

凝结海恩德氏菌(*Heyndrickxia coagulans*)的分离及其饲用潜力评价

胡晓艳^{1#}, 董皓天^{2#}, 罗红娟¹, 周贤飞¹, 李春秋¹, 曹艳茹^{2*}, 李亚平^{1*}

1 昆明三正生物科技(集团)有限公司, 云南 昆明

2 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明

胡晓艳, 董皓天, 罗红娟, 周贤飞, 李春秋, 曹艳茹, 李亚平. 凝结海恩德氏菌(*Heyndrickxia coagulans*)的分离及其饲用潜力评价[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3409-3424.

HU Xiaoyan, DONG Haotian, LUO Hongjuan, ZHOU Xianfei, LI Chunqiu, CAO Yanru, LI Yaping. Isolation of *Heyndrickxia coagulans* and assessment of its feeding potential[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(7): 3409-3424.

摘要: 凝结海恩德氏菌(*Heyndrickxia coagulans*), 曾用名凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*), 具有较强的种内异质性, 是一类重要的饲用益生菌。【目的】筛选更多优质的凝结海恩德氏菌, 并对其饲用潜力进行评价。【方法】采用平板划线法从腐败水果、土壤及粪便等样品中分离凝结海恩德氏菌, 通过 16S rRNA 基因测序对分离菌株进行鉴定, 并通过产酸筛选、胃肠耐受性测试、表面活性素生成能力检测、抑菌活性测定、蛋白酶活性分析, 以及对不同糖类和饲料原料的利用能力评估等一系列活性检测, 综合评定分离出的凝结海恩德氏菌的饲用潜力。【结果】共分离鉴定出 133 株菌, 其中凝结海恩德氏菌 23 株, 进一步从中筛选出 9 株产酸能力较强的菌株, 其中从腐败菠萝蜜中分离出的菌株 N9 产酸能力最强, 37 °C 培养 24 h 后 pH 降至 3.89±0.05, 乳酸产量达 (3 370.00±87.36) μg/mL。模拟胃肠液及胆盐处理后, N9 的留存率分别为 (73.50±1.54)% 和 (83.20±1.66)%; N9 产表面活性素能力最强, 排油圈直径达 (43.00±0.46) mm; 抑菌实验显示其对 3 种肠道病原菌——肠沙门氏菌肠亚种 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 均具有较好的抑菌效果; 同时, 菌株 N9 具有较好的蛋白酶活性, 其产酶特性适配动物肠道环境, 并能利用木寡糖等糖类以及棕榈粕、棉粕、葵花粕、豆粕、麦麸等饲料原料产酸。【结论】本研究从腐败菠萝蜜中分离出一株具有良好饲用潜力的凝结海恩德氏菌 (*Heyndrickxia coagulans*) N9, 为饲用益生菌的应用研究提供了新的候

资助项目: 云南省科技厅面上项目(202301AT070051); 昆明三正生物科技(集团)有限公司曹艳茹专家基层科研工作站项目(2023007)

This work was supported by the Yunnan Provincial Department of Science and Thchnology General Program (202301AT070051) and Expert Grassroots Scientific Research Workstation Project of CAO Yanru at Kunming Saturn Biological Technology (Group) Co., Ltd. (2023007).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CAO Yanru, caoyanru@kmu.edu.cn; LI Yaping, fankezhou@126.com

Received: 2026-01-17; Accepted: 2026-02-26; Published online: 2026-03-05

选菌株。

关键词：凝结海恩德氏菌；分离；鉴定；饲用潜力

Isolation of *Heyndrickxia coagulans* and assessment of its feeding potential

HU Xiaoyan^{1#}, DONG Haotian^{2#}, LUO Hongjuan¹, ZHOU Xianfei¹, LI Chunqiu¹, CAO Yanru^{2*}, LI Yaping^{1*}

1 Kunming Saturn Biological Technology (Group) Co., Ltd., Kunming, Yunnan, China

2 College of Agriculture and Life Science, Kunming University, Kunming, Yunnan, China

Abstract: *Heyndrickxia coagulans*, formerly known as *Bacillus coagulans*, exhibits pronounced intraspecific heterogeneity and represents an important probiotic candidate for animal feed. **[Objective]** To isolate high-quality *H. coagulans* strains and evaluate their potential for feed applications. **[Methods]** *H. coagulans* strains were isolated from spoiled fruits, soil, and feces through the plate streaking method. The isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing. Functional assays were conducted to comprehensively evaluate their feed potential, including acid production, gastrointestinal tolerance, biosurfactant production, antimicrobial activity, protease activity, and utilization of different carbohydrates and feed raw materials. **[Results]** A total of 133 strains were isolated, among which 23 strains were identified as *H. coagulans*. Nine strains with strong acid-producing ability were further selected. Among them, strain N9 isolated from rotten *Artocarpus heterophyllus* exhibited the highest acid production, decreasing the pH to 3.89 ± 0.05 after 24 h of incubation at 37 °C and achieving a lactic acid yield of $(3\ 370.00 \pm 87.36)$ µg/mL. Following treatment with simulated gastric and intestinal fluids and bile salts, the survival rates of N9 were $(73.50 \pm 1.54)\%$ and $(83.20 \pm 1.66)\%$, respectively. Furthermore, strain N9 showed the strongest biosurfactant production, with an oil displacement diameter of (43.00 ± 0.46) mm. Antimicrobial assays revealed that N9 effectively inhibited three intestinal pathogens: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. In addition, strain N9 exhibited notable protease activity, with enzymatic characteristics well adapted to the animal intestinal environment. It was capable of utilizing carbohydrates such as xylo-oligosaccharides, as well as feed ingredients including palm kernel meal, cottonseed meal, sunflower meal, soybean meal, and wheat bran for acid production. **[Conclusion]** *H. coagulans* N9, isolated from rotten *A. heterophyllus*, demonstrates good potential for feed additive, serving as a new candidate strain for the research on probiotic application.

Keywords: *Heyndrickxia coagulans*; isolation; identification; feed application potential

动物肠道中的微生物不仅数量庞大、组成复杂，更具备强大功能，常被视作动物体内的

“隐形器官”^[1]。它们能够发酵动物自身无法消化的膳食纤维、木寡糖等碳水化合物，产生乳酸、

乙酸、丙酸、丁酸等有机酸, 这些有机酸可为宿主动物提供约 10% 的日常能量^[2]。因此, 提高肠道微生物对膳食纤维、木寡糖等碳水化合物的利用率可在一定程度上减少动物的粮食消耗, 进而缓解“人畜争粮”的矛盾。

凝结海恩德氏菌(*Heyndrickxia coagulans*)最早是由 Hammer^[3]从变质牛奶中分离获得的细菌, 因呈杆状, 且能使牛奶产酸、凝固成块而得名, 最初命名为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。该菌于 1980 年正式被“*Approved Lists of Bacterial Names*”收录^[4]。De Clerck 等^[5]于 2004 年对凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)的表型及生理生化特性进行了检测, 将该菌修订描述为革兰氏阳性、兼性厌氧的杆状细菌, 可产生椭圆形或球形的芽孢, 且发现不同凝结芽孢杆菌菌株间存在极大差异, 揭示了该菌显著的种内异质性。2020 年, Gupta 等^[6]对 300 余个芽孢杆菌的基因组进行了系统基因组学比较分析, 将凝结芽孢杆菌重新归类并命名为凝结魏茨曼氏菌(*Weizmannia coagulans*)。随后的 2023 年, Narsing Rao 等^[7]根据全基因组序列的氨基酸一致性(amino acid identity, AAI)分析结果将魏茨曼氏菌属(*Weizmannia*)重新分类为海恩德里克斯氏菌属(*Heyndrickxia*), 凝结魏茨曼氏菌(*W. coagulans*)随之更名为凝结海恩德氏菌(*Heyndrickxia coagulans*)。

凝结海恩德氏菌产生的多种酶类能辅助分解饲料中的纤维素等复杂营养物质产生乳酸, 一方面可降低动物肠道 pH 值, 抑制病原菌繁殖, 起到替代抗生素的作用; 另一方面, 乳酸也是重要的供能物质, 可以提升动物的生产性能, 因此被广泛用作饲料添加剂^[8]。来自不同生境的凝结海恩德氏菌菌株间的生理特性存在显著异质性^[5]。本研究从多种环境中分离凝结海恩德氏菌菌株, 从中筛选产酸能力、胃肠耐受性、抑菌活性、产酶特性以及对多种糖和饲料原料利用能力较优的菌株, 以期高效节粮型饲料益生菌的开发与应用提供科学依据和优良菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

