



刘银坤,李昊,李子昕,等. 牦牛源短小芽胞杆菌 TS1 的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):69-77.

LIU Yinkun,LI Hao,LI Zixin,et al. Isolation,identification and biological characterization of a strain of *Bacillus pumilus* TS1 from yak cattle[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):69-77.

牦牛源短小芽胞杆菌 TS1 的分离鉴定及其生物学特性研究

刘银坤¹,李昊¹,李子昕¹,李知新²,张玉彦³,李文财³,任建军³,唐姝^{1*}

(1.南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095;2.宁夏动物疾病预防控制中心,宁夏 银川 750199;
3.宁夏安利森生物科技有限公司,宁夏 银川 750001)

摘要:[目的]本试验旨在研究一株牦牛源短小芽胞杆菌(命名:TS1)的分离鉴定、抗逆性、对常用抗菌药物的耐药性以及常见致病菌的抑菌活性,初步探索其作为益生菌添加剂在畜牧养殖中应用的可行性。[方法]对健康牦牛新鲜粪便进行100℃水浴处理10min以筛选具有抗逆性的芽胞杆菌,进行形态学、生理生化特征及16S rRNA序列分析鉴定,通过测量生长曲线、耐酸、耐胆盐试验、药敏试验及抑菌试验等方法对其生物学特性进行研究,通过全基因组测序分析其可能产生抗菌物质的类型。[结果]TS1为短小芽胞杆菌且具有耐酸、耐胆盐生长特性;TS1对于12种常见的抗菌药物敏感,且对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌具有抑菌作用。测序分析显示该菌株可编码与Amylocyclin同源性达48.90%的一种新型抗菌肽,进而发挥其抗菌活性。[结论]短小芽胞杆菌TS1有一定的抗逆性和潜在的益生能力及广谱抗菌效果,并且在畜禽肠道微生物系统中对抗生素耐药性传递的风险较低,适合作为益生菌添加剂类抗生素替代产品。

关键词:短小芽胞杆菌;分离鉴定;抑菌;抗生素替代品;益生菌添加剂

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0069-09

Isolation, identification and biological characterization of a strain of *Bacillus pumilus* TS1 from yak cattle

LIU Yinkun¹,LI Hao¹,LI Zixin¹,LI Zhixin²,ZHANG Yuyan³,LI Wencai³,REN Jianjun³,TANG Shu^{1*}

(1.College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;
2.Ningxia Animal Disease Prevention and Control Center,Yinchuan 750199,China;
3.Ningxia Anlisen Biotechnology Co. Ltd.,Yinchuan 750001,China)

Abstract:[Objectives]The aim of this experiment was to study the isolation and identification,resistance to common antimicrobial drugs and antibacterial activity of a strain of *Bacillus subtilis* of yak origin (named:TS1),and to explore the feasibility of its application as a probiotic additive in animal husbandry. [Methods]The fresh manure of healthy cattle was treated with water bath at 100℃ for 10 min to screen the resistant *Bacillus*,and then the morphological,physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis were integrated to identify them,and their biological characteristics were studied by measuring growth curves,acid and bile salt resistance tests,drug sensitivity tests and inhibition tests,and their possible production of the types of antibacterial substances they may produce. [Results]TS1 was *Bacillus pumilus* with acid-resistant and bile salt-resistant growth characteristics;TS1 was sensitive to 12 common antibacterial drugs and had inhibitory effects on *Escherichia coli*,*Salmonella*,*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus suis*. Sequencing analysis showed that this strain could encode a novel antimicrobial peptide with 48.90% homology to Amylocyclin,and thus exerted its antimicrobial activity. [Conclusions]This *Bacillus pumilus* TS1 has certain resistance and potential probiotic ability and broad-spectrum antibacterial effect,and has low risk of antibiotic resistance transmission in the livestock and poultry intestinal microbial system,and is suitable as a probiotic additive class antibiotic replacement product.

Keywords:*Bacillus pumilus*;isolation and identification;bacterial inhibition;alternative to antibiotics;probiotics additive

抗菌药物是人类和畜禽防治细菌感染的重要手段。随着抗菌药物的不当使用或滥用,细菌对常用抗菌药物的耐药性日趋严重。因此,“饲料端禁抗、养殖端减抗、限抗”已成为全球共识。欧盟自2006年1

收稿日期:2022-08-13

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2022AAC02072);宁夏重点研发项目黄河生态流域生态环境保护与高质量发展科技支撑专项(21BEF02019)

*通信作者:唐姝,博士,副教授,研究方向为热应激以及热休克蛋白,E-mail:tangshu@njau.edu.cn。

月开始不允许抗菌药物作为饲料添加剂使用,中国自2020年开始也禁止在畜禽养殖过程中作为饲料添加剂使用抗生素^[1-2]。在“禁抗限抗”的大背景下,急需开发抗生素替代产品用于畜禽临床生产实践。目前益生菌是应用较广的替代产品之一,益生菌添加剂不仅可以提高动物生长速度,还可以维持肠道菌群平衡,并且可以通过调控畜禽肠道菌群维持肠道上皮的稳态,从而促进畜禽肠道健康^[3-5]。益生菌本身及其代谢产物又具有广谱抗菌作用,因此筛选不同动物来源的益生菌是“减抗限抗”大背景下抗生素替代品开发的有效方式。

