

茶花鸡源罗伊特氏黏液乳杆菌 CHF7-2 的益生特性及全基因组测序分析

徐乐^{1,2#}, 陈诗宇^{1#}, 王上¹, 张志翔¹, 董斌¹, 林秋叶^{3*}, 曹振辉^{1,2*}

- 1 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明
- 2 云南省动物营养与饲料重点实验室, 云南 昆明
- 3 云南农业大学 食品科学技术学院, 云南 昆明

徐乐, 陈诗宇, 王上, 张志翔, 董斌, 林秋叶, 曹振辉. 茶花鸡源罗伊特氏黏液乳杆菌 CHF7-2 的益生特性及全基因组测序分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1197-1218.

XU Le, CHEN Shiyu, WANG Shang, ZHANG Zhixiang, DONG Bin, LIN Qiuye, CAO Zhenhui. Probiotic characterization and whole genome sequencing of *Limosilactobacillus reuteri* CHF7-2 from Chahua chicken[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 1197-1218.

摘要: 【目的】解析茶花鸡源罗伊特氏黏液乳杆菌 CHF7-2 的益生特性和安全性, 为开发利用该菌株作为饲用微生态制剂提供理论依据。【方法】通过体外试验检测菌株 CHF7-2 的黏附性能、产酶性能、抑菌功效和抗氧化活性。利用 PacBio Sequel II 和 Illumina NovaSeq 6000 平台对菌株 CHF7-2 进行全基因组测序, 并采用多种生物信息学工具和数据库对其基因组进行注释, 从分子层面探究其益生机制和安全性。【结果】体外试验研究表明, 菌株 CHF7-2 展现出良好的益生特性和安全性: 具有较强的表面疏水性、自凝聚性和一定的抗氧化能力; 能有效抑制大肠杆菌 K88、金黄色葡萄球菌 ATCC 49521、鸡伤寒沙门氏菌 CICC 21510 和猪霍乱沙门氏菌 CVCC 3383 的生长; 能够产生蛋白酶和脂肪酶; 不产生溶血环, 表明其饲用安全性。全基因组测序分析结果显示, 菌株 CHF7-2 的基因组大小为 2 116 761 bp, 平均 G+C 含量为 38.8%, 编码基因数量为 2 067 个。同时, 在 CHF7-2 基因组中发现了 III 类细菌素 EnlA 合成基因簇, 以及多个与耐酸、耐胆盐、耐热胁迫、耐冷胁迫、黏附、抗氧化和有机酸合成相关的抗应激和益生基因, 且基因组中未发现毒力和耐药基因。【结论】罗伊特氏黏液乳杆菌 CHF7-2 是一株具有潜力的益生菌, 有望成为饲用微生态制剂的重要候选菌株。

关键词: 罗伊特氏黏液乳杆菌; 全基因组测序; 益生特性; 微生态制剂

资助项目: 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202305AC160040); “兴滇英才支持计划”青年人才项目(YNWR-QNBJ-2018-137)

This work was supported by the Yunnan Provincial Middle-young Academic and Technical Leader Candidate (202305AC160040) and the Young Top-notch Talent of Yunnan Xingdian Support Project for High Level Talents (YNWR-QNBJ-2018-137).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LIN Qiuye, linqiuye@126.com; CAO Zhenhui, caozhenhui@ynau.edu.cn

Received: 2024-10-16; Accepted: 2024-11-25; Published online: 2025-01-21

Probiotic characterization and whole genome sequencing of *Limosilactobacillus reuteri* CHF7-2 from Chahua chicken

XU Le^{1,2#}, CHEN Shiyu^{1#}, WANG Shang¹, ZHANG Zhixiang¹, DONG Bin¹, LIN Qiuye^{3*}, CAO Zhenhui^{1,2*}

1 Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan, China

2 Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, China

3 College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan, China

Abstract: [Objective] To study the probiotic properties and safety of *Limosilactobacillus reuteri* CHF7-2 isolated from Chahua chicken, providing a theoretical basis for the development of this strain as a microecological feed additive. **[Methods]** *In vitro* assays were conducted to evaluate the adhesion, enzyme production, antibacterial activity, and antioxidant activity of strain CHF7-2. PacBio Sequel II and Illumina NovaSeq 6000 were used for whole genome sequencing of strain CHF7-2. Bioinformatics tools and databases were then used for genome annotation to explore the probiotic mechanisms and safety of this strain at the molecular level. **[Results]** Strain CHF7-2 possessed significant probiotic properties and safety. It exhibited high surface hydrophobicity, self-coagulation, and antioxidant activity. The strain inhibited the growth of *Escherichia coli* K88, *Staphylococcus aureus* ATCC 49521, *Salmonella gallinarum* CICC 21510, and *Salmonella choleraesuis* CVCC 3383. Strain CHF7-2 produced protease and lipase, and it was safe for use in feed since it did not exhibit hemolytic activity. Whole genome sequencing revealed that the genome size of CHF7-2 was 2 116 761 bp, with the G+C content of 38.8%, encoding 2 067 genes. Additionally, the genome carried the biosynthetic gene cluster of the class III bacteriocin EnlA and multiple genes involved in the acid tolerance, bile salt tolerance, heat stress tolerance, cold stress tolerance, adhesion, antioxidation, and organic acid synthesis, with no virulence or antibiotic resistance genes detected. **[Conclusion]** *L. reuteri* CHF7-2 is a potential probiotic strain and a promising candidate for use as a microecological feed additive.