由于凝结海恩德氏菌广泛分布于土壤、腐败水果及粪便等环境中^[9], 因此采集以上环境样品作为本研究菌株的分离材料, 具体信息详见表 1。

1.1.2 试剂及培养基

PBS 缓冲液按照李奕等^[10]的方法配制。营养琼脂培养基(NA)、MRS 培养基, 广东环凯生物科技有限公司。定性产酸显色培养基按照王婷等^[11]的方法制备; 检测菌株产酸能力采用改良 MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, 葡萄糖 5.0, 牛肉膏 5.0, 氯化钙 0.15, 一水合硫酸锰 0.1, 氯化钠 2.5, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, 番茄粉 0.5, 调节 pH 至 7.0。蛋白酶活性筛选采用添加 8 g 酪蛋白的改良 MRS 培养基。以等量糖和饲料替代改良 MRS 培养基中的葡萄糖, 进行糖和饲料利用能力的测定。人工胃液、肠液和胆盐培养基, 上海源叶生物科技有限公司。营养琼脂培养基(NA)、血琼脂培养基, 青岛海博生物技术有限公司。

1.2 凝结海恩德氏菌的分离与鉴定

1.2.1 菌株的分离与纯化

每种样品取 5 g 加入 95 mL PBS 缓冲液中, 于 17 °C、220 r/min 振荡 1 h 后, 梯度稀释至 10⁻⁶。取 200 μL 稀释液分别涂布于 NA 和 MRS 培养基, 分别置于 40 °C 和 45 °C 培养 24–48 h。待菌株长出后, 根据菌落形态挑取平板上的不同单菌落, 将菌株纯化后接种至 MRS 斜面保存。

1.2.2 分离菌株的鉴定

将分离菌株用 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)进行 DNA 提取。采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTT

表1 菌株分离样品信息

Table 1 Information of samples for isolation

Sample	Location	Latitude and longitude	Altitude/m	Sample source
1	Mengya Valley, Menghai Town, Jinghong City, Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture	100.50°N, 22.10°E	880	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>
2	Mengya Valley, Menghai Town, Jinghong City, Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture	100.50°N, 22.10°E	755	Rotten <i>Mangifera indica</i>
3	Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences	101.25°N, 21.41°E	570	Soil
4	Xianghe Animal Husbandry (Layer Farm), Cancuo Village, Huangchuan Village Committee, Duodian Township, Jinning County, Kunming City, Yunnan Province	102.48°N, 24.56°E	1 787	Chicken manure
5	Bingxiang Breeding Co., Ltd. (Layer Farm), Guanba Village, Shuijing County, Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture, Yunnan Province	102.76°N, 23.42°E	2 278	Chicken manure
6	Yunda Agricultural Development Co., Ltd. (Layer Farm), Fuda Village, Yanshan County, Wenshan Zhuang and Miao Autonomous Prefecture, Yunnan Province	104.39°N, 23.47°E	1 470	Chicken manure
7	Xunxing Animal Husbandry (Pig Farm), Xingcun Village, Jifeng Town, Xundian Hui and Yi Autonomous County, Kunming City, Yunnan Province	102.70°N, 25.46°E	2 032	Mixed pig manure (sow pen, finishing pen, nursery pen)
8	Qiancun Animal Husbandry (Pig Farm), Xiguan Community, Yuezhou Town, Qilin District, Qujing City, Yunnan Province	100.80°N, 25.43°E	1 820	Mixed pig manure (sow pen, finishing pen, nursery pen)
9	Hong'an Animal Husbandry Paper Mill Pig Breeding Base, Zhudian Town, Xiangyun County, Dali Bai Autonomous Prefecture, Yunnan Province	100.80°N, 25.43°E	1 960	Mixed pig manure (sow pen, finishing pen, nursery pen)

GTTACGACTT-3')进行菌株 16S rRNA 基因的扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): $2\times$ Taq PCR Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测得的 16S rRNA 基因序列提交至 EzBioCloud 进行比对, 搜索并调取相似序列, 利用 MEGA 11 软件, 采用邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树, 确定菌株的种属^[12]。

1.3 凝结海恩德氏菌的饲用潜力评价

1.3.1 凝结海恩德氏菌的产酸能力检测

有机酸是动物重要的直接或间接能源物质^[13], 且产酸能力是凝结海恩德氏菌的核心益

生性能^[14]。将纯化好的菌株接种于产酸显色培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 进行产酸的定性筛选。若菌株产酸, 则可使显色培养基中的溴甲酚绿指示剂由蓝绿色转变为黄色。将定性筛选阳性菌株接种至改良 MRS 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h 后测定 pH, 进行产酸的定量检测。同时按照《食品中有机酸的测定》(GB 5009.157—2016)^[15]中的高效液相色谱法(HPLC)对产酸能力最强菌株的有机酸种类进行测定, 并采用革兰氏染色法对其进行染色及形态观察。采用 1.2.2 节中的方法基于 16S rRNA 基因构建产酸能力最强菌株的系统发育树。

1.3.2 凝结海恩德氏菌的胃肠耐受性评估

将 1.3.1 节中筛选获得的产酸能力较强的菌株作为研究对象开展后续活性筛选实验。胃肠耐受能力是细菌成为优良饲用益生菌的重要前

提。本研究将 1 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的待测菌悬液分别接种于 pH 3.0 的人工胃液和胃蛋白酶液中处理 2 h, 再取该处理液 1 mL 加入 pH 6.8 的人工肠液和胰蛋白酶液中处理 2 h, 以检测菌株的胃肠耐受能力; 将相同浓度的待测菌悬液接种于胆盐液体培养基中, 37 °C 静置培养 2 h 以检测菌株的胆盐耐受能力。最后, 将上述 2 种处理液稀释 1 000 倍后涂布于改良 MRS 培养基, 40 °C 培养 24 h 后进行平板计数, 计算菌株的存活率。

1.3.3 凝结海恩德氏菌产表面活性素能力检测

表面活性素具有广谱抗菌和抗病毒活性, 还具有良好的乳化作用, 可以促进肠道内乳糜微粒的形成、提高脂肪的消化吸收^[16]。本研究采用排油圈法检测分离的凝结海恩德氏菌产表面活性素的能力, 即在油膜中心加入 10 μ L 待测菌株发酵液, 测量排油圈的大小, 排油圈越大表明产表面活性素能力越强^[17]。

1.3.4 凝结海恩德氏菌的抑菌活性检测

采用牛津杯法检测分离菌株对致病性大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) C83922、肠沙门氏菌肠亚种 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) ATCC 14028、A 型产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens* type A) CVCC 1142、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538P 的抑制活性。牛津杯中加入 200 μ L、浓度为 1×10^8 CFU/mL 的待测菌株菌悬液。将大肠杆菌、肠沙门氏菌、金黄色葡萄球菌涂布于 NA 培养基, 37 °C 培养 24 h。A 型产气荚膜梭菌涂布于血琼脂培养基, 30 °C 厌氧培养 24 h。测量并统计抑菌圈直径。

1.3.5 凝结海恩德氏菌的蛋白酶活性检测

以 1.1.2 节中的改良 MRS 培养基为基础培养基, 设置 3 组培养基, 即分别以 8 g 酪蛋白、8 g 酪蛋白+5 g 蛋白胨、8 g 酪蛋白+10 g 蛋白胨替代原改良 MRS 培养基中的 10 g 蛋白胨。将分离菌株以点接法接种于上述 3 组培养基上, pH

7.0, 分别于厌氧和好氧条件下 37 °C 培养 72 h。测量透明圈直径 (D) 和菌落直径 (d), 计算 D/d 值, 据此判断产蛋白酶活性强弱^[18]。将筛选获得的蛋白酶活性最高的菌株分别接种于 pH 梯度为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的一系列蛋白酶活筛选培养基中, 37 °C 条件下同时设置厌氧与好氧 2 种培养环境, 持续培养 72 h 后系统测定各组的 D/d 比值, 从而深入探究不同 pH 条件对菌株蛋白酶活性的影响。

1.3.6 凝结海恩德氏菌对各类糖和饲料原料的利用能力检测

以等量木寡糖替代 1.1.2 节中改良 MRS 液体培养基的葡萄糖, 将菌株接种于该液体培养基, 分别于厌氧和好氧条件下 37 °C 培养 24 h, 测定培养液的 OD_{600} 。以改良 MRS 培养基和不添加葡萄糖的改良 MRS 培养基作为阳性和阴性对照。将生长最好的菌株分别接种于以等量木寡糖、木聚糖、 β -葡聚糖、水苏糖、棉子糖、纤维素等糖类, 以及棉粕、棕榈粕、葵花粕、菜粕、豆粕、麦麸等饲料原料替代葡萄糖的改良 MRS 液体培养基中, 初始 pH 7.0, 37 °C、180 r/min 条件下培养 24 h 后检测培养液的 pH, 测定菌株对各类多糖和饲料原料的利用产酸情况。本研究所有检测结果均为 3 组平行实验所得。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定与系统发育树的构建

本研究分离共获得 133 株菌, 去除重复后共鉴定出 27 个种 (图 1), 分属于 3 门 11 科 15 属。此次分离共获得目的菌株——凝结海恩德氏菌 23 株, 其中从腐败菠萝蜜和腐败芒果中分别获得 8 株和 6 株, 土壤中获得 6 株, 鸡粪和猪粪中分别获得 1 株和 2 株 (表 2)。133 株菌中, *Heyndrickxia* 属所在的芽孢杆菌门 (*Bacillota*) 的菌株数量最多, 为 117 株; *Heyndrickxia* 属菌株有 43 株, 占分离菌株总数的 32.33%。

