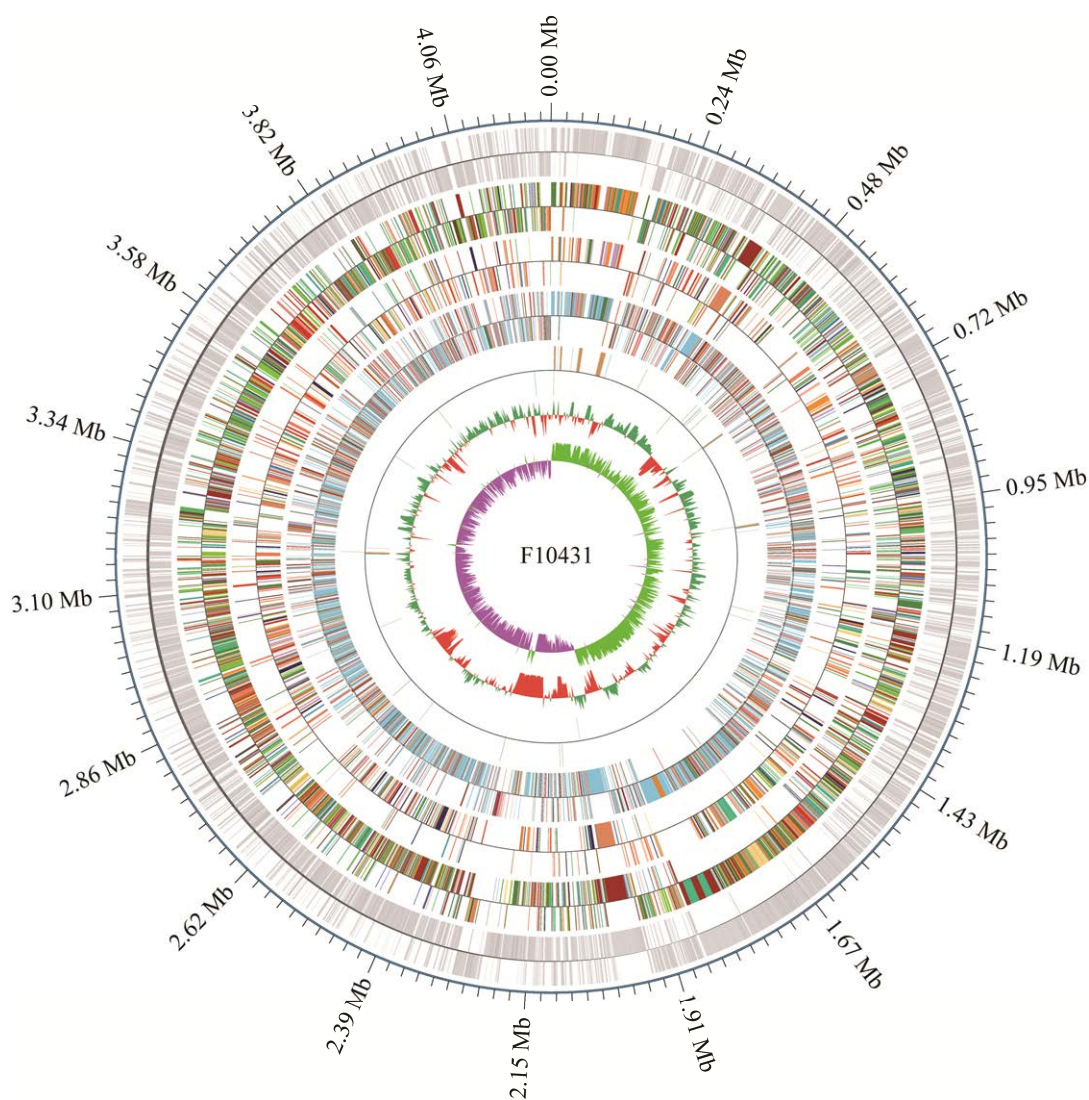


图 4 F10431 基因组环形图谱

Figure 4 *Bacillus subtilis* F10431 genomic ring map.

### 2.3.2 基因组的功能注释及预测

#### 1) CAZy 功能预测

使用 CAZy 数据库对菌株 F10431 内具有的合成或者分解复杂碳水化合物和催化碳水化合物降解、修饰的相关酶系家族进行分析对比。结果如图 5 所示，菌株 F10431 成功注释到 201 个碳水化合物酶类家族基因。其中包括 71 个糖苷水解酶(glycoside hydrolase)基因，占总注释结果的 35.3%，58 个糖基转移酶(glycosyl transferase)

基因，占总注释结果的 28.9%，51 个碳水化合物结合模块(carbohydrate binding module)基因，占总注释结果的 25.4%，14 个糖类酯解酶(carbohydrate esterase)基因和 7 个多糖裂解酶(polysaccharide lyase)基因。以上结果表明，菌株 F10431 可通过产糖苷水解酶、糖基转移酶等途径起作用。

#### 2) KEGG 功能注释

利用 KEGG 数据库对菌株 F10431 产物和

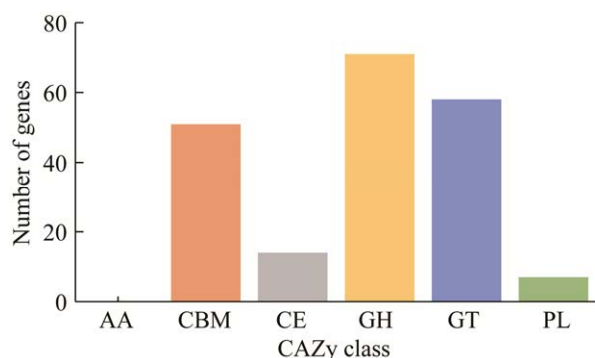


图5 枯草芽孢杆菌 F10431 基因组 CAZy 功能分类  
AA: 氧化还原酶; CBM: 碳水化合物结合模块;  
CE: 糖类酯解酶; GH: 糖苷水解酶; GT: 糖基  
转移酶; PL: 多糖裂解酶

Figure 5 CAZy functional classification of *Bacillus subtilis* F10431 genome. AA: Auxiliary activity; CBM: Carbohydrate-binding module; CE: Carbohydrate esterase; GH: Glycoside hydrolase; GT: Glycosyl transferase; PL: Polysaccharide lyase.