农业部2013年公布了饲料添加剂的品种目录,共有13种类别,其中包括短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)^[6]。短小芽胞杆菌被广泛应用的优势:1)易保存、抗逆性好,分离、培养和保藏的条件简单,对工业化生产技术要求低,能够在肠胃中保持稳定作用并且保持较高活性;其芽胞对外在的恶劣环境(如热、紫外线、电离辐射和低pH等)有较强抵抗作用^[7];2)当摄入足够量时能够预防或改善腹泻^[8],缓解不耐乳糖症状,预防生殖系统感染^[9],增强畜禽免疫力^[10],促进肠道消化系统健康^[11-12],降低血清胆固醇,帮助吸收营养成分与促进畜禽生长^[13-14]等。综上,短小芽胞杆菌具有易保存、活性成分高等优势,值得大量推广和应用。

本试验从健康牦牛粪便中分离到1株具有益生潜力的短小芽胞杆菌,对其形态学、生理生化、耐酸、耐胆盐、对常用抗菌药物的敏感性以及对常见病原菌的抑菌活性等进行研究,旨在评价其用于制备益生菌添加剂的可行性,为动物来源的益生芽胞杆菌的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

于甘肃将军山丹军马场无菌采集健康牦牛粪便,一部分用于室温分离短小芽胞杆菌,剩余样品-80℃保存。

1.2 主要试剂

试验所需主要试剂为LB培养基(青岛海博生物技术有限公司)、LB液体培养基(青岛海博生物技术有限公司)、Landy培养基(上海瑞楚生物科技有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS,南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、革兰氏染色液(南京建成生物工程研究所)、盐酸(优级纯,HCl含量36%~38%)、牛胆盐(上海源叶生物科技有限公司,胆酸含量大于等于60%)、细菌16S rRNA通用引物及PCR 2x Taq Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、生化鉴定管(广州环凯微生物科技有限公司)、药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司和北京索莱宝科技有限公司)等。

1.3 菌株的分离与纯化

取1g左右牛粪样品至装有5mL无菌生理盐水的玻璃试管中,用封口膜封住管口于沸水中煮沸10min;取煮沸后的100μL上清液至装有5mL LB液体培养基的EP管中,放入摇床,37℃、160~180r·min⁻¹振荡培养16~18h;取100μL菌液加入5mL液体培养基中再次振荡培养16h;蘸取菌液在LB固体培养基中划线,于37℃恒温箱中倒置培养12~18h,挑取单菌落接种LB固体培养基于37℃恒温箱培养12~18h,再次挑取单菌落至5mL LB液体培养基中振荡培养16~18h,得到纯化菌液。

1.4 细菌16S rRNA PCR扩增、测序以及同源性和系统进化树分析

将分离纯化后的菌液用16S rRNA引物按照说明书进行PCR扩增,产物在10g·L⁻¹的琼脂糖凝胶中进行电泳。将含有目的条带的PCR产物原液送至北京擎科生物科技有限公司进行一代测序;将纯化后的菌液送至上海凌恩生物科技有限公司进行基因组DNA提取以及全基因组测序。使用PacBio RS和Illumina测序平台对TS1基因组进行全基因组测序。使用ABYSS(<http://www.bcgsc.ca/platform/bioinfo/software/abyss>)进行基因组组装,再使用canu(<https://github.com/marbl/canu>)来组装PacBio校正后的长读数,最后用GapCloser(<https://sourceforge.net/projects/soapdenovo2/files/GapCloser/>)填补剩余的局部内部空白,并纠正单碱基多态性,得到最终的组装结果。用Circos v0.64(<http://circos.ca/>)绘制完整基因组圈图。将测序得到的一代测序即16S rRNA序列提交到NCBI中进行BLAST比对,将同源性高于99%的菌株以及其他芽胞杆菌属的代表菌株用Mega 5.0软件建立系统进化树;将全基因组测序的47个序列片段提交到BAGEL4(<http://bagel.molgenrug.nl/>)与数据库进行比对,预测TS1含有的抗菌基因。将预测含有抗菌基因的序列片段用SnapGene 4.3.6软件分析并绘图。

1.5 菌株的形态以及生化鉴定试验

将 TS1 菌株按照革兰氏染色试剂盒的说明书进行染色镜检观察其形态;将纯化的 TS1 菌液按生化鉴定管说明书接种于不同细菌生化鉴定管中,于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h,观察结果并参照细菌生化鉴定编码册进行鉴别。

1.6 菌株的生长曲线测定及耐酸、耐胆盐试验

将纯化的 TS1 菌株按 10 mL·L⁻¹ 的接种量接种到新鲜的 LB 培养基中,取 200 μL 菌液加入 96 孔板中,设置 3 个重复,置于 37 °C 的酶标仪中,每隔 1 h 测量 D_{600} 值,绘制生长曲线。

取 50 μL 纯化后的 TS1 菌液分别加入 4 950 μL pH 值为 3.02、4.06、5.03、6.04 的 LB 液体培养基中,再取 50 μL 纯化后的菌液加入 4 950 μL 正常 LB 液体培养基中作为对照,同时放入 37 °C、160~180 r·min⁻¹ 恒温振荡培养箱培养 16~18 h,用酶标仪分别测量酸性培养液和对照培养液培养的菌液 D_{600} 值,计算菌株存活率。