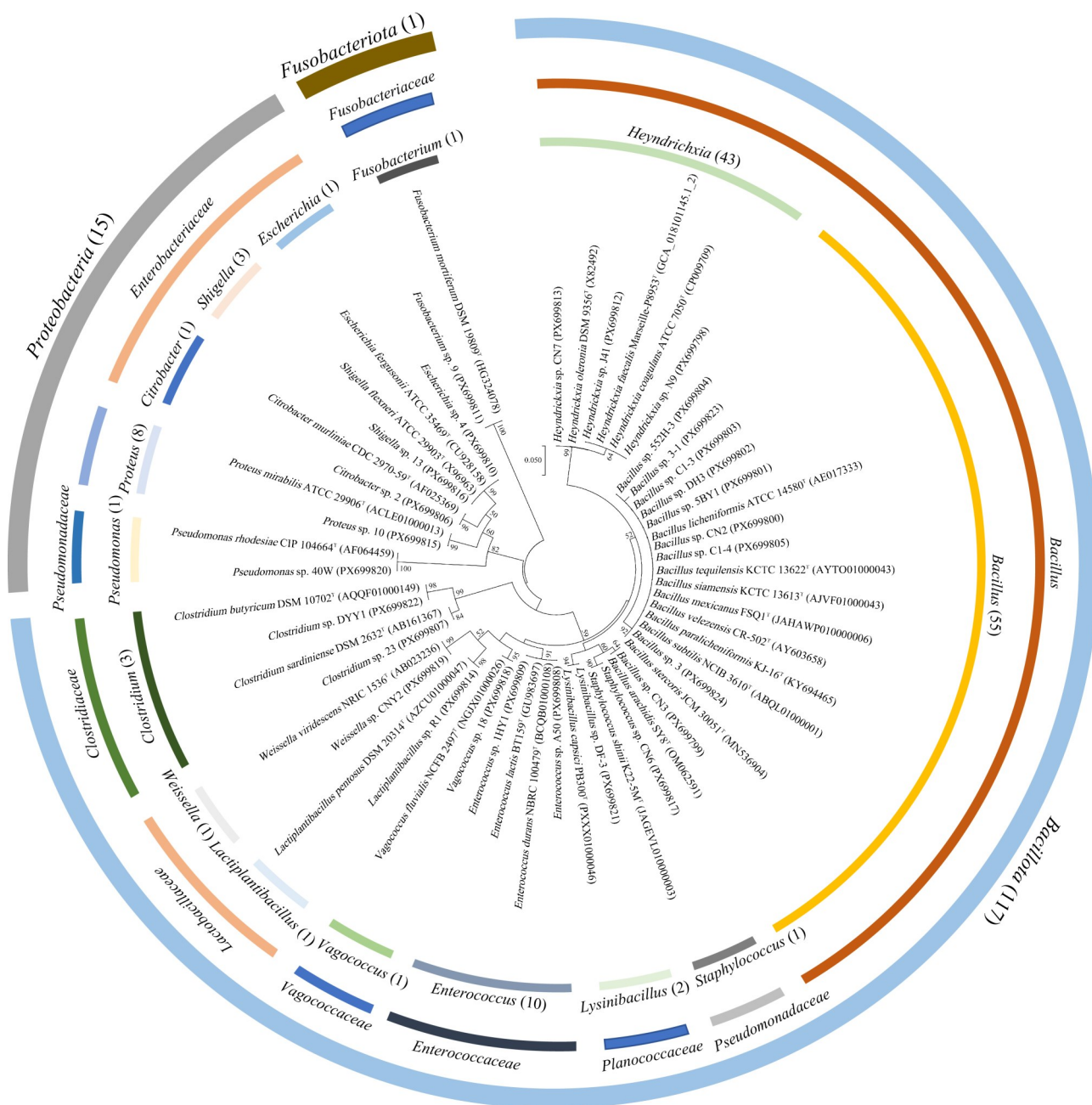


图1 分离细菌系统发育树及分离菌株数

Figure 1 Phylogenetic tree and number of isolated bacterial strains. The outer circle represents the number of strains at the phylum level, the middle circle represents the number of strains at the family level, and the inner circle represents the number of strains at the genus level.

2.2 凝结海恩德氏菌的产酸检测情况及 N9 鉴定结果

对凝结海恩德氏菌进行产酸定性检测，发现 23 株凝结海恩德氏菌均能使产酸显色培养基

中的溴甲酚绿指示剂由蓝绿色转变为黄色(图 2A)，表明 23 株凝结海恩德氏菌均能够产酸。pH 检测结果(图 2B)显示，23 株凝结海恩德氏菌的 pH 显著降低，但不同菌株间产酸效果存在较

表2 23株凝结海恩德氏菌的16S rRNA基因相似性及分离源

Table 2 16S rRNA gene similarity and source of 23 *Heyndrickxia coagulans* strains

Strain No.	16S rRNA gene similarity/%	Source	Strain No.	16S rRNA gene similarity/%	Source
N1	98.93	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>	N13	98.95	Pig manure
N2	99.08	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>	N14	98.99	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>
N3	99.05	Rotten <i>Mangifera indica</i>	N15	99.49	Soil
N4	99.59	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>	N16	99.38	Rotten <i>Mangifera indica</i>
N5	99.66	Soil	N17	99.80	Pig manure
N6	98.95	Soil	N18	98.72	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>
N7	99.11	Rotten <i>Mangifera indica</i>	N19	98.67	Soil
N8	99.53	Chicken manure	N20	99.34	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>
N9	99.36	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>	N21	99.29	Soil
N10	99.07	Soil	N22	99.08	Rotten <i>Mangifera indica</i>
N11	99.27	Rotten <i>Mangifera indica</i>	N23	99.16	Rotten <i>Artocarpus heterophyllus</i>
N12	99.40	Rotten <i>Mangifera indica</i>			

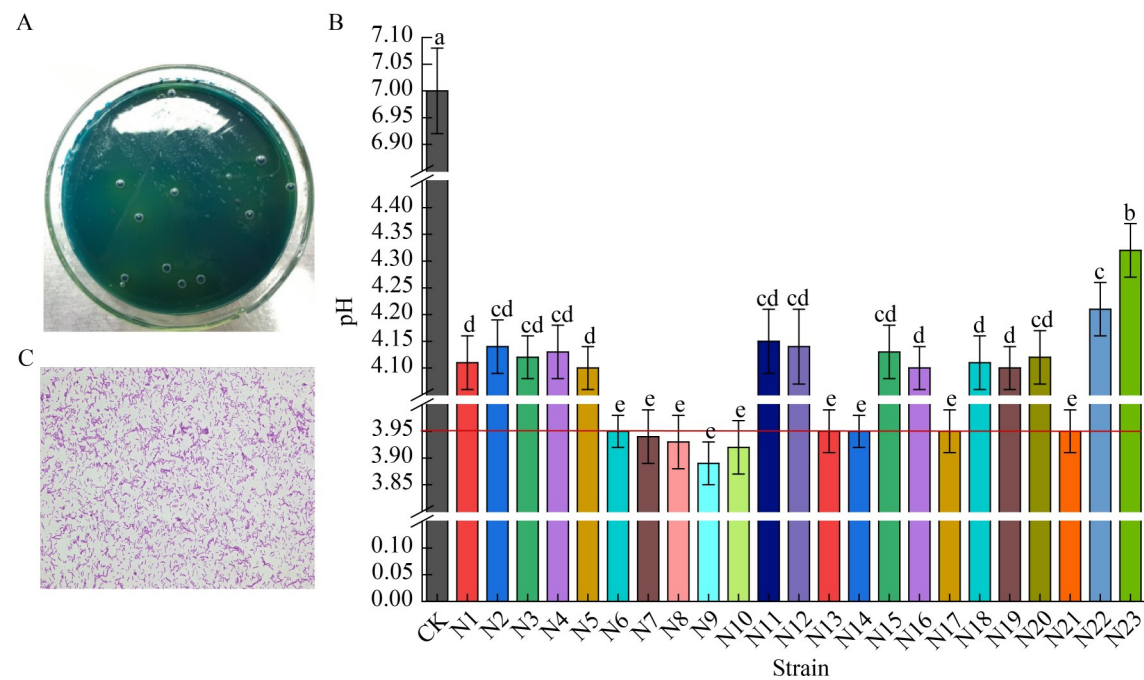


图2 23株凝结海恩德氏菌培养24 h后的产酸情况及菌株N9的革兰氏染色结果

Figure 2 Acid production of 23 *Heyndrickxia coagulans* strains after 24 h of culture and Gram staining result of strain N9. A: Growth of 23 strains on qualitative acid-producing chromogenic medium; B: Quantitative determination of acid production (Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$); C: Gram staining of *H. coagulans* N9.