化合物在细胞中的代谢途径和这些基因产物的功能进行比对, 结果如图 6 所示, 共注释到 4 464 个参与 KEGG 通路的编码基因。其中, 参与新陈代谢通路的基因最多(1 805 个), 主要富集于全局总览图(674 个)、碳水化合物代谢(263 个)、氨基酸代谢(204 个)等通路; 其次是参与环境信息处理类通路的基因(321 个), 主要富集在膜转运(184 个)和信号转导(136 个)通路中; 此外, 还有部分编码基因参与遗传信息处理类通路(192 个)、细胞进程类通路(166 个)、人类疾病类通路(94 个)和有机系统类通路(47 个)。新陈代谢通路中包含与萜类和多酮类的代谢通路有关的基因(41 个)和聚糖生物合成与代谢通路有关的基因(34 个), 与菌株抑菌活性物质产生以及蛋白质聚糖过程密切相关。

### 3) COG 功能注释

将基因组注释后的蛋白质序列与 COG 数

据库进行比对分析, 预测菌株中相关蛋白的主要功能。注释结果如图 7 所示, 共注释到 3 720 个 COG 功能基因, 参与转录(K)的有 327 个, 占 8.8%; 氨基酸转运和代谢(E)的相关功能基因有 326 个, 碳水化合物转运和代谢(G)有 320 个, 分别占注释总数的 8.8%和 8.6%。其他功能注释分布在翻译、核糖体结构和生物合成(J, 6.3%)、细胞壁/膜/包膜生物合成(M, 6.0%)、信号转导机制(T, 5.3%)、辅酶的运输和代谢(H, 5.3%)和无机离子运输和代谢(P, 5.2%)等方面。

### 4) GO 富集分析

经 GO 数据库注释分析, 菌株 F10431 全基因组共有 14 243 个基因得到注释(图 8)。其中生物学过程注释条目为 7 055 个, 占总功能注释的 49.5%, 主要与代谢过程、细胞过程和定位等有关; 在细胞组分分类中注释到 3 190 个基因, 占总功能注释的 22.4%, 主要与细胞、细胞成分等有关; 在分子功能分类中注释到 3 998 个基因, 占总功能注释的 28.1%, 与催化活性、结合相关的注释最多。细胞组分注释结果表明, 枯草芽孢杆菌 F10431 具有较强的生物膜形成能力, 生物膜能够保护菌体抵抗外界环境。定位和建立定位的基因主要参与细菌黏附, 有利于该菌株定殖在宿主细胞表面, 并降低病原菌对宿主细胞的侵袭。

### 5) TCDB 功能注释

利用 TCDB 数据库对菌株 F10431 膜转运蛋白进行分类。菌株 F10431 注释结果显示(图 9), 一级分类共注释到 531 个基因, 其中以电学潜在驱动的转运蛋白和主要活性转运蛋白为主, 分别占注释总基因的 39.0%和 36.5%。由此推测该菌的运输方式以离子通道运输为主, 主动转运为辅。