另取 50 μL 纯化后的 TS1 菌液分别加入 4 950 μL 牛胆盐浓度为 0.05%、0.1%、0.2%、0.3% 的 LB 液体培养液中,再取 50 μL 活化后的菌液加入 4 950 μL LB 液体培养基中作为对照,同时放入 37 °C、160~180 r·min⁻¹ 恒温振荡培养箱振荡培养 16~18 h,用酶标仪分别测量含胆盐的培养液和对照培养液培养的菌液 D_{600} 值,计算菌株存活率。

1.7 不同抗菌药物对 TS1 菌株的抑菌活性

用无菌生理盐水将 TS1 纯化菌液稀释至 0.5 麦氏浓度(约 1×10^8 CFU·mL⁻¹),将稀释后的 TS1 菌液均匀铺于 LB 固体培养基中,选取六大类 15 种抗菌药物,用 K-B 药敏纸片法^[15] 间隔一定距离贴药敏纸片(具体型号见表 1),于 37 °C 恒温培养 18 h 后测量抑菌圈平均直径(mm),参照 CLSI M100ED30 的结果判读标准^[16] 描述 TS1 耐药结果。

表 1 药敏纸片信息

Table 1 Information on susceptibility test disk

药敏纸片 Susceptibility test disk	购入公司 Acquisition of companies	货号 Code number
复方新诺明 Cotrimoxazole	索莱宝 Solarbio	CT0051B
阿米卡星 Amikacin	索莱宝 Solarbio	CT0107B
氧氟沙星 Ofloxacin	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1049
氨苄西林 Ampicillin	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1009
青霉素 Penicillin	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1001
庆大霉素 Gentamicin	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1028
多西环素 Doxycycline	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1037
环丙沙星 Ciprofloxacin	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1050
阿莫西林 Amoxicillin	索莱宝 Solarbio	CT0538B
美罗培南 Meropenem	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1066
头孢唑林 Cefazolin	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1012
头孢呋辛 Cefuroxime	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1015
头孢他啶 Ceftazidime	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1019
头孢噻肟 Cefotaxime	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1022
头孢吡肟 Cefepime	杭州微生物 Hangzhou Microbiology	S1077

1.8 TS1 菌株的体外抑菌试验

以大肠杆菌(ATCC25922)、沙门氏菌(ATCC58785)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、猪链球菌(WH1609)作为指示菌,采用琼脂扩散打孔法测定抑菌圈,每组设置 3 个重复。将 100 μL 指示菌均匀铺于 LB 固体培养基中,打孔后在孔中加入 50~80 μL 的纯化 TS1 菌液,37 °C 恒温培养 24 h,测量抑菌圈直径,以抑菌圈平均直径(mm)描述抑菌效果。

选取革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌的代表菌株金黄色葡萄球菌(ATCC25923)和大肠杆菌(ATCC25922)作为指示菌进行后续试验。将纯化后的菌液放入高速冷冻离心机中 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 获得菌体和上清液,用无菌 PBS 清洗菌体 1~2 次保证菌体的纯度。然后采用打孔法设置试验分组:阴性对照组、TS1 全菌液组、上清液组以及菌体组,37 °C 培养 24 h,进行 TS1 菌体和上清的抑菌试验,以有无抑菌圈判定其抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 短小芽胞杆菌 TS1 16S rRNA PCR 扩增与系统进化树分析

从 49 株益生菌中分离、筛选得到 1 株各方面性能相对比较好的菌株,将其命名为 TS1,并保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 NO.2022538。TS1 16S rRNA PCR 扩增结果(图 1-A)显示:在 1 000~2 000 bp 处出现明显条带,且阴性对照组没有出现条带。系统发育树结果见图 1-B,BLAST 分析发现与 TS1 16S rRNA 同源性高于 99%的菌株均属于短小芽胞杆菌,且与 *Bacillus pumilus* EE112-P4 聚在一支。

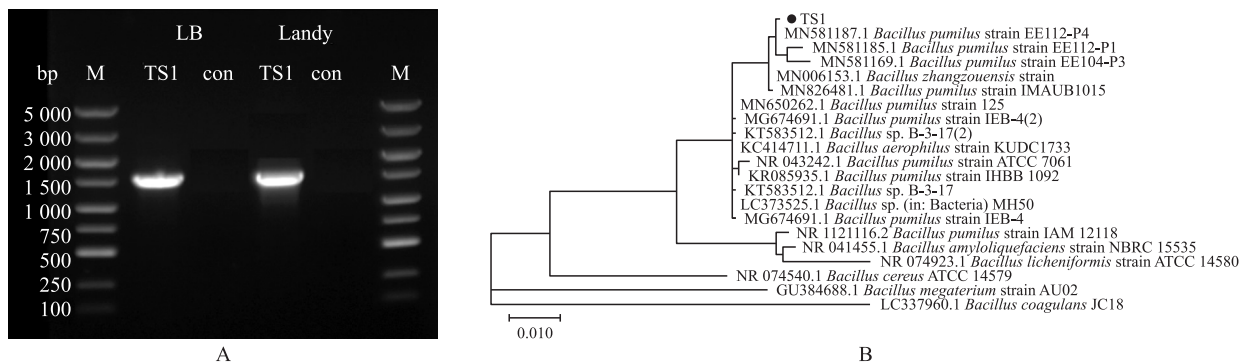


图 1 TS1 16S rRNA PCR 扩增结果与系统进化树分析

Fig. 1 Results of TS1 16S rRNA PCR amplification and phylogenetic tree analysis

A. TS1 16S rRNA PCR 扩增结果(con 为阴性对照, LB 和 Landy 代表不同的液体培养基, M 为 DNA 标准品);
B. 基于菌株 TS1 及相关菌株的 16S rRNA 序列采用邻接法建立的系统发育树。

A. TS1 16S rRNA PCR amplification results (con is the negative control, LB and Landy represent different liquid medium, M indicates DNA marker); B. Phylogenetic tree established using neighbour-joining method based on 16S rRNA sequence of strain TS1 and related strains.