大差异,其中9株菌的pH降至3.95以下,因此选取这9株菌作为后续实验菌株。其中菌株N9的pH最低,降至 3.89 ± 0.05 ,表明该菌株产酸能力最强。对其发酵液进行产酸图谱测定发现,菌株N9可产生 $(3\,370.00\pm 87.36)\mu\text{g/mL}$ 的乳酸,占总有机酸的94.82%;此外,还有 $(158.00\pm 6.31)\mu\text{g/mL}$ 的乙酸, $(22.00\pm 1.85)\mu\text{g/mL}$ 的甲酸,以及微量的丙酸 $(3.00\pm 0.23)\mu\text{g/mL}$ 和丁酸 $(1.00\pm 0.14)\mu\text{g/mL}$ 。

进一步对产酸能力最强的菌株N9进行了革兰氏染色观察。结果显示,菌株N9呈现出典型的凝结海恩德氏菌杆状形态及革兰氏阳性菌的紫色(图2C)。16S rRNA基因系统发育分析显示,菌株N9与*Heyndrickxia coagulans* ATCC 7050^T聚类形成一个独立分支(图3),且二者16S rRNA基因序列相似性最高(99.42%),以上系统发育关系明确支持菌株N9鉴定为凝结海恩德氏菌(*H. coagulans*)。

2.3 凝结海恩德氏菌的胃肠耐受检测结果

胃肠耐受实验结果显示(图4),9株凝结海恩德氏菌中N21、N9的胃肠耐受能力较强,留

存率分别达 $(78.30\pm 2.64)\%$ 、 $(73.50\pm 1.54)\%$;其次是N14,留存率为 $(69.40\pm 2.59)\%$;N8、N13菌株的留存率处于中等水平,分别为 $(55.60\pm 3.44)\%$ 、 $(55.30\pm 3.24)\%$;而N17、N10、N7、N6的留存率相对较低,均低于50.00%。综上所述,N21、N9在模拟胃肠液处理条件下的留存率显著高于其他菌株,具备更优异的胃肠环境耐受特性。

经0.3%胆盐处理2h后,9株凝结海恩德氏菌的留存率与胃肠耐受程度较为一致。其中,N21、N9菌株的胆盐耐受能力最强,留存率分别达 $(89.20\pm 1.71)\%$ 、 $(83.20\pm 1.66)\%$;其次是N14,留存率为 $(77.10\pm 3.55)\%$;N8、N13菌株的留存率处于中等水平,而N17、N10、N7的留存率相对较低,N6菌株的胆盐耐受性最差。综上可知,N21、N9在0.3%胆盐处理条件下的留存率显著高于其他菌株,具备更优异的胆盐耐受特性。

2.4 九株凝结海恩德氏菌的产表面活性素能力

由图5A可知,9株凝结海恩德氏菌均能产

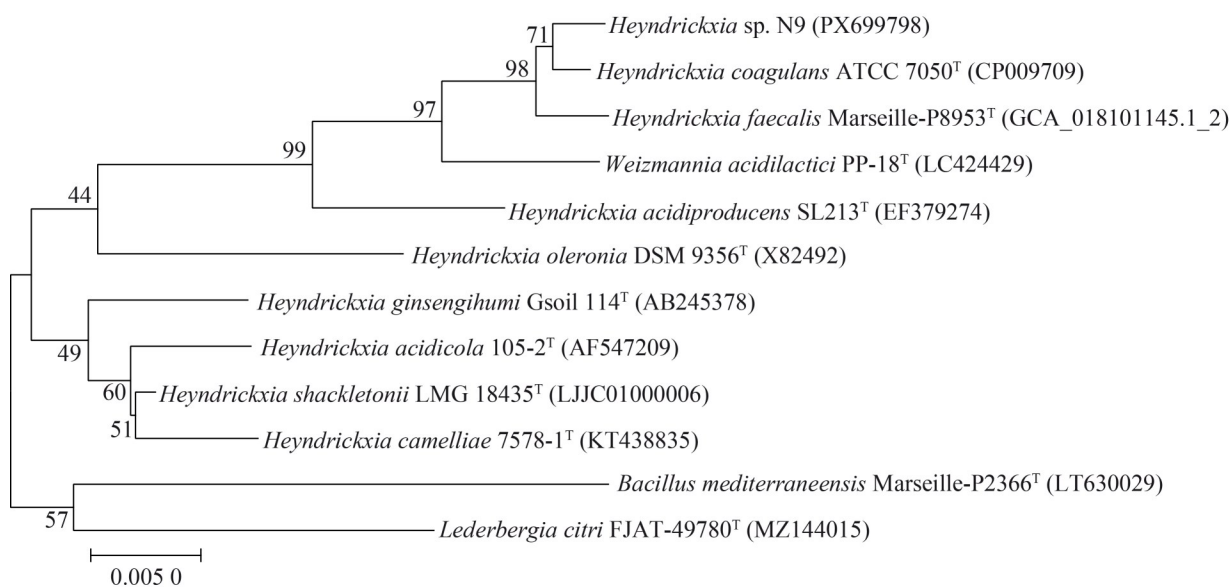


图3 菌株N9基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain N9 based on 16S rRNA gene.

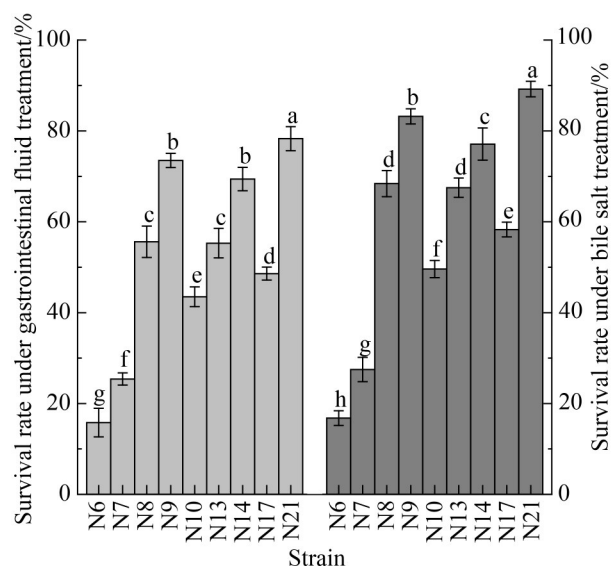


图4 九株凝结海恩德氏菌在胃肠液处理及胆盐处理下的存留率

Figure 4 Survival rates of nine *Heyndrickxia coagulans* strains treated with gastrointestinal fluid and bile salt. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

生表面活性素, 但菌株间的活性存在显著差异。从排油圈的大小统计可以看出(图 5B), N9、N8 产表面活性素能力较强, 排油圈直径分别为 (43.00 ± 0.46) mm 和 (40.00 ± 0.49) mm; 其次是 N14、N13、N10、N7, 排油圈直径为 34.00–38.00 mm; N6、N21、N17 产表面活性素能力相对较差, 排油圈直径为 30.00–32.00 mm。

2.5 九株凝结海恩德氏菌的抑菌活性

抑菌实验结果表明(图 6), 9 株凝结海恩德氏菌菌株对检测的 4 种肠道常见病原菌均有不同程度的抑制作用。检测菌株对肠沙门氏菌的抑制效果最好, 其中菌株 N9、N14、N13、N17 的抑制效果尤为突出; 其次为致病性大肠杆菌, 其中 N9、N7、N13、N14 的抑制效果高于其他菌株; 9 株凝结海恩德氏菌菌株对 A 型产气荚膜梭菌的抑制效果差异较大, 其中 N8、N13 的抑制效果最好, 其次为 N6、N9、N17; 检测菌株对金黄色葡萄球菌的抑制效果一般, 其中菌

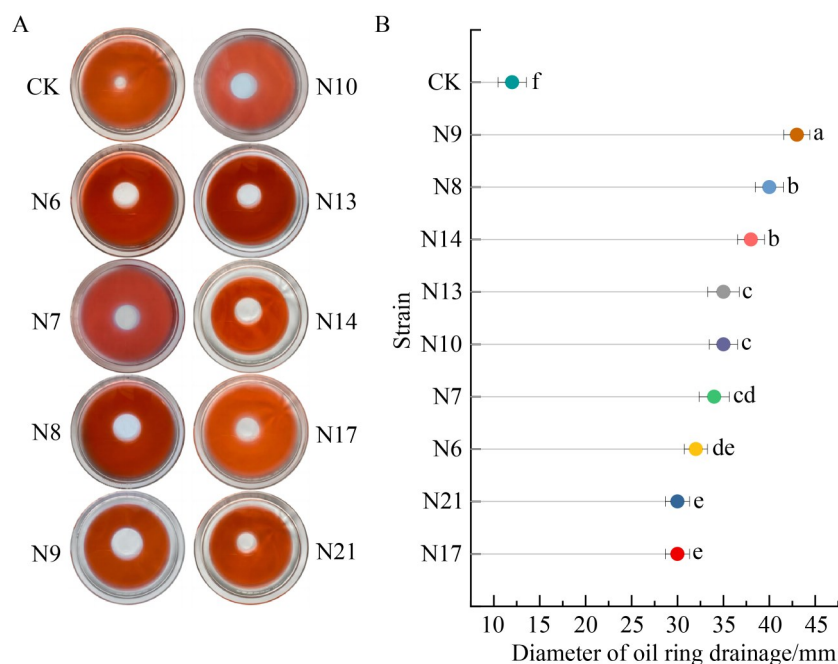


图5 九株凝结海恩德氏菌产表面活性素能力

Figure 5 Surfactin-producing ability of nine *Heyndrickxia coagulans* strains. A: Qualitative detection of oil displacement zone; B: Oil displacement diameter. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