Keywords: *Limosilactobacillus reuteri*; whole genome sequencing; probiotic properties; microecological feed additive

茶花鸡，又名傣族鸡，主要分布于云南省西双版纳州的景洪市、勐海县和勐腊县境内，是一种由红原鸡(*Gallus gallus*)经过长期驯化和选育而成的珍稀热带原始鸡种，具有性早熟、耐粗饲、抗病力强和肉质鲜美等特点，已被列入《国家畜禽遗传资源品种名录》(2021年版)^[1-2]。其生长环境高温高湿，且遗传背景独特，使得其肠道内蕴含着丰富且独特的微生物资源^[3]，这

些微生物在宿主的营养代谢、生理反应和免疫调控过程中发挥着重要作用^[4-5]。然而，关于茶花鸡肠道益生菌资源的挖掘，尤其是菌种全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)分析鲜见相关报道。

本研究所用的菌株 CHF7-2，是从西双版纳勐海县曼贺纳村散养的茶花鸡粪便中分离得到的，通过 16S rRNA 基因序列分析将其鉴定为罗

伊特氏黏液乳杆菌 (*Limosilactobacillus reuteri*), 在 pH 2.0 的 MRS 肉汤培养基和含有 0.3% 胆盐的 MRS 肉汤培养基中分别孵育 2 h 后, 其存活率均超过 60%, 并且对多种 β -内酰胺类和氨基糖苷类抗生素敏感, 因此被认为是一株具有潜力的益生菌株^[6]。罗伊特氏黏液乳杆菌属于芽孢杆菌门 (*Bacillota*) 乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 粘液乳杆菌属 (*Limosilactobacillus*), 是几乎所有脊椎动物肠道内的天然优势乳酸菌^[7]。研究表明, 罗伊特氏黏液乳杆菌在宿主体内可通过增强肠道物理屏障、分泌细菌素抑制病原菌定殖、重塑宿主肠道微生物群落来降低炎症因子产生, 进而维护宿主肠道稳态和机体健康^[7-9]。自 2013 年起, 罗伊特氏黏液乳杆菌已被列入我国《饲料添加剂品种目录》^[10], 并在 2022 年国家卫生健康委员会更新的《可用于食品的菌种名单》^[11] 中同样被包含。目前, 它已被广泛应用于医药、食品和饲料行业。

然而, 随着罗伊特氏黏液乳杆菌在不同物种中被不断鉴定, 通过传统方式全面分析其益生、安全等生物学特性变得愈发困难。当前, 高通量测序技术的快速发展已成为解决这一问题的关键手段。对益生菌的研究也已深入到基因组学层面, 能够检测菌株的耐药和毒力基因, 对其安全性进行全面评估, 同时快速挖掘益生菌基因, 从而筛选出潜在的益生菌株^[12]。基于此, 本研究结合传统试验手段和细菌全基因组测序技术, 探究菌株 CHF7-2 的黏附性能、抗菌作用、抗氧化活性、产酶性能、溶血活性, 并挖掘其潜在的益生功能基因。同时, 通过比较基因组学分析, 比较 CHF7-2 与 NCBI GenBank 数据库下载的 27 株罗伊特氏黏液乳杆菌的遗传进化关系, 以及不同鸡源罗伊特氏黏液乳杆菌对碳水化合物的利用情况, 旨在为开发利用菌株 CHF7-2 作为畜禽养殖微生态制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

罗伊特氏黏液乳杆菌 (*Limosilactobacillus reuteri*) CHF7-2 为本课题组邹建华等^[6]采用 1% 碳酸钙-MRS 琼脂培养基, 从散养茶花鸡粪便中自主分离获得。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K88、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 49521、鸡伤寒沙门氏菌 (*Salmonella gallinarum*) CICC 21510、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*) CVCC 3383 和鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) GG (LGG) 为云南农业大学益生菌课题组保藏。其中, 鼠李糖乳杆菌为《GB 4789.35—2023 食品微生物学检测 乳酸菌检测》^[13]指定的参照菌株, 据此本研究利用 LGG 作为测定 CHF7-2 产酶特性和抑菌能力的对照菌株。

1.2 主要试剂和仪器

MRS 培养基、LB 培养基、哥伦比亚血平板, 广东环凯微生物科技有限公司; 总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 检测试剂盒、羟自由基清除能力检测试剂盒、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力检测试剂盒、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (磁珠法), 天根生化科技 (北京) 有限公司。

产蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶发酵培养基参照 Fitri 等^[14]的方法配制; 产淀粉酶培养基参照 Kanpiengjai 等^[15]的方法配制。

离心机、NanoDrop, ThermoFisher Scientific 公司; Qubit 荧光计, Invitrogen 公司; PacBio Sequel II 测序平台, PacBio 公司; Illumina

NovaSeq6000 测序平台, Illumina 公司。

1.3 菌株 CHF7-2 的黏附性能检测

采用微生物黏附碳氢化合物法^[16] (microbial adhesion to hydrocarbons, MATH) 测定菌株 CHF7-2 的表面疏水性。参考文献 [17] 测定 CHF7-2 的自聚集性, 以及与病原菌 *E. coli* K88、*S. aureus* ATCC 49521、*S. gallinarum* CICC 21510 和 *S. choleraesuis* CVCC 3383 的共聚集性。3 项指标的计算如公式(1)-(3)所示。

$$\text{疏水性}=(1-A_1/A_0)\times 100\% \quad (1)$$

$$\text{自聚集性}=(1-A_2/A_0)\times 100\% \quad (2)$$

$$\text{共聚集性}=\{[(A_2+A_3)/2-A_4]/(A_2+A_3)/2\}\times 100\% \quad (3)$$

式中: A_0 为初始菌液的 OD_{600} 值, A_1 为与二甲苯混匀后菌液的 OD_{600} 值, A_2 为初始菌液静置 3 h 后上清液的 OD_{600} 值, A_3 为病原菌液静置 3 h 后上清液的 OD_{600} 值, A_4 为混合静置 5 h 后上清液的 OD_{600} 值。

1.4 菌株 CHF7-2 的产酶性能检测

将活化后的 CHF7-2 和 *L. rhamnosus* GG 菌液分别按 1% 的体积分数接种于蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶发酵培养基中, 培养 48 h 后检测胞外酶活性, 具体方法参照《饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法》(GB/T 28715—2012)^[18]、对硝基苯酚法^[19]、3,5-二硝基水杨酸法^[20]和《饲用纤维素酶活性的测定 滤纸法》(GB/T 23881—2009)^[21]。