2.2 TS1 菌株的形态以及生化鉴定结果

TS1 革兰氏染色为阳性,细菌形态为单个、短直、杆状(图 2-A);TS1 在 LB 培养基上生长状况良好,菌落形态大多为直径 2~3 mm 中间稍有凹陷的圆形或者椭圆形(图 2-B);将 TS1 分别接种不同的生化反应鉴定管,按说明书进行培养,根据生化鉴定结果(表 2)并对照细菌生化鉴定编码册确定该菌株为短小芽胞杆菌。

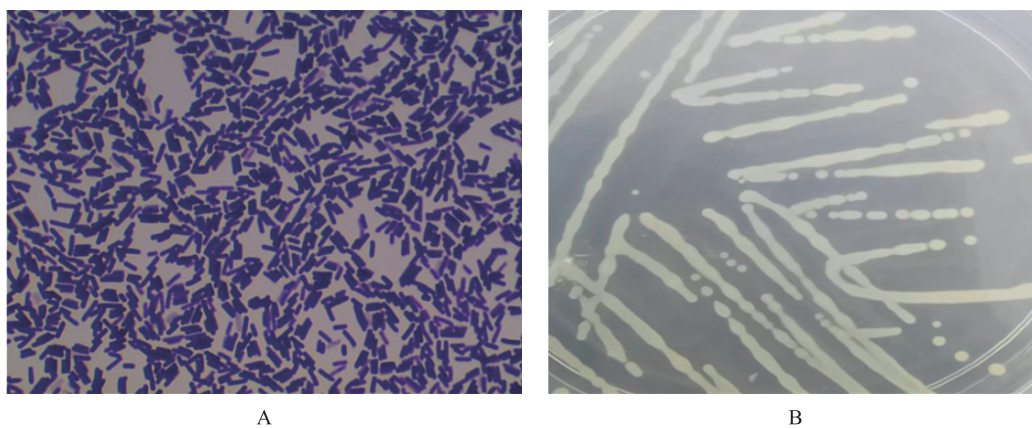


图 2 TS1 革兰氏染色结果及菌株形态

Fig. 2 TS1 Gram staining results and strain morphology

A. 革兰氏染色结果 Gram staining results; B. TS1 的菌落形态 Colony morphology of TS1.

2.3 TS1 的生长曲线测定及耐酸耐胆盐试验

用酶标仪每隔 2 h 测定 TS1 48 h 的生长曲线(图 3-A),结果显示,TS1 在培养约 4 h 进入对数生长期,繁殖快速,菌体浓度增加,在 22 h 左右到达平台期且 48 h 仍然保持稳定,说明稳定期的维持时间长;由图 3-B 和 C 可知,TS1 在低 pH 值和高胆盐含量下存活率仍然较高,说明 TS1 能在畜禽的胃以及肠道中存活。

表 2 TS1 的生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results of TS1

项目 Projects	结果 Results	项目 Projects	结果 Results
葡萄糖 Glucose	+	H ₂ S	-
乳糖 Lactose	-	6.5%高盐肉汤 6.5% high salt broth	生长 Growth
半乳糖 Galactose	+	丙二酸盐 Malonic acid salt	-
麦芽糖 Maltose	+	柠檬酸盐 Citrate	-
甘露醇 Mannitol	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
蔗糖 Sucrose	+	苯丙氨酸 Phenylalanine	-
山梨醇 Sorbitol	+	尿素 Urea	-
鼠李糖 Rhamnose	-	运动性 Sporty	+

注:“+”为阳性,发生相应的显色反应;“-”为阴性,不发生显色反应。“+” is positive,the corresponding color development reaction occurs;“-” is negative,no color development reaction occurs.

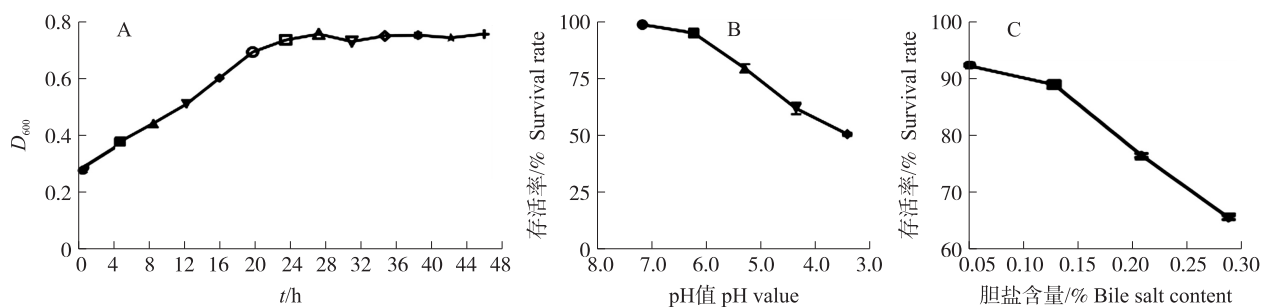


图 3 TS1 的生长曲线及耐酸、耐胆盐结果

Fig. 3 Growth curve of TS1 and results of acid and bile salt resistance

A. TS1 48 h 生长曲线;B. TS1 在不同 pH 下的存活率;C. TS1 在不同胆盐含量下的存活率。

A. TS1 48 h growth curve;B. Survival rate of TS1 at different pH value;C. Survival rate of TS1 at different bile salt content.