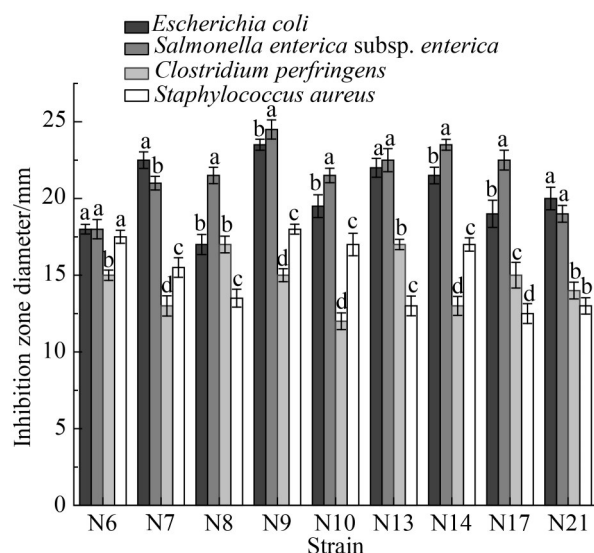


图6 九株凝结海恩德氏菌对4种肠道常见病原菌的抑制作用

Figure 6 Inhibitory effects of nine *Heyndrickxia coagulans* strains on four intestinal pathogenic bacteria. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

株 N9、N6 的抑制效果最好，抑菌圈直径分别为 (18.00 ± 0.32) mm 和 (17.50 ± 0.42) mm。总体而言，9 株凝结海恩德氏菌菌株对革兰氏阴性菌的抑制效果优于革兰氏阳性菌。菌株 N9 对肠沙门氏

菌、致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用均为最强，对 A 型产气荚膜梭菌的抑制效果仅次于 N8、N13，是综合抑菌效果最好的菌株。

2.6 九株凝结海恩德氏菌的蛋白酶活性

九株凝结海恩德氏菌产蛋白酶的定性检测结果显示，有氧条件下，N9 的蛋白酶活性最好， D/d 值最高，为 1.72 ± 0.33 ；其次是 N13、N6， D/d 值分别为 1.61 ± 0.25 、 1.49 ± 0.56 ，其余 6 株凝结海恩德氏菌菌株的蛋白酶活性差异不大。无氧条件下，N9 的 D/d 值仍为最高，达 4.02 ± 0.75 ；其次是 N14、N21、N17， D/d 值分别为 3.36 ± 0.89 、 3.09 ± 0.80 、 3.08 ± 0.64 ；N10、N13 处于中等水平， D/d 值分别为 2.84 ± 0.42 、 2.78 ± 0.26 ；N8、N7、N6 的 D/d 值相对较低。总体而言，9 株凝结海恩德氏菌菌株在无氧条件下的蛋白酶活性均显著优于有氧条件，且 N9 为蛋白酶活性最好的菌株。

鉴于菌株 N9 的蛋白酶活性表现最优，进一步分析了不同 pH 条件及不同易用氮源浓度下的蛋白酶活性特征。结果表明(图 7A)，好氧条件下，0 g/L 易用氮源处理组的蛋白酶活性最好，其酶活峰值呈区间式分布，pH 范围为 6.5–8.0；

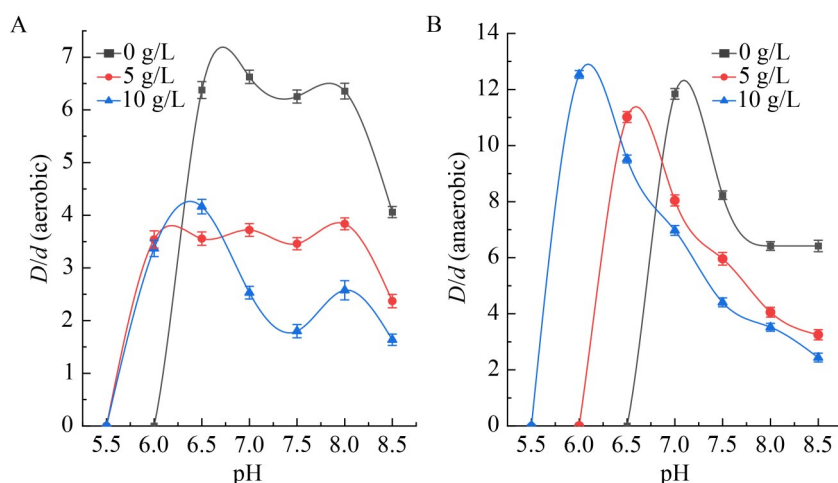


图7 菌株N9在不同易用氮源浓度和pH条件下的产酶曲线

Figure 7 Enzyme production curves of N9 under different available nitrogen source concentrations and pH. A: Aerobic conditions; B: Anaerobic conditions.

厌氧条件下的酶活曲线显示(图 7B), 随着易用氮源浓度的降低, 酶活峰值对应的 pH 逐渐增大, 从易用氮源 10 g/L 对应的酶活峰值 pH 6.00 ± 0.10 , 变为易用氮源 0 g/L 对应的酶活峰值 pH 7.00 ± 0.15 , 即随着易用氮源的减少酶活峰值对应的 pH 逐渐增大。

综上所述, 好氧环境下, 易用氮源浓度为 0 g/L 时 N9 的酶活最高; 厌氧环境下, N9 酶活最高的易用氮源浓度为 10 g/L, 且 2 种环境下蛋白酶活性较高的 pH 均集中于 6.0–8.0, 厌氧条件下的酶活峰值显著高于好氧条件。

2.7 九株凝结海恩德氏菌对糖和饲料原料的利用能力

从 9 株凝结海恩德氏菌菌株在无糖、葡萄糖、木寡糖 MRS 液体培养基上好氧条件下的生长情况可以看出(图 8), 除 N10、N13、N17 外,

其余 6 株菌均在木寡糖-MRS 中生长最好, 其中 N6、N7、N8、N9、N14 在木寡糖-MRS 中生长最佳, OD_{600} 值均大于 0.8; 在葡萄糖-MRS 上, N14、N8、N9 的生长较好; 在无糖 MRS 中, N6、N7、N9 的生长较好。厌氧条件下, 9 株凝结海恩德氏菌菌株在葡萄糖-MRS 上的生长最优, 其次为木寡糖-MRS 和无糖 MRS。

由于 N9 在无糖、葡萄糖、木寡糖 MRS 培养基上的生长情况均较好, 因此进一步评估了其对不同糖的利用情况。结果显示(图 9A、9B), 菌株 N9 在木寡糖-MRS 上的生长最好, OD_{600} 值最高, 为 0.81 ± 0.01 , 产酸能力也最强(pH 为 5.56 ± 0.01); 其次为水苏糖-MRS, OD_{600} 为 0.72 ± 0.04 (pH 为 6.60 ± 0.01)。上述结果表明, N9 对供试 7 类糖中木寡糖的利用及产酸能力最高, 对水苏糖等糖类的利用及产酸能力也较好。

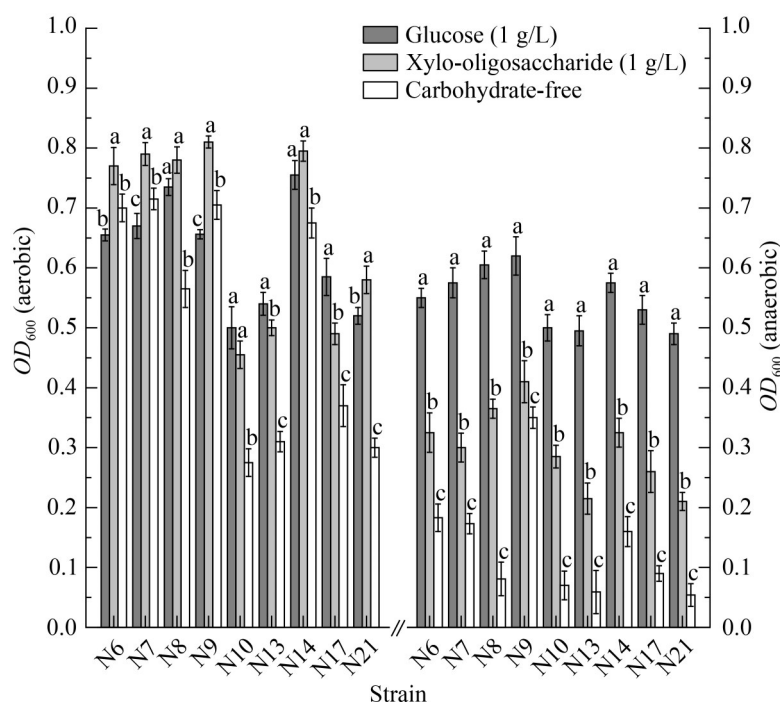


图8 九株凝结海恩德氏菌在无糖、葡萄糖、木寡糖MRS培养基上的生长情况

Figure 8 Growth of nine *Heyndrickxia coagulans* strains in MRS media supplemented with no sugar, glucose, and xylo-oligosaccharides. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