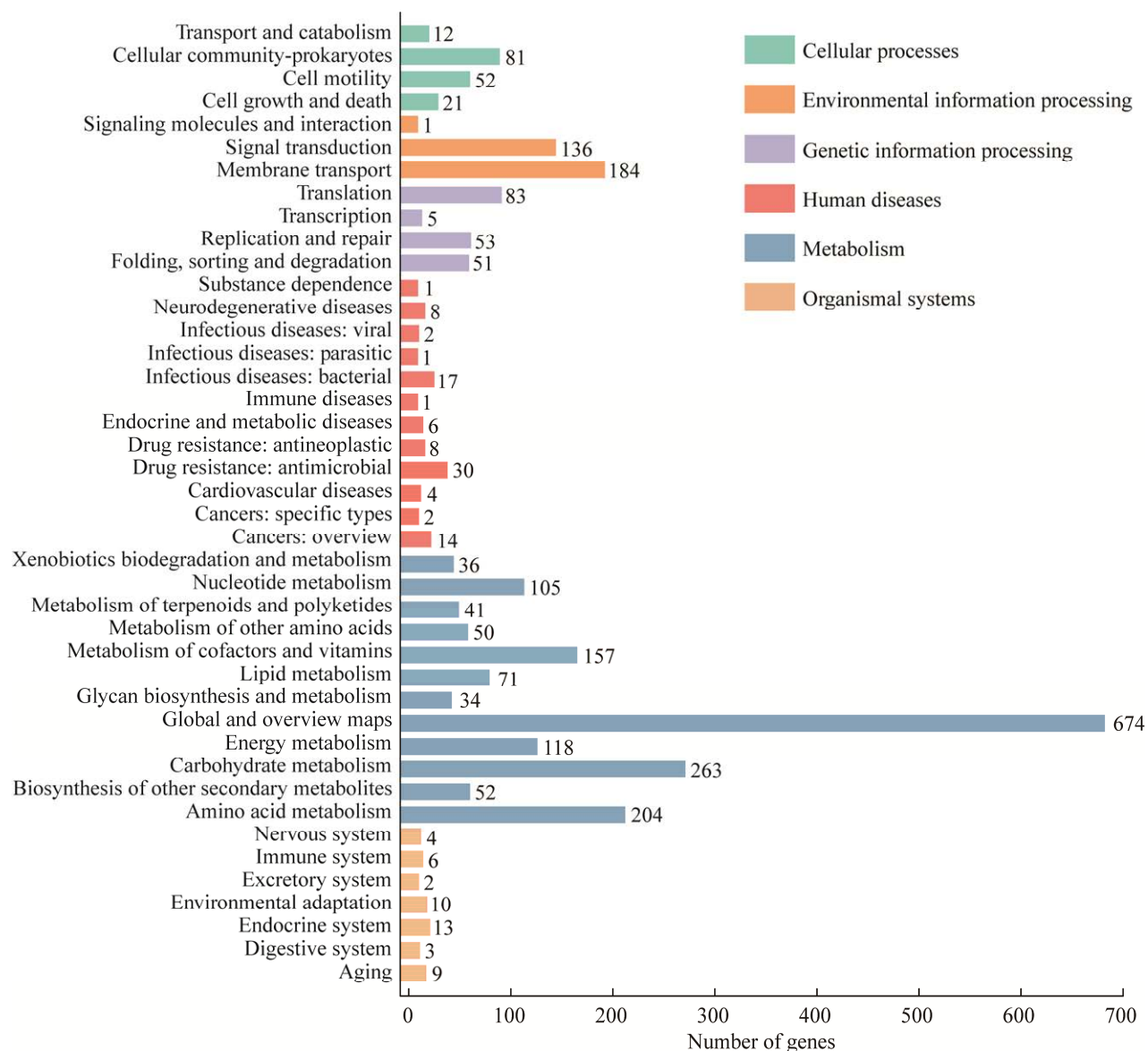


图 6 枯草芽孢杆菌 F10431 基因组 KEGG 功能分类

Figure 6 KEGG functional classification of *Bacillus subtilis* F10431 genome.

### 2.3.3 次级代谢基因簇分析

采用 antiSMASH-4.0.2 程序<sup>[32]</sup>对基因组进行预测, 结果统计如图 10 所示。共预测出 9 个次级代谢基因簇, 其中以非核糖体肽合酶 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS)、萜稀类 (terpene) 和聚酮化合物 (T3 polyketides, T3PKS) 为主, 都测出 2 个基因簇。非核糖体肽合酶 (NRPS)

基因数最多 (90 个)。

### 2.3.4 毒力或致病性分析

使用 Diamond 软件把目标物种的氨基酸序列在 PHI 数据库进行比对, 再将目标物种的基因和其相对应的功能注释信息结合起来, 得到注释结果。如图 11 所示, 菌株 F10431 注释结果展示不同 PHI 表型突变类型基因数目, 其中



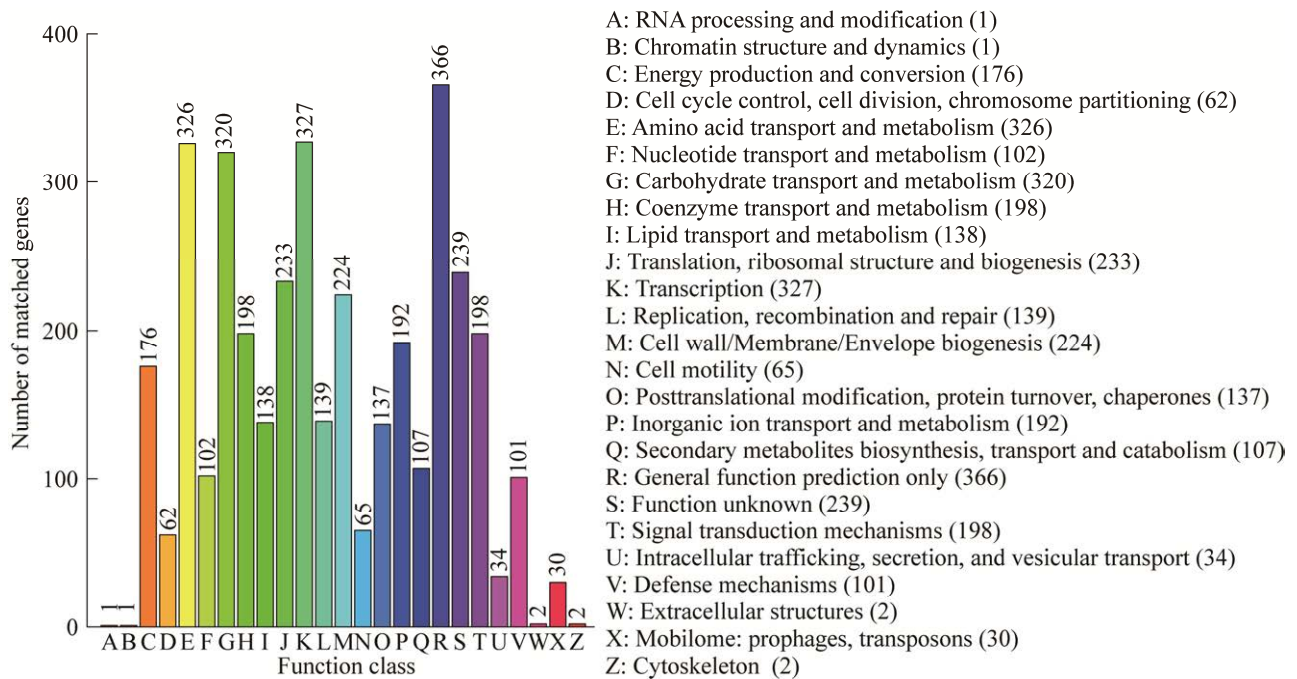


图7 枯草芽孢杆菌 F10431 基因组 COG 功能分类

Figure 7 COG functional classification of *Bacillus subtilis* F10431 genome.

以毒力减少(reduced virulence)突变类型最多,致病性无影响(unaffected pathogenicity)突变类型数量次之。

### 3 讨论与结论

驼乳和驼粪作为一种具有特殊地域性的筛菌来源研究得较少。本研究从新疆双峰驼乳中分离出 2 株芽孢杆菌 2N2N 和 2N13N, 驼粪中分离出一株芽孢杆菌 F10431。通过形态学观察进行初步确定后通过 16S rRNA 基因序列分析发现, 这 3 株菌与 EzBioCloud 中枯草芽孢杆菌典型菌种的相似度>99%, 将其鉴定为 *Bacillus subtilis*。为探究其益生特性, 本研究首先对菌株基本生物学进行研究。益生菌在机体内发挥益生性的前提是必须具备良好的酸、胆盐和胃肠液耐受性。通常, 胃环境的 pH 值为 2.0–4.0<sup>[33]</sup>。在本试验中, 3 株菌在强酸环境中进行耐受性试验, 6 h 后菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 在