2.4 TS1 的药敏试验结果

由表 3 可知,短小芽胞杆菌 TS1 对 β-内酰胺类、磺胺类、四环素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、头孢 1/2/3/4 代中常用的代表性药物中的复方新诺明、阿米卡星、氧氟沙星、氨苄西林、青霉素、庆大霉素、多西环素、环丙沙星、阿莫西林、美罗培南和头孢唑林极敏,对头孢他啶产生耐药,对头孢噻肟和头孢吡肟中度敏感,对头孢呋辛高度敏感。

表 3 短小芽胞杆菌 TS1 的药敏试验结果

Table 3 Results of the drug sensitivity test of *Bacillus pumilus* TS1

药敏纸片 Drug sensitive paper sheets	抑制 TS1 直径/mm Inhibition of TS1 diameter	敏感性 Sensitivity
复方新诺明 Cotrimoxazole	30	S
阿米卡星 Amikacin	23	S
氧氟沙星 Ofloxacin	28	S
氨苄西林 Ampicillin	15	I
青霉素 Penicillin	27	S
庆大霉素 Gentamicin	25	S
多西环素 Doxycycline	31	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	31	S
阿莫西林 Amoxicillin	27	S
美罗培南 Meropenem	39	S
头孢唑林 Cefazolin	40	S
头孢呋辛 Cefuroxime	20	S
头孢他啶 Ceftazidime	0	R
头孢噻肟 Cefotaxime	14	R
头孢吡肟 Cefepime	13	R

注:17 mm 以上判读为 S(敏感),15~16 mm 判读为 I(中介),14 mm 以下判读为 R(耐药)。Above 17 mm is interpreted as S(sensitive), 15-16 mm as I(intermediary)and below 14 mm as R(resistant).

2.5 TS1 的体外抑菌试验结果

由图 4 可知,短小芽胞杆菌 TS1 对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和猪链球菌 4 种指示菌(革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌各 2 种)均产生较明显的抑菌作用,抑菌直径分别为 18、21、28 和 23 mm,对革兰氏阳性菌的抑菌作用更明显,阴性对照组无抑菌圈(图 4-A—D),说明 TS1 产生了抑菌产物;全菌液和菌体对大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌都产生了抑菌圈,上清液以及阴性对照组无抑菌圈(图 4-E、F),这可能与 TS1 的培养条件有关。

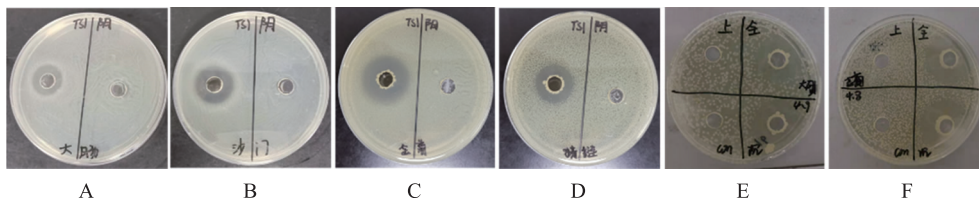


图 4 短小芽胞杆菌 TS1 体外抑菌试验结果

Fig. 4 Results of in vitro inhibition test of Bacillus pumilus TS1

A. TS1 对大肠杆菌的抑菌结果;B. TS1 对沙门氏菌的抑菌结果;C. TS1 对金黄色葡萄球菌的抑菌结果;D. TS1 对猪链球菌的抑菌结果;E. TS1 的全菌液、上清液、菌体沉淀以及阴性对照 LB 肉汤对大肠杆菌的抑菌结果;F. TS1 的全菌液、上清液、菌体沉淀以及阴性对照 LB 肉汤对金黄色葡萄球菌的抑菌结果。

A. Inhibition results of TS1 against Escherichia coli; B. Inhibition results of TS1 against Salmonella; C. Inhibition results of TS1 against Staphylococcus aureus; D. Inhibition results of TS1 against Streptococcus suis; E. Inhibition results of TS1 in whole solution, supernatant, bacterial precipitate and negative control LB broth against Escherichia coli; F. Inhibition results of TS1 in whole solution, supernatant, bacterial precipitate and negative control LB broth against Staphylococcus aureus.

2.6 TS1 的全基因组测序结果

由图 5 可知,TS1 基因全长为 3 646 887 bp,GC 含量约为 42.09%。BAGEL4 中的结果显示其产生的抗菌肽与 Amylocyclicin 较为相近,且与数据库里的抗菌肽比对后发现相似度只有 48.90%,说明 TS1 产生的抗菌肽可能是一种新型抗菌肽。