1.5 菌株 CHF7-2 的抑菌作用检测

将活化后的 CHF7-2 和 *L. rhamnosus* GG 菌液分别按 1% 的体积分数接种于 MRS 肉汤中, 37 °C 静置培养 16 h 后调整 OD_{600} 为 0.8, 2 800×g 离心 10 min 收集上清。分别吸取 37 °C 过夜培养的 *E. coli* K88、*S. aureus* ATCC 49521、*S. gallinarum* CICC 21510、*S. choleraesuis* CVCC 3383 菌液 20 μL, 与 LB 固体培养基(20 mL、50 °C)剧烈混合后倾注入培养皿中。使用直径为 8 mm 牛津杯

打孔, 将 CHF7-2 与 LGG 上清液注入琼脂孔中(100 μL/孔), 37 °C 培养 24 h, 使用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.6 菌株 CHF7-2 的抗氧化活性检测

按照试剂盒说明书的方法, 检测菌株 CHF7-2 的胞外产物、胞内产物的总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、羟自由基清除能力、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除能力、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH) 含量以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活性。

1.7 菌株 CHF7-2 的溶血试验

采用滤纸片扩散法测定 CHF7-2 的溶血能力, 将无菌滤纸片紧贴于哥伦比亚血琼脂平板, 分别吸取 20 μL 活化后的 CHF7-2 菌液和强溶血性的金黄色葡萄球菌液(阳性对照)滴于滤纸片上, 37 °C 培养 24 h, 根据菌落周围是否产生溶血圈判断 CHF7-2 的溶血能力。

1.8 菌株 CHF7-2 的全基因组测序分析

1.8.1 菌株 CHF7-2 基因组提取与测序

将活化后的 CHF7-2 菌液按 1% 的体积分数接种于 MRS 肉汤中进行扩大培养(37 °C、16 h), 2 800×g 离心 10 min 收集菌体, 并用无菌 PBS 缓冲液洗涤菌体 3 次。使用土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒(磁珠法)提取菌株 CHF7-2 的高质量基因组 DNA。对提取后的核酸采用 NanoDrop、Qubit 及琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和完整性。DNA 浓度和完整性达标后, 使用 BluePippin 全自动核酸片段回收系统回收大片段 DNA, 构建测序文库。完成 DNA 文库制备后, 使用 Qubit 及 Agilent 2100 检测文库浓度和大小以确保质量合格, 随后采用 PacBio Sequel II 和 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序。

1.8.2 CHF7-2 基因组序列分析

使用 Hifiasm v0.12 软件对 PacBio Sequel II 三代平台数据(长度 $\geq 2\ 000$ bp)进行组装(k-mer 值设置为 51, 其他参数均为默认值), 并采用 Circlator v1.5.5 软件进行环化和调整起始位点。此外, 通过 Pilon v1.22 软件利用 Illumina NovaSeq 6000 二代测序平台数据进一步纠错, 以获得更高准确度的基因组信息。分别利用 Rfam v14.1 数据库和软件 Prodigal v2.6.3、Infernal v1.1.3、tRNAscan-SE v2.0 进行编码基因和非编码 RNA 的预测, 并使用 Circos v0.66 软件绘制 CHF7-2 的基因组圈图。随后, 基于基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库, 对预测基因进行功能注释。

1.8.3 CHF7-2 毒力和抗生素耐药基因检索分析

基于毒力因子数据库 (virulence factor database, VFDB) 2022^[22] 和抗生素耐药性综合数据库 (the comprehensive antibiotic resistance database, CARD) v3.2.2^[23] 对 CHF7-2 基因组中可能携带的毒力和抗生素耐药基因进行注释。参照我国农业农村部发布的《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》^[24] 的要求, 在序列比对时, 设置序列相似性 $\geq 80\%$, 序列覆盖度 $\geq 70\%$, E -value 值 $< 10^{-5}$ 。

1.9 比较基因组分析

1.9.1 平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 计算

为进一步分析菌株 CHF7-2 的遗传进化关系, 选取 27 株不同来源且已完成全基因组测序的 *L. reuteri* (表 1), 菌株的全基因组数据均来自于 NCBI 的 GenBank 数据库。随后, 使用 FastANI v1.33 软件计算菌株 CHF7-2 与其他 *L. reuteri* 菌株间的 ANI 值, 并利用 TBtools v2 绘

制热图。

1.9.2 泛-核心基因集构建

通过 Prokka v1.14.6^[25] 和 Roary v3.13.0^[26] 软件分析 CHF7-2 与表 1 中的 27 株 *L. reuteri* 的基因差异, 以大于 95% 的氨基酸一致性为标准统计核心基因数目, 泛-核心基因趋势图使用 R v4.3.0 软件绘制。

1.9.3 系统发育树构建

通过 Roary v3.13.0^[26] 软件获得 CHF7-2 与表 1 中的 27 株 *L. reuteri* 的核心基因序列, 随后使用 MEGA 11 软件中的邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统发育树 (bootstrap 值设置为 1 000)^[27], 系统发育树的可视化使用 iTol v5 (<https://itol.embl.de/>)^[28] 完成。

1.9.4 碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enzymes, CAZy) 注释

将 CHF7-2 与表 1 中的 5 株鸡源 *L. reuteri* 基因组序列上传至 dbCAN (<http://bcb.unl.edu/dbCAN/>) 进行注释, 统计注释信息并利用 TBtools v2 绘制热图, 以比较不同菌株对碳水化合物的利用差异。

1.10 数据统计及分析

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计学分析, 两组之间的显著性通过 t 检验进行评估, 多组之间使用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并依据 Duncan 氏法进行多重比较检验以确定组间差异性。试验数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株 CHF7-2 的黏附性能