pH 2.0 的环境中  $OD_{600}$  与 0 h 差值分别是 0.082、0.087 和 0.100; 在 pH 3.0 的环境中  $OD_{600}$  差值分别是 0.072、0.078 和 0.083, 表现出一定的酸耐受能力。在胆盐耐受试验中, 小肠的胆汁盐浓度平均水平在 0.3%<sup>[34]</sup>, 所分离的 3 株菌在 0.5%和 1.0% (质量体积分数)的条件下均能都良好地生长, 其  $OD_{600}$  值在 6 h 内都随着时间的延长而增加, 表明出较强的胆盐耐受能力。菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 在模拟胃液中处理 6 h 后其活菌存活率分别为 98.35%、88.06%和 4.67%, 在模拟肠液中处理 6 h 后其活菌存活率分别为 108.15%、71.33%和 92.41%, 菌存活率均超过 70%, 证明其有在肠胃道中存活并定殖的能力, 其中, 菌株 F10431 的综合耐受性表现突出。胃液中的胃蛋白酶与肠液中的胰蛋白酶是益生菌通过宿主消化道的一道重要的屏障<sup>[35]</sup>, 因此菌株对人工胃肠液的耐受性试验对于益生效果评价必不可少。

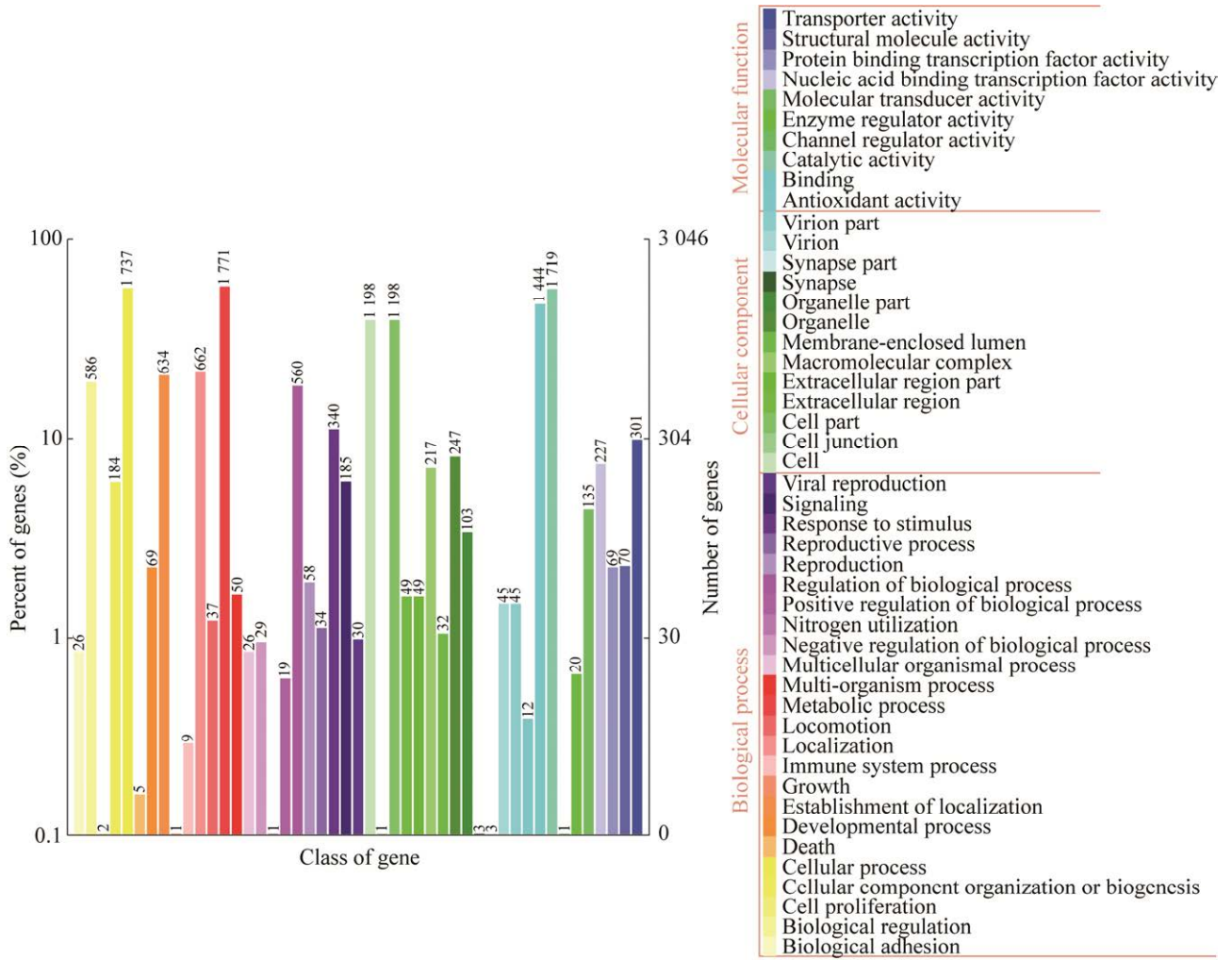


图 8 枯草芽孢杆菌 F10431 基因组 GO 功能分类

Figure 8 GO functional classification of *Bacillus subtilis* F10431 genome.

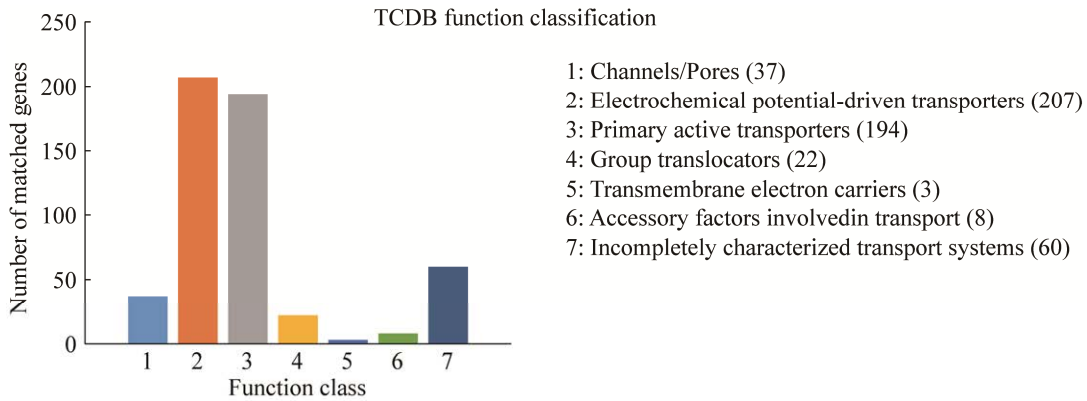


图 9 枯草芽孢杆菌 F10431 基因组 TCDB 功能分类

Figure 9 TCDB functional classification of *Bacillus subtilis* F10431 genome.