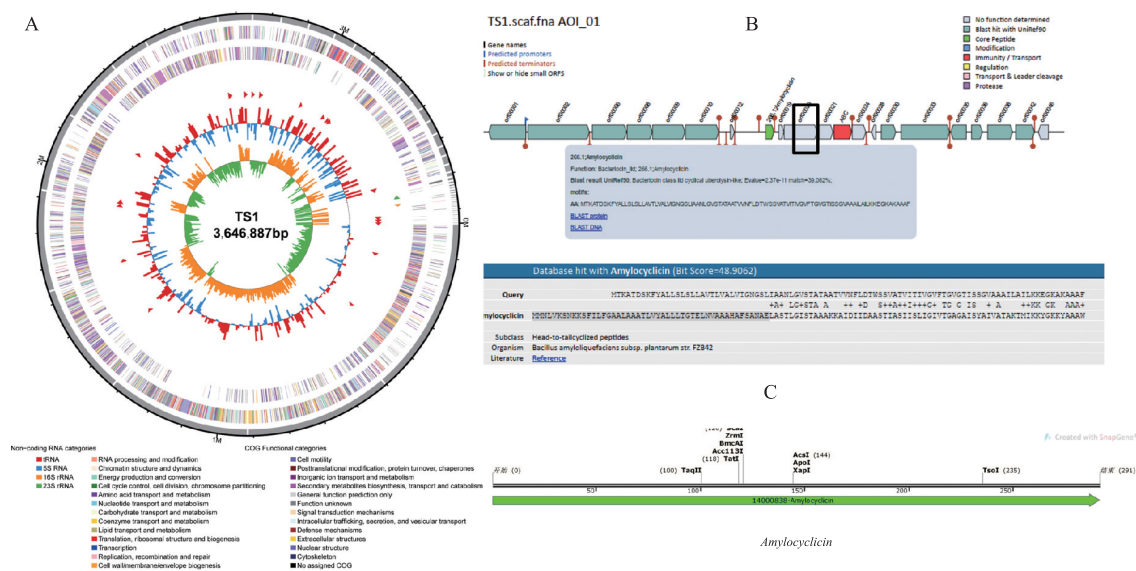


图 5 短小芽胞杆菌 TS1 全基因组测序及分析结果

Fig. 5 Sequencing and analysis results of the whole genome of Bacillus pumilus TS1

A. TS1 全基因组圈图;B. TS1 中的 Amylocyclicin 位置以及其与基因库对比的相似性;C. Amylocyclicin 基因簇。
A. Sketch of the whole genome of TS1; B. Amylocyclicin location in TS1 and similarity to gene bank comparison; C. Amylocyclicin gene cluster.

3 讨论与结论

畜禽养殖中细菌耐药性问题已日益严峻,对抗生素替代品的筛选和研究刻不容缓。益生菌添加剂不仅可以促进动物生长,还可抑制致病菌,同时通过调节畜禽肠道菌群维持肠道上皮稳态,从而促进畜禽肠道健

康^[17-19]。目前市面上所售动物用益生菌产品大多数为枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*),少数为地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)等^[20]。本试验从健康牦牛粪便中分离鉴定出了一株具有益生潜力的短小芽胞杆菌 TS1。芽胞杆菌属在恶劣的环境中可以形成芽胞而存活,因此具有抗逆性好、易保存的优点。有研究表明,芽胞杆菌属因容易在畜禽肠道中定殖而发挥益生作用^[21]。

畜禽养殖中可以应用的益生菌应具备生长性能强、耐受恶劣环境的特点,因此筛选出具有耐受强酸性、高胆盐含量以及高温条件的菌株具有重要意义。本试验筛选的短小芽胞杆菌 TS1 在 pH3 左右时的存活率为 31.4%,在牛胆盐浓度为 0.3%时的存活率为 65.4%,说明其具有较强的耐酸、耐胆盐能力。畜禽胃中大多为强酸环境,肠道中的胆盐含量为 0.05%~0.3%,TS1 具有较强的耐酸耐胆盐能力,足够数量的 TS1 可以通过胃肠,从而占据肠道生态位抑制致病菌的定殖,减少致病菌侵害^[22]。

TS1 体外抑菌试验结果表明,TS1 菌全菌液和离心后的菌体对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有一定的抑菌作用。有研究表明短小芽胞杆菌发挥抑菌作用可能是各种酶在发挥作用^[23-24],也有研究认为是细菌素的作用^[25-26]。本研究通过全基因组测序结果推测 TS1 发挥抑菌作用的物质可能是抗菌肽 Amylocyclicin,这是一种对革兰氏阳性菌有高抗菌活性的新型细菌素^[27]。Amylocyclicin 是环状细菌素的一个成员,这是一类核糖体合成的多肽家族,它们因其热稳定性和高磷酸基团(PI)值而区别于其他细菌素并普遍存在于芽胞杆菌类群中^[28]。在许多革兰氏阳性细菌中都存在环状细菌素。本试验发现的 Amylocyclicin 与其他环状细菌素的同源性较低,如大肠杆菌的 Carnocyclin^[29](33.7%)、粪肠球菌的 Enterocin^[30](38.2%)、乳酸菌的 Lactocyclicin^[31](35.6%)。与同是芽胞杆菌 FZB42 的 Amyloliqefaciens^[27]相比,同源性为 48.9%,TS1 Amylocyclicin 的核苷酸序列与芽胞杆菌属的序列相似性为 97%~99%^[32]。有研究表明 Amylocyclicin 发挥抑菌作用的主要机制是破坏致病菌细胞壁使其形成孔洞,其内容物外泄,细菌因无法进行正常代谢而死亡^[33]。因此,本试验所分离的 TS1 具有潜在的替代抗生素的应用价值。Suda 等^[34]研究表明芽胞杆菌产生抗菌肽的最适条件需采用 BHI(brain heart infusion)培养基,于 30℃ 有氧条件下振荡(150 r·min⁻¹)培养。还有研究表明果糖和 Landy 培养基也会促进抗菌肽的产生和分泌^[35-36]。我们发现 TS1 序列中有编码抗菌肽 Amylocyclicin 的基因簇,但本实验未发现 TS1 的培养上清液具有明显的抗菌活性,推测该基因簇需要在一定的培养条件或者合适的培养基方可大量表达,对此尚需进一步优化培养条件进行深入探究。