由表 2 可知, 菌株 CHF7-2 的表面疏水性和自聚集性分别达到了 (72.46 \pm 0.68)% 和 (85.61 \pm 0.46)%。此外, CHF7-2 与 4 株肠道病原菌 (*E. coli* K88、*S. aureus* ATCC 49521、*S. Gallinarum*

表1 27株罗伊特氏黏液乳杆菌基因组信息

Table 1 Genomic information of 27 strains of *Limosilactobacillus reuteri*

Strains	Genome size (Mb)	G+C content (%)	Origin	GenBank ID
<i>L. reuteri</i> FN041	2.4	38.5	<i>Homo sapiens</i>	GCA_024652885.1
<i>L. reuteri</i> M2021619	2.2	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_021459965.1
<i>L. reuteri</i> 03	2.3	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_030517815.1
<i>L. reuteri</i> MD IIE-43	2.2	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_002007085.2
<i>L. reuteri</i> subsp. <i>reuteri</i> DSM 20016	2.0	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_000016825.1
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 4659	2.1	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_030418275.1
<i>L. reuteri</i> strain <i>reuteri</i>	2.0	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_009184725.1
<i>L. reuteri</i> SD-LRE2-IT	2.3	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_020023775.1
<i>L. reuteri</i> DS0384	2.2	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_021398615.1
<i>L. reuteri</i> VHProbi M07	2.0	39.0	<i>Homo sapiens</i>	GCA_021228055.1
<i>L. reuteri</i> CNEI-KCA3	2.1	39.5	<i>Gallus gallus</i>	GCA_013694365.1
<i>L. reuteri</i> AM_LB1	2.3	39.0	<i>Gallus gallus</i>	GCA_025369755.1
<i>L. reuteri</i> 3632	2.5	38.5	<i>Gallus gallus</i>	GCA_020978285.1
<i>L. reuteri</i> P43	2.1	39.0	<i>Gallus gallus</i>	GCA_033570435.1
<i>L. reuteri</i> SKKU-OGDONS-01	2.3	39.0	<i>Gallus gallus</i>	GCA_003316935.1
<i>L. reuteri</i> 19-E-6	1.9	39.0	<i>Sus scrofa</i>	GCA_020412465.1
<i>L. reuteri</i> ZLR003	2.2	38.5	<i>Sus scrofa</i>	GCA_001618905.1
<i>L. reuteri</i> AN417	2.2	39.0	<i>Sus scrofa</i>	GCA_013348825.1
<i>L. reuteri</i> 121	2.3	39.0	<i>Sus scrofa</i>	GCA_001889975.1
<i>L. reuteri</i> YSJL-12	2.2	39.0	<i>Sus scrofa</i>	GCA_006874665.1
<i>L. reuteri</i> RE225	2.3	38.5	<i>Mus</i>	GCA_030721705.1
<i>L. reuteri</i> M1	2.3	39.0	<i>Mus</i>	GCA_030345055.1
<i>L. reuteri</i> Byun-re-01	2.2	39.0	<i>Mus</i>	GCA_003316895.1
<i>L. reuteri</i> LL7	2.4	39.0	<i>Peromyscus leucopus</i>	GCA_007633215.1
<i>L. reuteri</i> YLR001	2.4	38.5	<i>Bos mutus</i>	GCA_018884225.1
<i>L. reuteri</i> 1B	2.3	39.0	<i>Equus caballus</i>	GCA_013487925.1
<i>L. reuteri</i> BRD_L17	2.0	39.0	<i>Canis lupus familiaris</i>	GCA_026183435.1

CICC 21510、*S. choleraesuis* CVCC 3383)的共聚性分别达到了(18.95±0.15)%、(52.84±0.16)%、(15.65±0.16)%和(13.22±0.10)%。

2.2 菌株 CHF7-2 的产酶性能

如图 1 所示, 菌株 CHF7-2 具有分泌酸性蛋白酶和脂肪酶的能力, 但无淀粉酶和纤维素酶活性。相比之下, 菌株 LGG 仅能合成酸性蛋白酶, 且其活性显著低于 CHF7-2 ($P<0.05$)。在发酵培养 48 h 后, 菌株 CHF7-2 分泌的酸性蛋白

酶活性为(18.25±2.11) U/mL, 脂肪酶活性为(2.42±0.13) U/mL。

2.3 菌株 CHF7-2 的抑菌性能

如图 2 所示, 菌株 CHF7-2 对 *E. coli* K88、*S. aureus* ATCC 49521、*S. gallinarum* CICC 21510 和 *S. choleraesuis* CVCC 3383 均具有抑菌能力, 抑菌圈直径分别为(17.33±0.22) mm、(18.69±0.22) mm、(19.11±0.44) mm 和(20.69±0.50) mm, 均超过了参考菌株鼠李糖乳杆菌 GG (LGG)对

表2 菌株CHF7-2的表面疏水性、自聚集性以及
与病原菌的共聚集性

Table 2 Surface hydrophobicity, self-coagulation
and copolymerization with pathogenic bacteria of
strain CHF7-2

Item	Result (%)
Hydrophobicity	72.46±0.68
Self-coagulation	85.61±0.46
Copolymerization with <i>E. coli</i> K88	18.95±0.15b
Copolymerization with <i>S. aureus</i> ATCC 49521	52.84±0.16a
Copolymerization with <i>S. gallinarum</i> CICC 21510	15.65±0.16c
Copolymerization with <i>S. choleraesuis</i> CVCC 3383	13.22±0.10d

Data is presented as mean±SD ($n=3$) and values with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