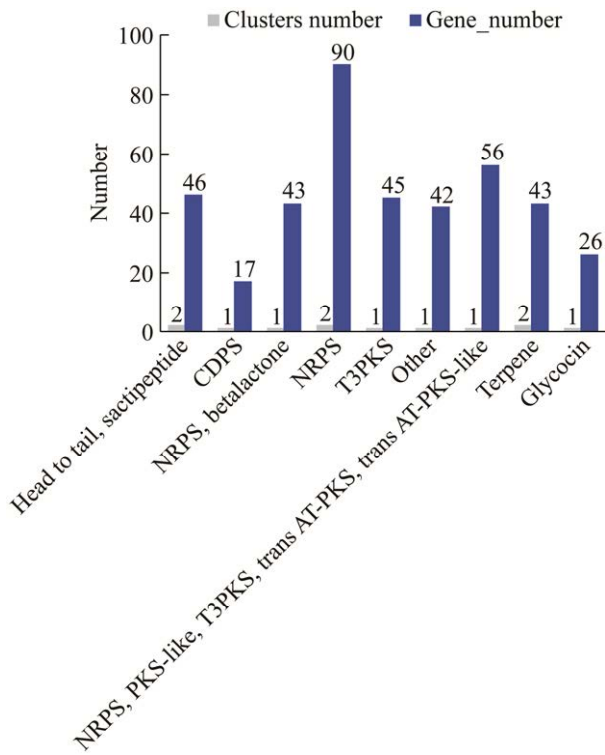


图 10 次级代谢基因簇及基因数量统计  
Figure 10 Statistics of secondary metabolic gene clusters and number of genes.

菌株具有产酶性能是筛选益生菌的重要因素，此类菌株在动物肠道内产酶协同动物内源性消化酶，促进营养物质的消化与吸收提高饲料利用率，达到促进机体生长的效果<sup>[36-37]</sup>。张庆芳等<sup>[38]</sup>从西藏黄牛瘤胃液中筛选一株高产纤维素酶的菌株，将该菌株作为益生菌制剂的候选菌，在当地应用会有较强适应性；韩旭凯<sup>[39]</sup>从土壤中筛选获得枯草芽孢杆菌 K12 株具有较好的淀粉酶活性、纤维素酶活性和蛋白酶活性。本研究分离出的 3 株菌与上述结果相同，具有优良的产淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶能力，可促进机体对饲料的消化和吸收，提高饲料的转换率<sup>[40]</sup>。同时，*Bacillus subtilis* F10431 在 SOD 和 CAT 活性上表现出较强的能力，具有抑制氧自由基的产生、平衡机体的代谢、提高免疫力和预防疾病的功效。同时研究表明，枯草芽孢杆菌具有抑菌作用，如刘晓燕等<sup>[41]</sup>发现枯草芽孢杆菌 WH1 株对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)抑菌效果极显著( $P<0.01$ )。作为益生菌，

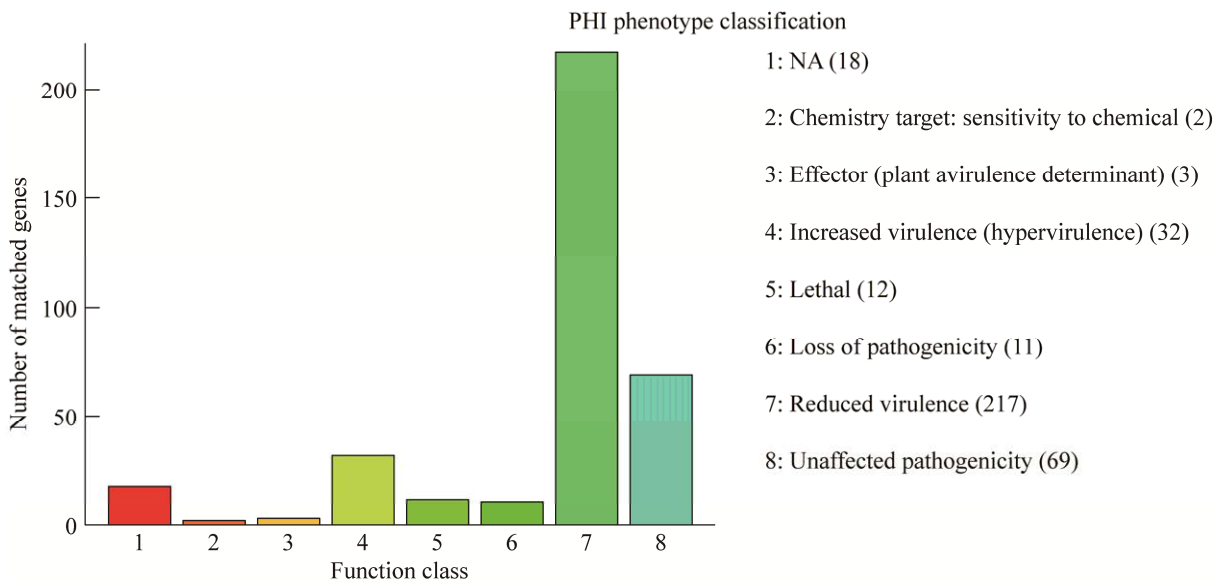


图 11 F10431 基因组不同 PHI 表型突变类型基因数目的统计情况  
Figure 11 Statistics on the number of genes with different PHI phenotype mutation types in genome F10431.