本研究所筛选出的牦牛源短小芽胞杆菌 TS1,具备生长速度快、稳定期时间长、抗逆性强、广谱抗菌的特点,基本具备了畜禽饲料添加剂临床使用的特性,具有开发成为畜禽用饲料添加剂的潜力。在此基础上,我们发现 TS1 的基因组中存在一段较新的编码抗菌肽的序列,其抑菌作用可能与此抗菌肽有关,但是具体的机制还需要进一步探究。

参考文献 References:

- [1] 张丽佳,陈贵才,王贤玉,等. 饲用抗生素替代品在动物生产中的应用研究进展[J]. 浙江畜牧兽医,2021,46(1):11-13.
Zhang J, Chen C, Wang Y, et al. The research progress on the application of feed antibiotic substitutes in animal production[J]. Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 46(1): 11-13 (in Chinese).
- [2] 钱璟,吴哲元,郭晓奎,等. 耐药微生物和抗生素耐药基因与全健康[J]. 微生物学通报,2022,49(10):4412-4424.
Qian J, Wu Z Y, Guo X K, et al. Antibiotic-resistant microbes, antibiotic resistance genes and One Health[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4412-4424 (in Chinese with English abstract).
- [3] Zhang S, Zhong G, Shao D, et al. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis* promotes growth performance of broilers by altering the dominant microbial community[J]. Poultry Science, 2021, 100(3): 100935.
- [4] Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Garrido-Mesa J, et al. Intestinal anti-inflammatory effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in DSS-induced colitis in mice: impact on microRNAs expression and gut microbiota composition[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2018, 61: 129-139.
- [5] Liu Q, Yu Z M, Tian F W, et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 23.
- [6] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 2045 号[EB/OL]. (2017-12-04)[2022-08-01]. http://www.moa.gov.cn/nybgb/2014/dyq/201712/t20171219_6104350.htm.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement No. 2045 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [EB/OL]. (2017-12-04)[2022-08-01]. http://www.moa.gov.cn/nybgb/2014/dyq/201712/t20171219_6104350.htm (in Chinese).
- [7] Nguyen A T V, Nguyen D V, Tran M T, et al. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(6): 580-588.
- [8] Knap I, Kehlet A B, Bennedsen M, et al. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers[J]. Poultry Science, 2011,