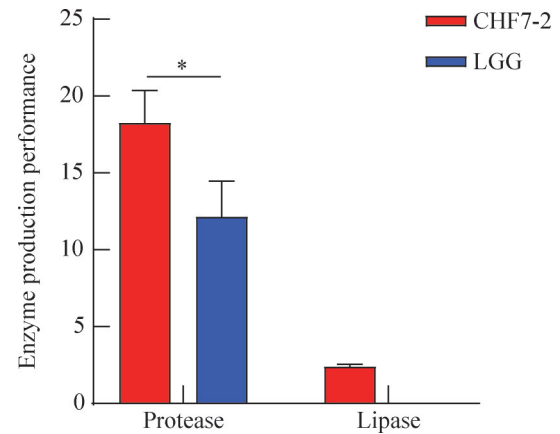
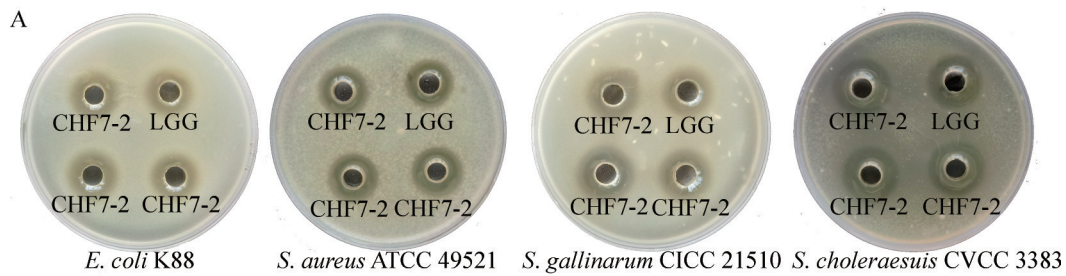


图1 菌株CHF7-2的产酶性能

Figure 1 Enzyme production performance of strain CHF7-2. Data is presented as mean±SD ($n=3$); * indicates $P<0.05$.



B

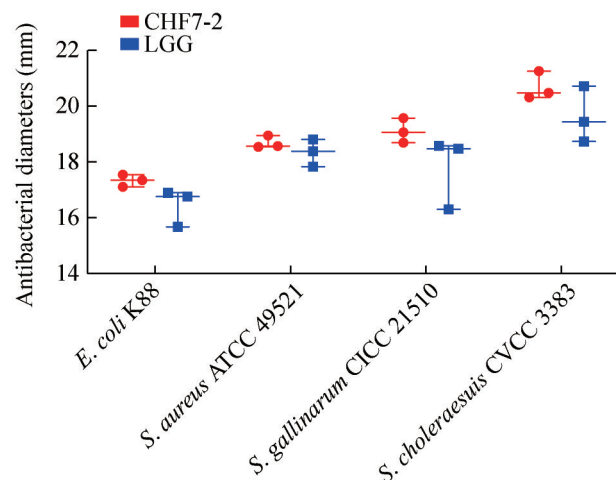


图2 菌株CHF7-2的抑菌效果。A: 菌株CHF7-2的抑菌效果观察; B: 测定菌株CHF7-2抑菌效果时获得的抑菌圈直径($n=3$)。

Figure 2 The antibacterial effect of strain CHF7-2. A: Observation of antibacterial effect of strain CHF7-2; B: The diameters of the antibacterial zones obtained when measuring the antibacterial effect of strain CHF7-2 ($n=3$).

4种致病菌的抑菌效果。

2.4 菌株 CHF7-2 的抗氧化活性

由图 3 可知, 菌株 CHF7-2 的胞外产物与胞内产物均具有不同程度的抗氧化能力。其中, 胞外产物的总抗氧化能力、SOD 活性、GSH 含量、DPPH 自由基清除率以及羟自由基清除率分别为 16.38 $\mu\text{mol/mL}$ 、11.33 U/mL、104.91 $\mu\text{g/mL}$ 、68.67% 和 18.48%, 均显著高于胞内产物的相应值 0.85 $\mu\text{mol/mL}$ ($P<0.01$)、2.21 U/mL ($P<0.01$)、20.86 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.01$)、12.75% ($P<0.01$) 和 6.17%

($P<0.05$)。

2.5 菌株 CHF7-2 的溶血活性

通过以下标准判断菌株的溶血活性: 菌落周边出现草绿色溶血环为 α -溶血; 菌落周边出现较宽的透明圈为 β -溶血; 菌落周边不出现溶血环为 γ -溶血。如图 4 所示, 菌株 CHF7-2 表现为 γ -溶血, 阳性对照金黄色葡萄球菌则呈现出 β -溶血活性。