其抑制病原菌的效果也是一个重要指标, 抑菌试验表明, 分离的 3 株菌对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有较好的抑制作用, 对沙门氏菌的抑制能力较弱。王银龙<sup>[42]</sup>发现了一株骆驼源龙舌兰芽孢杆菌 LTF7, 菌株可以降低大肠杆菌感染小鼠血清中 IL-6、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA)的含量, 改善大肠杆菌诱导的肠炎, 维持肠道的完整性, 同时也降低大肠杆菌对肠道的损伤。在饲用微生物的安全方面, 通过血溶性试验检测, 3 株菌并无溶血性, 一般认为枯草芽孢杆菌是安全的, 缺乏溶血素, 不会产生机会性毒力, 符合食品安全的要求。以上结果表明, 菌株 F10431、2N2N 和 2N13N 在益生菌的体外有效性评价中有着不错的益生效果, 其中, 菌株 F10431 在产酶能力、耐受能力和抑菌能力综合表现较突出, 因此, 需进一步在分子水平探究其机理。

本研究采用二代+三代的测序技术对 *Bacillus subtilis* F10431 进行全基因组测序, 将全基因组测序数据提交至 NCBI 获得 GenBank 登录号为 MW721260。菌株全长 4 377 942 bp, 重复序列在基因组中共观察到 270 个散在重复序列, 130 个串联重复序列, 具有高度的冗余性, 这可能会促进细菌在复杂微生物环境中繁殖能力<sup>[43]</sup>。CAZy 酶类基因注释显示, 有 71 (35.3%)个糖苷水解酶、58 (28.9%)个糖基转移酶、51 (25.4%)个碳水化合物结合模块、14 (7.0%)个糖类酯解酶和 7 (3.5%)个多糖裂解酶基因被注释, 糖苷水解酶作用于含有 2 个及以上 1,4- $\alpha$ -D-葡萄糖基的多糖中的 1,4- $\alpha$ -D-葡萄糖苷键, 有研究表明骆驼奶联合降糖药物治疗 2 型糖尿病可有效改善患者的症状<sup>[44]</sup>, 这与驼源 F10431 菌中的糖苷水解酶、转移酶类基因占比较多密切相关。KEGG 通路注释结果显示, 基因主要富集于 674 (15.1%)个

全局总览图、263 (5.9%)个碳水化合物代谢、204 (4.6%)个氨基酸代谢、184 (4.1%)个膜转运和 157 (3.5%)个辅助因子和维生素代谢通路中, 这表明该菌株具有强大的能量代谢能力和适应不同环境的能力。基于 COG 分类的功能注释显示其在转录和氨基酸转运代谢较高, 意味着该菌有强大的碳水化合物代谢能力, 同时在胞壁/膜/包膜生物合成中占有 6.0%比例, 可以辅证该菌有较强的生物膜形成能力, 为适应环境和生长繁殖创造条件。基于 GO 数据库功能注释结果显示, 基因主要富集在代谢过程、分子结合、细胞过程和细胞组分方面, 表现了该菌具有良好的代谢生长能力和细胞再生能力, 能抵御一定的恶劣环境。在 TCDB 注释结果中, 以电化学潜在驱动的转运蛋白和主要活性转运蛋白为主, 推测该菌的运输方式以离子通道运输和主动转运为主。次级代谢基因簇分析表明, F10431 的主要次级代谢产物有非核糖体肽合酶、聚酮化合物和萜稀类, 有研究证明, 许多具有重要经济价值的次级代谢产物都是由共同含有聚酮化合物和非核糖体肽合酶基因的次级代谢基因簇合成的<sup>[45]</sup>, 其不仅丰富了次级代谢产物结构的多样性, 也在解释已知代谢产物的代谢途径和发现新的次级代谢产物上提供了丰富的信息资源<sup>[46]</sup>。与 PHI 数据库比对显示, 表型突变类型基因数目最多的为毒力减少以及致病性无影响, 进一步说明了其作为饲用益生菌的安全可靠性。以上结果表明了本试验分离的 *Bacillus subtilis* F10431 在基因水平具有一定的益生功能潜力。当然, 该菌在动物体内具体的益生效果还需要动物试验来验证。

综上所述, 本研究从驼源中分离得到 3 株枯草芽孢杆菌, 具有良好的耐酸、耐胆盐和耐肠胃液特性, 并拥有优秀的产酶能力和一定的抑菌性, 不产生溶血素, 其中菌株 F10431 各项