- 90(8):1690-1694.
- [9] Olmos J, Acosta M, Mendoza G, et al. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(3):427-435.
- [10] 闫洋洋, 夏汉钦, 杨红玲, 等. 活性和热灭活短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) SE5 对斜带石斑鱼幼鱼生长性能、免疫功能及免疫基因表达的影响[C]//2014年中国水产学会学术年会论文摘要集. 2014:176.
Yan Y Y, Xia H Q, Yang H L, et al. Effects of active and heat-inactivated *Bacillus pumilus* SE5 on growth performance, immune function and immune gene expression of juvenile *Epinephelus obfuscatus* [C]//2014 Annual Meeting of Chinese Fisheries Society. 2014:176(in Chinese).
- [11] 杨广达. 饲喂益生芽孢杆菌(短小芽孢杆菌 C-3102)可改善母猪繁殖性能[J]. 广东饲料, 2016, 25(8):52.
Yang G D. Feeding probiotic *Bacillus*(*Bacillus pumilus* C-3102) can improve reproductive performance of sows[J]. Guangdong Feed, 2016, 25(8):52(in Chinese).
- [12] 段颖, 赵玉鑫, 潘翠玲, 等. 富硒益生菌对蛋鸡抗氧化能力和肠道菌群及消化酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(2):68-72. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2010.02.013.
Duan Y, Zhao Y X, Pan C L, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on antioxidative capacity, intestinal microflora and digestive enzyme activities in laying hens[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2010, 33(2):68-72(in Chinese with English abstract).
- [13] Rhayat L, Jacquier V, Brinch K S, et al. *Bacillus subtilis* s train specificity affects performance improvement in broilers[J]. Poultry Science, 2017, 96(7):2274-2280.
- [14] Yang J J, Wang J, Huang K H, et al. Selenium-enriched *Bacillus subtilis* yb-114246 improved growth and immunity of broiler chickens through modified ileal bacterial composition[J]. Scientific Reports, 2021, 11:21690.
- [15] 谭瑶, 赵清, 舒为群, 等. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20):2290-2291.
Tan Y, Zhao Q, Shu W Q, et al. Drug susceptibility test by K-B disk diffusion method[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2010, 7(20):2290-2291(in Chinese).
- [16] 阮紫涵, 黄安雄, 王秀娟, 等. CLSI, EUCAST 和中国耐药判定标准概述[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9):47-58.
Ruan Z H, Huang A X, Wang X J, et al. Overview of CLSI, EUCAST, and susceptibility breakpoints in China[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9):47-58(in Chinese with English abstract).
- [17] 邹强强, 肖爱波, 许贺贺, 等. 复合益生菌制剂对叠层笼养白羽肉鸡生长性能、血液指标、粪便中有害气体排放量以及菌群数量的影响[J]. 饲料工业, 2022, 43(15):16-21.
Zou Q Q, Xiao A B, Xu Y H, et al. Effects of compound probiotics on growth performance, blood indices, fecal harmful gas emission and microflora quantity of stacked cage white-feathered broiler chickens [J]. Feed Industry, 2022, 43(15):16-21(in Chinese with English abstract).
- [18] 李宗凯, 陆扬, 刘家俊, 等. 益生菌对生长肥猪生长性能、肉品质和结肠菌群的影响[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(3):523-528. DOI:10.7685/jnau.201906052.
Li Z K, Lu Y, Liu J J, et al. Effects of probiotics on the growth performance, meat quality and colonic microflora of growing and finishing pigs[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(3):523-528(in Chinese with English abstract).
- [19] 于卓腾, 毛胜勇, 朱伟云. 微生态制剂和饲用抗生素对肉鸡盲肠 VFA 和微生物区系的影响[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(3):110-114. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2007.03.021.
Yu Z T, Mao S Y, Zhu W Y. Effects of probiotics, synbiotics and antibiotics on VFA production and bacterial community of caecal digesta of broilers[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2007, 30(3):110-114(in Chinese with English abstract).
- [20] 郭政宏, 周彪, 严亨秀. 一株藏绵羊源短小芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(6):1610-1617.
Guo Z H, Zhou B, Yan H X. Study on the isolation, identification and biological characteristics of a strain of *Bacillus pumilus* isolated from Tibetan sheep[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(6):1610-1617(in Chinese with English abstract).
- [21] 张楠驰, 王利, 魏勇. 2株羊源芽孢杆菌的筛选及其对小鼠肠道生化指标和肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(7):3374-3385.
Zhang N C, Wang L, Wei Y. Screen of two bacterial strains of *Bacillus* isolated from goat and their effects on intestinal biochemical indexes and intestinal microflora of mice[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(7):3374-3385(in Chinese with English abstract).
- [22] 彭虹旒. 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* 4D-14)的分离与分子鉴定、抑菌性及微生态制剂应用研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2013.
Peng H N. Screening and molecular identification of bacteriostatic *Bacillus pumilus* 4D-14, probiotics development and application research[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013(in Chinese with English abstract).
- [23] 曲诗怡. 牛源益生芽孢杆菌的筛选及对小鼠保护作用观察[D]. 长春:吉林农业大学, 2016.
Qu S Y. Screening of bovine source probiotic *Bacillus* and observe the protective effect in mice[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016(in Chinese with English abstract).
- [24] 戎松浩. 短小芽孢杆菌的分离鉴定及次级代谢产物的研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2016.
Rong S H. Isolation and identification of secondary metabolites produced by *Bacillus pumilus*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016(in Chinese with English abstract).
- [25] Saggese A, Culurciello R, Casillo A, et al. A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*[J]. Marine Drugs, 2018, 16(6):180.

- [26] 刘冰,彭海燕,赵瑞,等. 红海榄根际土壤中短小芽胞杆菌菌株 DH-11 的鉴定及其抗菌活性的分析[J]. 药物生物技术,2013,20(3): 215-219.
Liu B, Peng H Y, Zhao R, et al. Identification of a *Bacillus pumilus* strain DH-11 from the rhizospheric soil of *Rhizophora stylosa* griff and its antibacterial activities analysis[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 20(3): 215-219 (in Chinese with English abstract).
- [27] Scholz R, Vater J, Budiharjo A, et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(10): 1842-1852.
- [28] Liang L Q, Fu Y J, Deng S S, et al. Genomic, antimicrobial, and aphicidal traits of *Bacillus velezensis* ATR2, and its biocontrol potential against ginger rhizome rot disease caused by *Bacillus pumilus*[J]. Microorganisms, 2021, 10(1): 63.
- [29] van Belkum M J, Vederas J C. The ABC transporter CclEFGH facilitates the production of the circular bacteriocin carnocyclin A[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2012, 4(4): 273-278.
- [30] Maqueda M, Gálvez A, Bueno M M, et al. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins[J]. Current Protein & Peptide Science, 2004, 5(5): 399-416.
- [31] Masuda Y, Ono H, Kitagawa H, et al. Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(22): 8164-8170.
- [32] Kurata A, Hirose Y, Misawa N, et al. Draft genome sequence of the ionic liquid-tolerant bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1[J]. Genome Announcements, 2014, 2(5): e01051-e01014.
- [33] 王伟,李津津,迟海. 解淀粉芽孢杆菌素 Amylocyclicin W5 的纯化及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 29-34.
Wang W, Li J J, Chi H. Purification and antimicrobial mechanism of amylocyclicin W5 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DH8030[J]. Food Science, 2021, 42(7): 29-34 (in Chinese with English abstract).
- [34] Suda S, Field D, Barron N. Antimicrobial peptide production and purification[M]//Protein Chromatography: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2017: 401-410.
- [35] Lu H D, Xu H, Yang P P, et al. Transcriptome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* reveals fructose addition effects on fengycin synthesis[J]. Genes, 2022, 13(6): 984.
- [36] Li Y M, Xia M Y, He P B, et al. Developing *Penicillium digitatum* management strategies on post-harvest *Citrus* fruits with metabolic components and colonization of *Bacillus subtilis* L1-21[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(1): 80.

责任编辑:周广礼 刘怡辰