2.6 菌株 CHF7-2 的全基因组基本特征

利用三代 PacBio Sequel II 和二代 Illumina

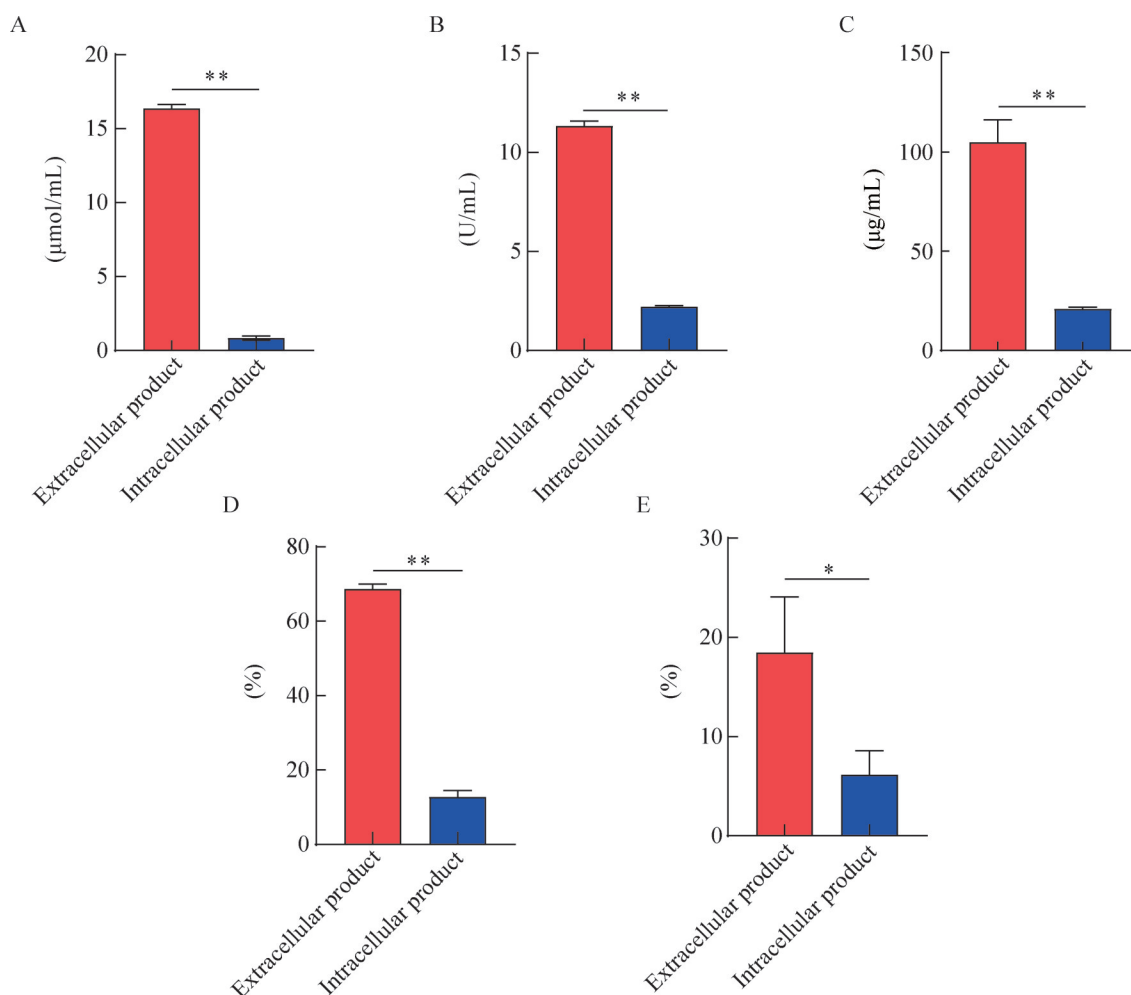


图3 菌株CHF7-2胞外产物及胞内产物的抗氧化活性

Figure 3 Antioxidant activity of extracellular and intracellular products of strain CHF7-2. Data is presented as mean \pm SD ($n=3$). A: Total antioxidant activity; B: Superoxide dismutase activity; C: Glutathione content; D: DPPH free-radical scavenging rate; E: Hydroxyl radical scavenging rate. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.



图4 菌株CHF7-2的溶血活性

Figure 4 Hemolytic property of strain CHF7-2. *S. aureus* ATCC 49521 was used as a positive control.

NovaSeq 6000 测序平台对菌株 CHF7-2 进行全基因组测序, 结果显示菌株 CHF7-2 的基因组序列全长为 2 116 761 bp, 平均 G+C 含量为 38.8%, 由 1 个染色体和 2 个质粒构成。编码基因数量为 2 067 个, 其中 2 045 个位于染色体上, 12 个和 10 个分别位于质粒 1 和质粒 2 上。所有编码基因的总长度为 1 840 680 bp, 平均长度为 890 bp, 编码区占据了基因组总长度的 86.96%。此外, 非编码 RNA 含有 18 个 rRNA、70 个 tRNA 以及 54 个其他类型的非编码 RNA (other ncRNA)。菌株 CHF7-2 的基因组圈图如图 5 所示, 其基因组序列已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 PRJNA1067331。

2.7 基因组功能注释

2.7.1 GO 数据库注释结果

基于 GO 数据库, 获得了菌株 CHF7-2 基因组中编码基因的标准化功能描述信息。注释结果如图 6 所示, 共计 1 656 个基因得到注释, 占全部编码基因的 80.12%, 与生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 相关的基因数分别为 1 210、810 和 1 365 个。

其中, 在生物学过程中, 主要涉及的功能包括代谢过程 (metabolic process, 917 个基因)、细胞过程 (cellular process, 792 个基因)、单有机体过程 (single-organism process, 562 个基因)。在细胞组分方面, 主要涉及的功能有膜 (membrane, 475 个基因)、膜组成 (membrane part, 456 个基因)、细胞 (cell, 437 个基因)。在分子功能中, 主要的功能单位包括催化活性 (catalytic activity, 983 个基因)、结合活性 (binding activity, 771 个基因) 和转运活性 (transporter activity, 130 个基因)。

2.7.2 KEGG 数据库注释结果

KEGG 数据库可用于分析物种基因组中各基因表达产物的功能及代谢途径。菌株 CHF7-2 的 KEGG 注释结果如图 7 所示, 共计 1 084 个基因被注释到新陈代谢、遗传信息处理和环境信息处理这 3 大类 KEGG 一级功能类别中, 占全部编码基因的 52.44%。其中, 参与新陈代谢 (metabolism) 的基因所占比例最高, 其次是遗传信息处理 (genetic information processing), 而参与环境信息处理 (environmental information processing) 的基因数量最少。在参与新陈代谢的基因中, 注释到氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acids) 的基因数最多 (62 个基因), 其次是嘌呤代谢 (purine metabolism, 60 个基因)、碳代谢 (carbon metabolism, 51 个基因) 和嘧啶代谢 (pyrimidine metabolism, 47 个基因)。在参与遗传信息处理的基因中, 注释到核糖体的基因数目最多 (55 个基因)。在参与环境信息处理的基因中, 与 ABC 转运蛋白相关的基因数量最多 (43 个基因)。

2.8 细菌素合成基因簇分析

利用在线软件 BAGEL4 对菌株 CHF7-2 的抑菌物质信息进行挖掘, 其基因组中共鉴定出 2 个可能与 III 类细菌素 Enterolysin A (EnIA) 生物