表现突出, 有成为饲用益生菌的潜力, 同时全基因组序列分析也为其益生菌特性及功能机制提供了数据支撑, 为今后相关菌株的研究和应用奠定了理论基础。

## REFERENCES

- [1] 王旭明, 陈宗泽, 袁毅. 益生菌作用机理的研究进展[J]. 吉林农业科学, 2002, 27(1): 50-53.  
WANG XM, CHEN ZZ, YUAN Y. Study on function mechanism of benefit bacteria[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2002, 27(1): 50-53 (in Chinese).
- [2] SÁNCHEZ B, DELGADO S, BLANCO-MÍGUEZ A, LOURENÇO A, GUEIMONDE M, MARGOLLES A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(1): 10.1002/mnfr.201600240.
- [3] HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ, POT B, MORELLI L, CANANI RB, FLINT HJ, SALMINEN S, CALDER PC, SANDERS ME. 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.
- [4] GU MJ, SONG SK, PARK SM, LEE IK, YUN CH. *Bacillus subtilis* protects porcine intestinal barrier from deoxynivalenol via improved zonula occludens-1 expression[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2014, 27(4): 580-586.
- [5] 刘秀侠, 徐海燕, 辛国芹, 李金敏, 赵影, 孙学森, 谷巍. 11株枯草芽孢杆菌益生特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(8): 2333-2341.  
LIU XX, XU HY, XIN GQ, LI JM, ZHAO Y, SUN XS, GU W. Study on probiotic characteristics of eleven *Bacillus subtilis* strains[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(8): 2333-2341 (in Chinese).
- [6] UPADHAYA SD. Efficacy of dietary *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* supplementation continuously in pullet and lay period on egg production, excreta microflora, and egg quality of Hyline-Brown birds[J]. Poultry Science, 2019, 98(10): 4722-4728.
- [7] CHEN YC YV YX. *Bacillus licheniformis*-fermented products improve growth performance and the fecal microbiota community in broilers[J]. Poultry Science, 2020, 99(3): 1432-1443.
- [8] XU S, LIN YC, ZENG D, ZHOU MJ, ZENG Y, WANG HS, ZHOU Y, ZHU H, PAN KC, JING B, NI XQ. *Bacillus licheniformis* normalize the ileum microbiota of chickens infected with necrotic enteritis[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 1744.
- [9] 张传涛, 赵炳然, 孙祥山, 黄经献, 曹金凤. 饲料中添加植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌对半滑舌鳎生长、存活率、免疫反应和抗氧化能力的影响[J]. 科学养鱼, 2021(12): 70-72.  
ZHANG CT, ZHAO BR, SUN XS, HUANG JX, CAO JF. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on growth, survival rate, immune response and antioxidant capacity of *Cynoglossus semilaevis*[J]. Scientific Fish Farming, 2021(12): 70-72 (in Chinese).
- [10] 张书环, 吴金平, 褚志鹏, 许巧情, 何菊云, 金佳利, 陈细华. 饲喂枯草芽孢杆菌对杂交鲟生长和肠道菌群结构的影响[J]. 海洋渔业, 2021, 43(1): 71-80.  
ZHANG SH, WU JP, CHU ZP, XU QQ, HE JY, JIN JL, CHEN XH. Effects of feeding *Bacillus subtilis* on growth and intestinal microflora of hybrid sturgeon[J]. Marine Fisheries, 2021, 43(1): 71-80 (in Chinese).
- [11] 雷元培, 王利通, 王国水, 路则庆, 计成, 汪以真. 枯草芽孢杆菌 ANSB01G 对采食玉米赤霉烯酮污染日粮仔猪中毒症状的缓解效果[J]. 饲料工业, 2021, 42(12): 22-27.  
LEI YP, WANG LT, WANG GS, LU ZQ, JI C, WANG YZ. Ameliorative effects of *Bacillus subtilis* ANSB01G on zearalenone toxicosis in postweaning gilts[J]. Feed Industry, 2021, 42(12): 22-27 (in Chinese).
- [12] 王汉星, 虎千力, 杨建涛, 武圣儒, 张文晔, 杨小军, 徐俊杰, 刘福柱. 饲料中添加粪链球菌与枯草芽孢杆菌对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(5): 2074-2086.  
WANG HX, HU QL, YANG JT, WU SR, ZHANG WY, YANG XJ, XU JJ, LIU FZ. Effects of dietary *Streptococcus faecalis* and *Bacillus subtilis* on growth performance and intestinal health of weaned piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(5): 2074-2086 (in Chinese).
- [13] 萨仁图娅, 斯仁达来, 付龙霞, 刘强德, 吉日木图. 中国双峰驼种质资源保护调查研究[J]. 中国草食动物科学, 2015, 35(6): 62-65, 78.  
SA R, SI R, FU LX, LIU QD, JI R. Investigation on germplasm resources protection of Bactrian camel in China[J]. China Herbivore Science, 2015, 35(6): 62-65, 78 (in Chinese).
- [14] 何静. 双峰驼肠道微生态特征及纤维素分解菌的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2019.

- HE J. Intestinal microecological characteristics and cellulolytic bacteria of Bactrian camel[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [15] 蔡树东, 黄浩, 阿里甫·努肉力, 罗生金. 骆驼乳对疾病辅助治疗作用研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2019, 39(6): 52-55.
- CAI SD, HUANG H, ALIFU·Nurouli, LUO SJ. Research progress of the effect of camel milk the adjuvant treatment of diseases[J]. China Herbivore Science, 2019, 39(6): 52-55 (in Chinese).
- [16] 农业部. 饲料添加剂品种目录(2013)[J]. 中国饲料, 2014(1): 2-4.
- Ministry of Agriculture. Catalogue of feed additives (2013)[J]. Chinese feed, 2014(1): 2-4 (in Chinese).
- [17] 薛杉, 侯敏, 侯新强, 曹英, 杨蓉, 陈钢粮, 涂德江, 崔卫东. 从新疆吉木乃地区冬季泌乳双峰驼中培养的细菌多样性及产酸、产酶活效果[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3489-3502.
- XUE S, HOU M, HOU XQ, CAO Y, YANG R, CHEN GL, TU DJ, CUI WD. Diversity of culturable bacteria in lactating Bactrian camels in Jimunai area of Xinjiang during winter and the acid-and enzyme-producing activities[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3489-3502 (in Chinese).
- [18] 高雯雯, 王莹, 梁倩, 孙玲莉, 肖海龙, 李宏, 刘程智. 1 株屎肠球菌的全基因组序列测定及比较基因组分析[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2639-2646.
- GAO WW, WANG Y, LIANG Q, SUN LL, XIAO HL, LI H, LIU CZ. Whole genome sequencing and comparative genomic analysis of a strain of *Enterococcus faecium*[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(21): 2639-2646 (in Chinese).
- [19] 冀婉玥, 林康, 孟林, 魏志波, 温建新. 犬源芽孢杆菌分离鉴定及其耐受性的研究[J]. 天津农业科学, 2018, 24(8): 11-15.
- JI WY, LIN K, MENG L, WEI ZB, WEN JX. Study on isolation, identification and tolerance of *Bacillus* of canine[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2018, 24(8): 11-15 (in Chinese).
- [20] 赵芳, 李艳琴, 李彬春. 模拟人体胃肠道环境筛选益生乳杆菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1396-1403.
- ZHAO F, LI YQ, LI BC. Screening of probiotic *Lactobacillus* in simulated gastrointestinal environment[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1396-1403 (in Chinese).
- [21] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595.
- [22] CHEN SF, ZHOU YQ, CHEN YR, GU J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [23] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH A, DVORKIN M, KULIKOV AS, LESIN VM, NIKOLENKO SI, PHAM S, PRJIBELSK AD, PYSHKIN AV, SIROTKIN A, VYAHHI N, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19(5): 455-477.
- [24] NADALIN F, VEZZI F, POLICRITI A. GapFiller: a *de novo* assembly approach to fill the gap within paired reads[J]. BMC Bioinformatics, 2012, 13(suppl 14).
- [25] ALEXEY G, VLADISLAV S, NIKOLAY V, GLENN T. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2013, 29(8): 1072-1075.
- [26] DONOVAN HP, MICHAEL I, CONNOR TS, PHILIP H, GENE WP. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. Genome Research, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [27] GRIN I, LINKE D. GCView: the genomic context viewer for protein homology searches[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(web server issue): W353-W356.
- [28] CHOI AR, PATRA JK, KIM WJ, KANG SS. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1963.
- [29] KIMOTO H, NOMURA M, KOBAYASHI M, OKAMOTO T, OHMOMO S. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials[J]. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ, 2004, 38(2): 111-117.
- [30] 武君霞, 刘泽, 杨辰涛, 韩燕, 柏凤伟, 李雄, 刘思春, 郝庆红, 吴国江, 刘月琴, 郭云霞. 羊肠道益生芽孢细菌的筛选及 D-4-1 菌株胃肠道耐受[J]. 家畜生态学报, 2021, 42(2): 73-78.
- WU JX, LIU Z, YANG CT, HAN Y, BAI FW, LI X, LIU SC, HAO QH, WU GJ, LIU YQ, GUO YX. Screening of the probiotic *Bacillus* and tolerance of D-4-1 strain from sheep intestinal[J]. Acta Ecologica Animalis Domastici, 2021, 42(2): 73-78 (in Chinese).
- [31] PERES CM, ALVES M, HERNANDEZ-MENDOZA A, MOREIRA L, SILVA S, BRONZE MR, VILAS-BOAS L, PERES C, MALCATA FX. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics[J]. LWT-Food Science and