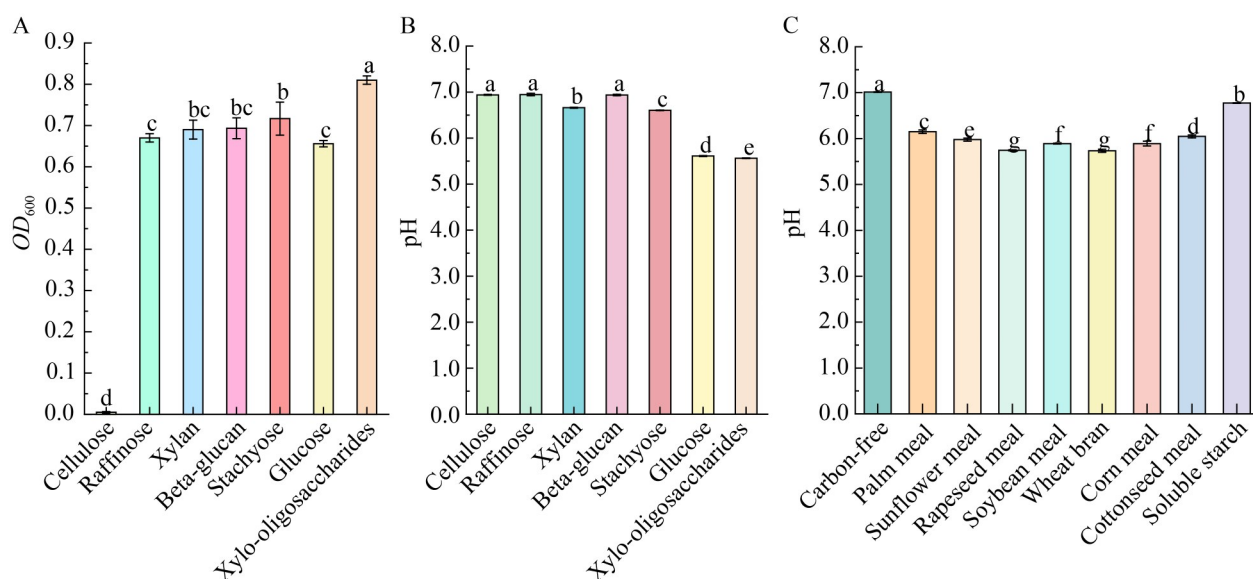


图9 菌株N9对不同糖和饲料的利用情况

Figure 9 Utilization of different carbohydrates and feed ingredients by strain N9. A: OD_{600} values corresponding to different carbohydrates; B: pH values corresponding to different carbohydrates; C: pH values corresponding to different feed ingredients. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

对不同饲料原料利用产酸的结果显示(图9C), N9 利用麦麸和菜粕产酸的效果最好, pH 分别为 5.73 ± 0.03 和 5.74 ± 0.01 ; 其次是豆粕、玉米粉和葵花粕, pH 分别为 5.89 ± 0.01 、 5.89 ± 0.05 、 5.98 ± 0.03 ; N9 利用棉粕和棕榈粕产酸的效果较差。上述结果表明, N9 利用不同饲料原料产酸的能力差异较大。

3 讨论与结论

畜牧业生产中抗生素的滥用正导致细菌耐药性日益加剧并快速蔓延, 且极有可能通过食物链威胁人类健康, 因此我国自 2020 年起全面禁止在饲料中添加抗生素。微生物可通过营养与空间竞争, 以及分泌酶、产酸、抗菌肽等代谢产物来调节肠道微生态, 进而减少动物腹泻、提升生长性能, 发挥抗生素替代作用^[19]。目前使用的饲料益生菌主要有芽孢杆菌、乳酸菌及酵母菌等, 多来源于人和动物肠道以及发酵食

物^[20]。凝结海恩德氏菌作为一类肠道益生菌, 其代谢产生的乳酸、多种酶类及抗菌物质等在调节动物肠道微生态平衡、增强动物免疫力、提升饲料利用率等方面具有显著优势^[21-22]。

本研究从腐败水果、土壤及畜禽粪便样品中共分离获得 133 株可培养细菌, 其中芽孢杆菌门(*Bacillota*)为优势菌门(占比 87.97%), 芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)为优势科(占比 73.68%)。此外, 本研究成功分离出凝结海恩德氏菌 23 株, 占分离菌株总数的 17.29%, 且海恩德里克斯氏菌属(*Heyndrickxia*)在属水平占比达 32.33%, 为后续功能筛选提供了充足的菌株资源。分类学上, 凝结芽孢杆菌经历了从 *B. coagulans* 到 *W. coagulans*, 再到 *H. coagulans* 的分类变迁^[7]。本研究通过 16S rRNA 基因序列比对与系统发育树分析明确了分离菌株的分类地位, 确保了研究对象的准确性。在获得可培养细菌的基础上, 本研究进一步评价了菌株产酸、胃肠耐受性、

产表面活性素、抑菌活性、蛋白酶活性以及对糖与饲料原料的利用能力等益生指标, 并从中筛选出综合性能较优的菌株, 为饲料益生菌的筛选提供了候选菌株材料。

产酸能力是凝结海恩德氏菌的核心益生特性之一, 其代谢产生的有机酸可通过降低肠道 pH 值抑制病原菌繁殖^[23-24]。此外, 凝结海恩德氏菌产生的有机酸还是重要的供能物质, 可起到“减饲料量、不减动物产量”, 即节粮的功效^[25-26]。本研究中 23 株凝结海恩德氏菌均能产酸, 其中 9 株菌株的 pH 降至 3.95 以下, 表现出优异的产酸潜力, 因此将其作为后续其他益生性能筛选的实验菌株。菌株 N9 的产酸能力最为突出, pH 低至 3.89 ± 0.05 。分析微生物代谢过程中有机酸的种类及含量是评价产酸菌株产酸性能最有力的依据^[27]。对产酸能力最强的菌株 N9 发酵液进行产酸图谱测定发现, 该菌株能产生大量乳酸($3\,370.00 \pm 87.36$) $\mu\text{g/mL}$ 及少量乙酸、甲酸等有机酸, 且乳酸产量显著高于同类研究报告, 表明其在调节肠道酸碱平衡及供能方面具有更强的应用潜力^[24,28-29]。

具备肠道耐受性是肠道益生菌发挥作用的首要前提^[30]。本研究中对 9 株凝结海恩德氏菌的胃肠耐受实验结果表明, 菌株 N9 经人工胃液+胃蛋白酶+人工肠液+胰蛋白酶液处理后留存率达(73.50 ± 1.54)%, 经 0.3% 胆盐处理后留存率达(83.20 ± 1.66)%。目前已报道的凝结海恩德氏菌经 0.3% 胆盐处理 2–4 h 后存留率为 40%–90%, 表明本研究中菌株 N9 的胆盐耐受率处于较高水平^[22,31-33]。凝结海恩德氏菌的抗逆性主要依赖其芽孢结构, 该结构能抵御高温、酸碱及胆盐等胁迫^[34]。本研究结果进一步验证了这一特性, 说明 N9 菌株能够在饲料的高温加工过程中及动物胃肠道消化过程中保持活性, 并在肠道内发挥益生作用。

表面活性素作为凝结海恩德氏菌产生的重要代谢产物, 兼具广谱抗菌活性与乳化功能, 既能抑制病原菌生长, 又能促进肠道脂肪消化

吸收^[35-40]。排油圈实验结果表明, N9 菌株排油圈直径达(43.00 ± 0.46) mm, 为所有供试菌株中最高, 表明其产表面活性素能力突出, 这一特性使其在改善动物营养吸收与肠道菌群健康方面具有双重促进作用。抑菌活性检测结果显示, 9 株凝结海恩德氏菌对致病性大肠杆菌、肠沙门氏菌肠亚种、A 型产气荚膜梭菌及金黄色葡萄球菌均有不同程度的抑制作用, 且对肠沙门氏菌肠亚种、大肠杆菌等革兰氏阴性菌的抑制效果优于 A 型产气荚膜梭菌及金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌, 这与凝结芽孢杆菌主要通过产酸及抗菌肽发挥抑菌作用的机制相符^[41]。其中, N9 菌株表现出最优的综合抑菌效果, 对肠沙门氏菌肠亚种、致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及 A 型产气荚膜梭菌的抑菌圈直径达 15.00–24.50 mm, 远高于已报道的 12.37–16.59 mm^[42]。菌株 N9 广谱且强效的抑菌能力为防控动物肠道病原菌感染、减少腹泻发生提供了重要保障^[43]。