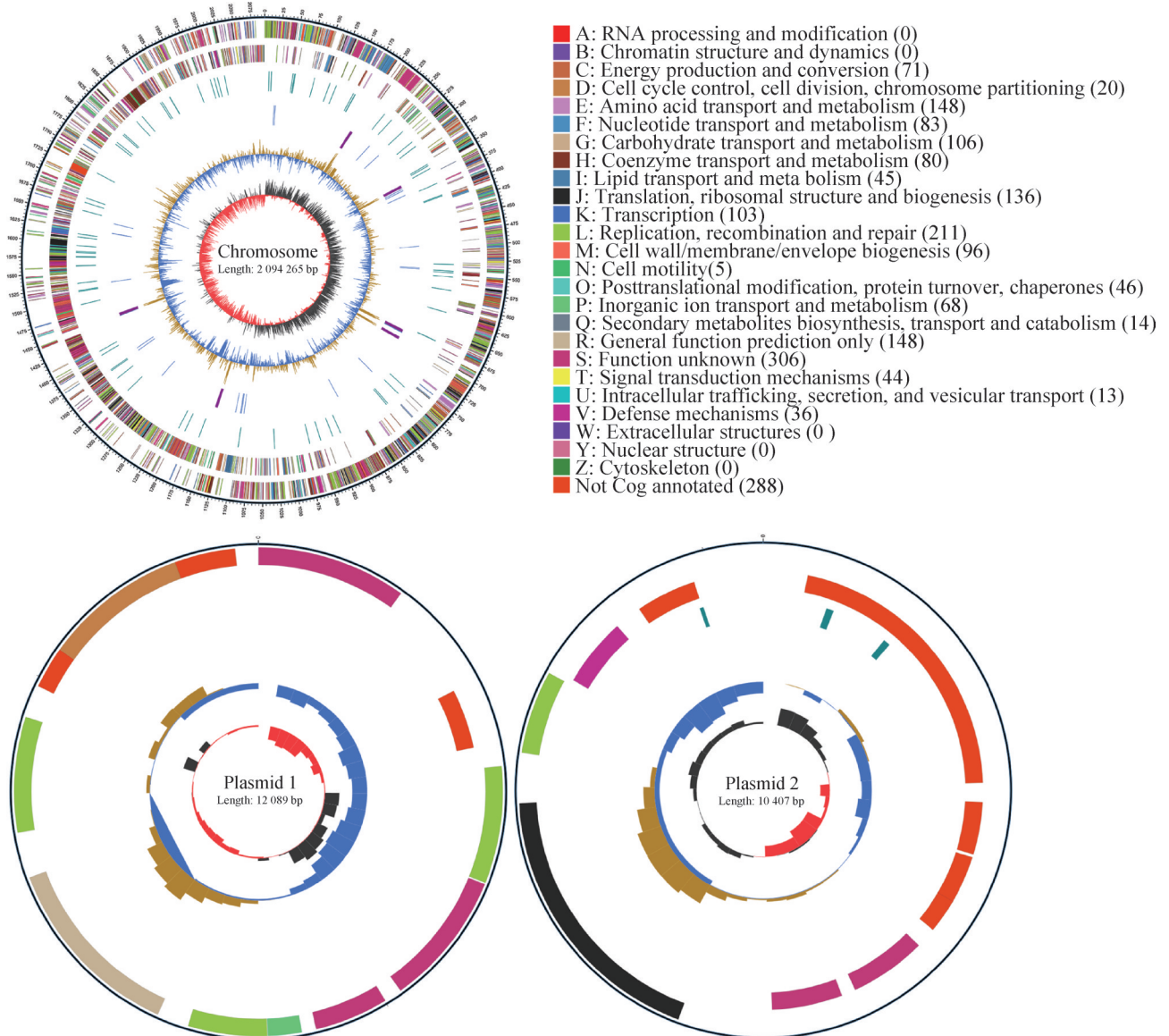


图5 菌株CHF7-2的基因组圈图。第1圈：基因组大小；第2圈：基因组正链基因；第3圈：基因组负链基因；第4圈：重复序列；第5圈：tRNA和rRNA (蓝色为tRNA，紫色为rRNA)；第6圈：G+C含量(浅黄色部分表示该区域G+C含量高于基因组的平均G+C含量，蓝色部分则表示该区域G+C含量低于基因组的平均G+C含量)；第7圈：GC-skew (深灰色代表G含量大于C的区域，红色代表C含量大于G的区域)。

Figure 5 Loop diagram of strain CHF7-2 genome. Round 1: Genome size; Round 2: Positive-strand genes in the genome; Round 3: Negative-strand genes in the genome; Round 4: Repeat sequence; Round 5: tRNA and rRNA (Blue represents tRNA, purple represents rRNA); Round 6: G+C content (The light yellow part indicates that the G+C content in this region is higher than the average G+C content of the genome, while the blue part indicates that the G+C content in this region is lower than the average G+C content of the genome); Round 7: GC-skew (Dark gray represents areas with G content greater than C, while red represents areas with C content greater than G).

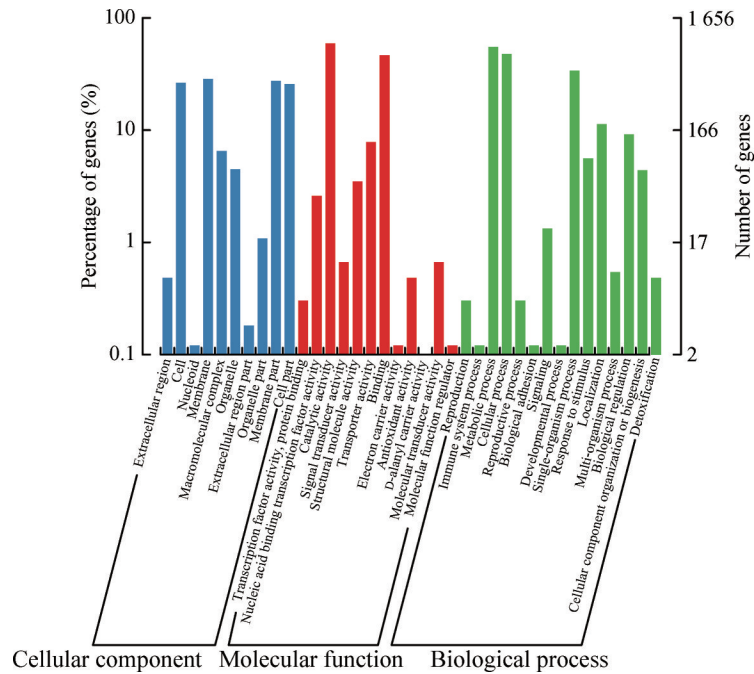


图6 菌株CHF7-2基因组的GO功能分类

Figure 6 GO functional classification of strain CHF7-2 genome.