- Technology, 2014, 59(1): 234-246.
- [32] MEDEMA MH, BLIN K, CIMERMANCIC P, de JAGER V, ZAKRZEWSKI P, FISCHBACH MA, WEBER T, TAKANO E, BREITLING R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl\_2): W339-W346.
- [33] SINGH TP, KAUR G, MALIK RK, SCHILLINGER U, GUIGAS C, KAPILA S. Characterization of intestinal *Lactobacillus reuteri* strains as potential probiotics[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2012, 4(1): 47-58.
- [34] 冯媛媛, 乔琳, 姚宏明, 刘蕊, 介琳霞, 高长斌. 益生菌安全性和有效性评价方法的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(7): 2022-2032.
- FENG YY, QIAO L, YAO HM, LIU R, JIE LX, GAO CB. Research progress on the evaluation methods of safety and efficacy of probiotics[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(7): 2022-2032 (in Chinese).
- [35] 周传凤, 薛梅, 张廷荣, 史雪萍, 王述柏. 肉鸡小麦-豆粕型饲料添加复合酶制剂对内源消化酶活性和养分利用率的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(10): 4881-4894.
- ZHOU CF, XUE M, ZHANG TR, SHI XP, WANG SB. Effects of compound enzyme preparation on endogenous digestive enzyme activity and nutrient utilization in wheat-soybean meal type diet for broilers[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(10): 4881-4894 (in Chinese).
- [36] HUYBEN D, NYMAN A, VIDAKOVIĆ A, PASSOTH V, MOCCIA R, KIESSLING A, DICKSVED J, LUNDH T. Effects of dietary inclusion of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* on gut microbiota of rainbow trout[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 528-537.
- [37] HEMARAJATA P, VERSALOVIC J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation[J]. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2013, 6(1): 39-51.
- [38] 张庆芳, 王泽坤, 姜南, 于爽, 迟乃玉. 一株瘤胃源产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及其酶学特性研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(4): 47-52.
- ZHANG QF, WANG ZK, JIANG N, YU S, CHI NY. Screening, identification and enzymatic characteristics of a cellulose-producing strain from rumen[J]. *China Brewing*, 2019, 38(4): 47-52 (in Chinese).
- [39] 韩旭凯. 一株饲用枯草芽孢杆菌的体外研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2020.
- HAN XK. *In vitro* study on a feed *Bacillus subtilis* strain[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
- [40] 杜东晓, 赵龙妹, 贾少轩, 董惠心, 李旺, 李元晓, 何万领, 曹平华. 产淀粉酶菌株的筛选鉴定及酶学特性研究[J]. *饲料研究*, 2021, 44(19): 80-84.
- DU DX, ZHAO LM, JIA SX, DONG HX, LI W, LI YX, HE WL, CAO PH. Screening and identification of the amylase producing strain and research on its enzymatic characterization[J]. *Feed Research*, 2021, 44(19): 80-84 (in Chinese).
- [41] 刘晓燕, 王玲玲, 栾会妮, 郑伟, 侯仕营, 刘振华, 张世浩. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定、生物学特性及其对水质净化的作用[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 449-461.
- LIU XY, WANG LL, LUAN HN, ZHENG W, HOU SY, LIU ZH, ZHANG SH. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* strain for water purification[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(2): 449-461 (in Chinese).
- [42] 王银龙. 骆驼源芽孢杆菌筛选及对小鼠大肠杆菌病预防效果的评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2023.
- WANG YL. Screening of *Bacillus* from camel and evaluation of its preventive effect on colibacillosis in mice[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [43] CHAILLOU S, CHAMPOMIER-VERGÈS MC, CORNET M, CRUTZ-LE COQ AM, DUDEZ AM, MARTIN V, BEAUFILS S, DARBON-RONGÈRE E, BOSSY R, LOUX V, ZAGOREC M. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(12): 1527-1533.
- [44] 蔡瑞丽, 侯志梅, 刘顺. 新疆双峰驼奶对 2 型糖尿病患者血糖、血脂及血压的影响[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(20): 46-47, 52.
- CAI RL, HOU ZM, LIU S. Effects of Xinjiang Bactrian camel milk on blood glucose, blood lipid and blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *World Digest of Latest Medical Information*, 2019, 19(20): 46-47, 52 (in Chinese).
- [45] PARK D, CIEZKI K, van der HOEVEN R, SINGH S, REIMER D, BODE HB, FORST S. Genetic analysis of xenocoumacin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(5): 938-949.
- [46] KATZ L, BALTZ RH. Natural product discovery: past, present, and future[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(2): 155-176.