蛋白酶可将饲料中大分子蛋白质降解为动物体更易吸收的小分子肽或游离氨基酸, 提升饲料的营养利用率, 因此蛋白酶活性是凝结海恩德氏菌辅助饲料中蛋白质成分消化吸收的关键^[44-45]。本研究中, 9 株凝结海恩德氏菌厌氧条件下的蛋白酶活性均显著高于好氧条件。其中, N9 菌株在有氧与厌氧条件下均表现出最优的蛋白酶活性, 产酶 pH 区间为 5.5–8.5。有氧条件下, 易用氮源浓度为 0 g/L 时酶活最高, 其次为易用氮源浓度减半(5 g/L), 最低为 10 g/L。该结果表明, 有氧条件下易用氮源含量对 N9 的蛋白酶活性有直接影响; 厌氧条件下, N9 的 D/d 值达 4.02 ± 0.75 , 显著高于其他菌株。不同 pH 下的酶活研究发现, 易用氮源 10 g/L 对应的产酶峰值 pH 为 6.00 ± 0.10 , 而易用氮源 0 g/L 对应的产酶峰值 pH 为 7.00 ± 0.15 , 即随着易用氮源的减少, 产酶峰值对应的 pH 逐渐增大。该变化规律与动物肠道从前到后易用氮源递减、pH 递增的生理特征高度吻合, 理论上可实现全肠段峰值产酶, 有效减少后肠段大分子蛋白质未完全

消化引发的病原菌发酵产臭气及胺类毒素问题^[46]。

木寡糖是饲料纤维中木聚糖降解产生的五碳糖，单胃动物不能直接对其进行利用，必须依靠肠道微生物将其发酵利用。因此，能够高效利用木寡糖的微生物，有助于提升动物对纤维素的整体转化效率，从而提高饲料的能值。9株凝结海恩德氏菌在无糖、葡萄糖、木寡糖MRS液体培养基上的生长情况显示，好氧条件下的生长情况整体优于厌氧条件。其中，N9菌株在有氧与厌氧条件下对木寡糖的利用均较好。本研究进一步评估了菌株N9对包括木寡糖在内的7种糖类的利用能力，结果显示，N9利用木寡糖时生长状态最佳，产酸量也最多；其次为水苏糖，但在该糖类中的产酸能力相对一般。对各类糖的利用能力可间接反映微生物协助宿主动物吸收营养的状况。本研究还检测了菌株N9在7种常见饲料原料上的产酸情况。结果表明，菌株N9能在棉粕、棕榈粕、葵花粕等7种饲料原料中不同程度地生长产酸。其中，N9在麦麸和菜粕中生长产酸的效果最好，其次为豆粕、玉米粉和葵花粕，而对棉粕和棕榈粕的利用较差。

本研究从腐败水果、土壤及粪便等样品中分离出23株凝结海恩德氏菌。其中，从腐败菠萝蜜中筛选出的菌株N9，不仅具备较强的抗逆性与产酸能力，还能抑制肠道常见病原菌，且具有良好的蛋白酶活性。优异的益生特性与饲料适配性表明该菌具有良好的饲用开发潜力。本研究为开发动物饲料节粮型益生菌储备了优良的菌种资源。

作者贡献声明

胡晓艳：菌株分离、纯化及鉴定；董皓天：分析数据及撰写文章；罗红娟：菌株的产酸测定及胃肠耐受性评估；周贤飞：菌株的表面活性素、抑菌及蛋白酶活性检测；李春秋：菌株的糖及饲料利用活性检测；曹艳茹：分析数据及修改文章；李亚平：设计实验及修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Khalil M, di Ciaula A, Mahdi L, Jaber N, di Palo DM, Graziani A, Baffy G, Portincasa P. Unraveling the role of the human gut microbiome in health and diseases[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(11): 2333.
- [2] Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *BMJ*, 2018: k2179.
- [3] Hammer BW. Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk[J]. *Iowa Agriculture Experiment Station Research Bulletin*, 1915(19): 119-132.
- [4] Skerman VBD, Sneath PHA, McGowan V. Approved lists of bacterial names[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1980, 30(1): 225-420.
- [5] De Clerck E, Rodriguez-Diaz M, Forsyth G, Lebbe L, Logan NA, DeVos P. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27(1): 50-60.
- [6] Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(11): 5753-5798.
- [7] Narsing Rao MP, Banerjee A, Liu GH, Thamchaipenet A. Genome-based reclassification of *Bacillus acidicola*, *Bacillus pervagus* and the genera *Heyndrickxia*, *Margalitia* and *Weizmannia*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(7): 005961.
- [8] Adami A, Cavazzoni V. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1999, 39(1): 3-9.
- [9] Mazhar S, Simon A, Khokhlova E, Colom J, Leeuwendaal N, Deaton J, Rea K. *In vitro* safety and functional characterization of the novel *Bacillus coagulans* strain CGI314[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 14: 1302480.
- [10] 李奕, 戴新佳, 符禹婷, 袁承志, 俞健, 王发祥. 鲢鱼小清蛋白源抗冻肽的制备、分离和表征[J]. *食品科学技术学报*, 2025, 43(5): 56-64.
Li Y, Dai XJ, Fu YT, Yuan CZ, Yu J, Wang FX. Preparation, isolation and characterization of antifreeze peptides derived from silver carp parvalbumin[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2025, 43(5): 56-64 (in Chinese).

- [11] 王婷, 安明轩, 李正浩, 胡瑞瑞, 王悦, 倪伟, 胡圣伟. 牛源产酸芽孢杆菌的分离筛选及益生特性研究[J]. 动物医学进展, 2023, 44(10): 12-18.
Wang T, An MX, Li ZH, Hu RR, Wang Y, Ni W, Hu SW. Isolation and screening of acid-producing *Bacillus* from cattle and study on its prebiotics[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2023, 44(10): 12-18 (in Chinese).
- [12] Chalita M, Kim YO, Park S, Oh HS, Cho JH, Moon J, Baek N, Moon C, Lee K, Yang J, Nam GG, Jung Y, Na SI, Bailey MJ, Chun J. EzBioCloud: a genome-driven database and platform for microbiome identification and discovery[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2024, 74(6): 006421.
- [13] Nelson DL, Michael MC. 生物化学原理: 中文版[M]. 周海梦, 等译. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [14] 代玉明, 黄涛, 熊涛. 鸡源凝结芽孢杆菌的筛选鉴定及益生性能评价[J]. 南昌大学学报(理科版), 2022, 46(4): 464-472, 480.
Dai YM, Huang T, Xiong T. Screening identification and evaluation of probiotic properties of *Bacillus coagulans* from chicken[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2022, 46(4): 464-472, 480 (in Chinese).
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定: GB 5009.157—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standard Determination of Organic Acids in Food: GB 5009.157—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [16] Hassanisaadi M. Surfactin as a multifaceted biometabolite for sustainable plant defense: a review[J]. Journal of Plant Pathology, 2025, 107(1): 149-165.
- [17] 刘佳琳, 李萌, 宁霄. 韩国芽孢八叠球菌脂肽类表面活性素的功能性评估及重组构建研究[J/OL]. [2026-01-16]. <https://link.cnki.net/doi/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.043368>.
Liu JL, Li M, Ning X. Functional evaluation and recombinant construction of lipopeptide surfactin from *Sporosarcina koreensis*[J/OL]. Journal of Nanchang University (Natural Science), [2026-01-16]. <https://link.cnki.net/doi/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.043368> (in Chinese).
- [18] 彭欣. 产酸性蛋白酶菌株的筛选及发酵液在种子萌发中的应用[D]. 海口: 海南大学, 2022.
Peng X. Screening of acid protease producing strains and application of fermentation broth in seed germination[D]. Haikou: Hainan University, 2022 (in Chinese).
- [19] Gupta R, Sharma S. Role of alternatives to antibiotics in mitigating the antimicrobial resistance crisis[J]. Indian Journal of Medical Research, 2022, 156(3): 464-477.
- [20] 柏萌, 张筠, 吕歌, 张守文. 功能性乳制品配料的研究动态[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(10): 200-207.
Bai M, Zhang Y, Lü G, Zhang SW. Research progress on ingredients for functional dairy products[J]. China Food Additives, 2025, 36(10): 200-207 (in Chinese).
- [21] 陈泽一, 白跃宇, 马曦. 凝结芽孢杆菌产芽孢特性及其在畜牧业中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2025, 61(5): 44-49.
Chen ZY, Bai YY, Ma X. Research progress on spore characteristics of *Bacillus coagulans* and its application in animal husbandry[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2025, 61(5): 44-49 (in Chinese).
- [22] 马丽. 凝结芽孢杆菌对感染鸡白痢沙门氏菌雏鸡肠道结构及微生态的影响[D]. 荆州: 长江大学, 2025.
Ma L. Effects of *Bacillus coagulans* on intestinal structure and microecology of chicks infected with *Salmonella pullorum*[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2025 (in Chinese).
- [23] 杨丹依. 鸡粪便中乳酸杆菌的分离培养及其富集培养条件优化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
Yang DY. Isolation of *Lactobacillus* in chicken feces and optimization of enrichment culture conditions[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024 (in Chinese).
- [24] 赵珈翊. 凝结芽孢杆菌维护鸡肠黏膜屏障抵御肠炎沙门氏菌感染的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
Zhao JY. The study of *Bacillus coagulans* on protecting the chicken intestinal mucosal barrier to defend *Salmonella enteritidis* infection[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [25] Pessione E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2012, 2: 86.
- [26] Brooks GA, Gaesser GA. End points of lactate and glucose metabolism after exhausting exercise[J]. Journal of Applied Physiology, 1980, 49(6): 1057-1069.
- [27] 张建梅, 胡顺珍, 穆熙军, 谢全喜, 谷巍. 一株具有产酸能力的芽孢杆菌的筛选及性能检测[J]. 家畜生态学报, 2012, 33(1): 66-72.
Zhang JM, Hu SZ, Mu XJ, Xie QX, Gu W. Screening and performance testing of an acid producing *Bacillus* strain[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2012, 33(1): 66-72 (in Chinese).
- [28] 陈秀秀, 孙洪浩, 孙小涵, 吕福军. 一株凝结芽孢杆菌的分离鉴定及益生性分析[J]. 饲料博览, 2020(11): 1-5, 9.
Chen XX, Sun HH, Sun XH, Lü FJ. Analysis of probiotic and isolation, identification of *Bacillus coagulans*[J]. Feed Review, 2020(11): 1-5, 9 (in Chinese).
- [29] 辛国芹, 汪祥燕, 曹斌, 兰江华, 徐海燕, 谷巍. 一株产酸凝结芽孢杆菌的筛选及耐受特性研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(4): 111-115.
Xin GQ, Wang XY, Cao B, Lan JH, Xu HY, Gu W. Screening and tolerance property of an acid-producing *Bacillus coagulans*[J]. China Brewing, 2022, 41(4): 111-115 (in Chinese).
- [30] Lee J, Yun HS, Cho KW, Oh S, Kim SH, Chun T, Kim B, Whang KY. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp. immune modulation and longevity[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 80-86.
- [31] 刘莹, 范京惠, 顾文源, 赵云环, 张帅, 左玉柱. 猪源芽孢杆菌的筛选、体外益生特性及安全性评估[J]. 中国预防兽医学报, 2025, 47(10): 1028-1036.
Liu Y, Fan JH, Gu WY, Zhao YH, Zhang S, Zuo YZ. Screening, *in vitro* probiotic properties and safety evaluation of porcine-derived *Bacillus* strains[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2025, 47(10): 1028-1036 (in Chinese).

- [32] 孙彦婷, 康宇, 詹妍, 张冬萱, 刘畅, 边传周, 张晓静, 白静, 乔宏兴. 鸡源凝结芽孢杆菌的分离鉴定及耐受性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(11): 4187-4196.
Sun YT, Kang Y, Zhan Y, Zhang DX, Liu C, Bian CZ, Zhang XJ, Bai J, Qiao HX. Isolation, identification and stress resistance analysis of *Bacillus coagulans* from chickens[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(11): 4187-4196 (in Chinese).
- [33] 张韵, 赵丽娜, 曹琳, 王晓彤, 周馨魁, 古绍彬. 益生凝结芽孢杆菌的筛选及生物学特性研究[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(1): 109-114.
Zhang Y, Zhao LN, Cao L, Wang XT, Zhou XK, Gu SB. Screening and biological characteristics of probiotic *Bacillus coagulans*[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2017, 53(1): 109-114 (in Chinese).
- [34] 卜小丽, 房一粟, 刘世操, 韩朋伟, 吴丰惟, 祝爱侠. 液态发酵凝结芽孢杆菌制剂的制备工艺及性能评价[J]. 饲料工业, 2016, 37(6): 54-58.
Bu XL, Fang YS, Liu SC, Han PW, Wu FW, Zhu AX. Preparation technology and performance evaluation of *Bacillus coagulans* preparation by liquid fermentation[J]. Feed Industry, 2016, 37(6): 54-58 (in Chinese).
- [35] 李桐, 吴立新, 周文豪, 梁晓芳. 脂肽在畜禽和水产养殖中的应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2025, 37(11): 7364-7376.
Li T, Wu LX, Zhou WH, Liang XF. Progress in application of lipopeptide in livestock, poultry and aquaculture husbandry[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2025, 37(11): 7364-7376 (in Chinese).
- [36] 王占鑫, 卢薇, 崔嘉芮, 吴雨莹, 李月红. 枯草芽孢杆菌和植物乳杆菌在青贮饲料中的应用[J]. 饲料博览, 2025(5): 24-29.
Wang ZX, Lu W, Cui JR, Wu YY, Li YH. Fermentation effects of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* on silage[J]. Feed Review, 2025(5): 24-29 (in Chinese).
- [37] 谢耀儒, 上官玲玲, 严彩柠, 刘子雄, 代俊. 贝莱斯芽孢杆菌应用进展: 从农牧业到食品加工[J/OL]. [2026-01-16]. <https://link.cnki.net/doi/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.044865>.
Xie YR, Shangguan LL, Yan CN, Liu ZX, Dai J. Advances in the application of *Bacillus velezensis*: from agriculture and animal husbandry to food processing[J/OL]. [2026-01-16]. <https://link.cnki.net/doi/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.044865> (in Chinese).
- [38] Huszcza E, Burczyk B. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2006, 61(9/10): 727-733.
- [39] 翟少伟, 李剑, 孙秀文. 饲料中添加表面活性素对吉富罗非鱼生长性能、血清生化指标及脂肪代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(12): 3959-3967.
Zhai SW, Li J, Sun XW. Effects of surfactin supplementation on growth performance, serum biochemical indexes and lipid metabolism of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(12): 3959-3967 (in Chinese).
- [40] 赵蕊. 枯草芽孢杆菌质粒遗传转化的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2020.
Zhao R. Researches on plasmid genetic transformation in *Bacillus subtilis*[D]. Wuhan: Wuhan University, 2020 (in Chinese).
- [41] 井东源, 莫天录, 李永臻. 对 G-菌有效的细菌素抗菌机制及应用进展[J]. 中国饲料, 2025(17): 20-27.
Jing DY, Mo TL, Li YZ. Antimicrobial mechanisms and application progress of bacteriocins effective against Gram-negative bacteria[J]. China Feed, 2025(17): 20-27 (in Chinese).
- [42] 王雪艳, 杨睿, 王乙茹, 苗华彪, 黄遵锡, 陈德近, PHOOTHAPANE Vanhnaseng, 程志斌. 3 株凝结芽孢杆菌抑菌性能的比较研究[J]. 饲料工业, 2025, 46(15): 167-172.
Wang XY, Yang R, Wang YR, Miao HB, Huang ZX, Chen DJ, Vanhnaseng P, Cheng ZB. Studies on bacteriostasis of three *Bacillus coagulans* strains[J]. Feed Industry, 2025, 46(15): 167-172 (in Chinese).
- [43] 高梅凤, 黄华国. 牦牛腹泻病的流行特点病因分析与综合防治策略[J]. 农业与技术, 2025, 45(23): 102-104.
Gao MF, Huang HG. Epidemic characteristics, etiological analysis and comprehensive prevention and control strategies of yak diarrhea[J]. Agriculture and Technology, 2025, 45(23): 102-104 (in Chinese).
- [44] 王岩, 张志强, 朱冰清, 孟威, 朱会霞, 刘晶晶, 焦晴, 宋栩桐. 枯草芽孢杆菌与小球藻粉对罗非鱼生长性能、免疫力及肌肉品质的影响[J]. 饲料研究, 2025, 48(23): 77-81.
Wang Y, Zhang ZQ, Zhu BQ, Meng W, Zhu HX, Liu JJ, Jiao Q, Song XT. Effects of *Bacillus subtilis* and *Chlorella powder* on growth performance, immunity, and muscle quality of tilapia[J]. Feed Research, 2025, 48(23): 77-81 (in Chinese).
- [45] 吴雨桐, 王春强, 张喆, 马巍, 马永和, 秦齐缘. 复合微生物制剂对蛋鸡生产性能、蛋品质、养分表现代谢率和新城疫病毒抗体水平的影响[J]. 饲料研究, 2025, 48(20): 47-51.
Wu YT, Wang CQ, Zhang Z, Ma W, Ma YH, Qin QY. Effects of compound microecological preparations on production performance, egg quality, nutrient apparent metabolism rate, and Newcastle disease virus antibody levels in laying hens[J]. Feed Research, 2025, 48(20): 47-51 (in Chinese).
- [46] Herrera M, Byerley LO. Dietary nitrogen and its role in the gut microbiome and inflammatory bowel disease: a narrative review[J]. Nutrients, 2025, 17(14): 2373.