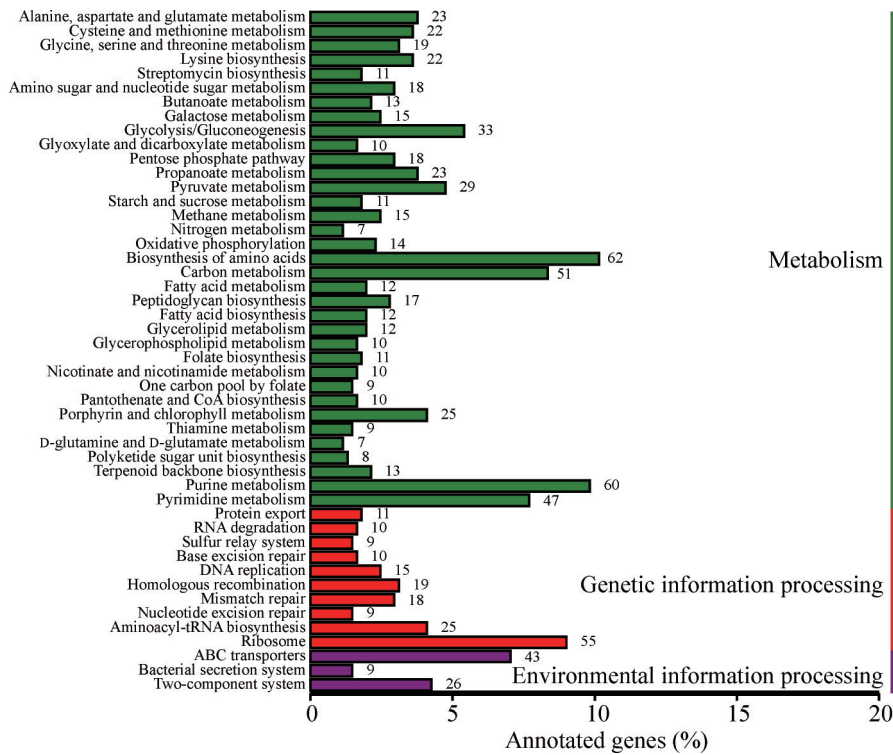


图7 菌株CHF7-2基因组的KEGG代谢通路分类

Figure 7 KEGG metabolic pathway classification of strain CHF7-2 genome.

合成相关的基因簇(EnlA-1 和 EnlA-2), 核心肽相似率分别为 31.58% 和 39.04%。对相似度较高的 EnlA-2 基因簇进行注释(图 8), 该基因簇位于菌株 CHF7-2 基因组的 1 497 513–1 517 945 bp, 核心肽 Enterolysin A 位于 1 505 219–1 507 960 bp。orf00001 编码聚(核糖醇磷酸酯) β -N-乙酰葡萄糖基转移酶 [poly(ribitol-phosphate)beta-N-acetylglucosaminyltransferase]; orf00002 编码糖基转移酶 GlyA (glycosyltransferase GlyA); orf00003 编码 dTDP-鼠李糖基转移酶 RfbG (dTDP-rhamnosyl transferase RfbG); orf00004 编码假定 O-抗原转运蛋白(putative O-antigen transporter); orf00005 编码 UDP-吡喃半乳糖变位酶(UDP-galactopyranose mutase); orf00010 编码十一异戊烯磷酸半乳糖磷酸转移酶 (undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase); orf00011 编码假定糖基转移酶(putative glycosyltransferase) CsbB; orf00013 编码调节蛋白 (regulatory protein) RecX; orf00018 编码假定核糖核酸酶样蛋白 (putative ribonuclease-like protein) YfkH; orf00020 编码内膜转运蛋白(inner membrane transporter) YjeM, 可能与细菌素分泌有关。

2.9 益生特性相关基因分析

对菌株 CHF7-2 的益生特性相关基因进行挖掘, 结果显示, 其基因组中包含 16 个耐酸基

因、1 个耐胆盐基因、3 个黏附相关基因、7 个抗氧化相关基因、6 个核黄素生物合成相关基因、1 个乙酸生物合成相关基因、6 个耐热胁迫基因和 1 个耐冷胁迫基因(表 3)。

2.10 毒力和耐药基因检索分析

随着益生菌资源的不断发掘, 其安全性问题日益受到关注。本研究将菌株 CHF7-2 的基因组通过 VFDB 和 CARD 数据库对基因组进行了毒力和抗生素耐药基因的检索分析。结果显示, 菌株 CHF7-2 的基因组中不存在毒力因子和耐药基因, 因此可以认为菌株 CHF7-2 是安全的, 适用于畜禽养殖等行业的微生物制剂开发。

2.11 平均核苷酸一致性(ANI)分析

ANI 分析是通过比较两两基因组之间的同源序列, 在全基因组水平上评估不同物种的亲缘关系, 通常认为 ANI 值大于 95% 为同种^[29]。本研究选取了表 1 中的 27 株不同来源的 *L. reuteri* 与菌株 CHF7-2 进行比较。如图 9 所示, 菌株 CHF7-2 除与 4 株猪源 *L. reuteri*、1 株人源 *L. reuteri* 和 1 株鼠源 *L. reuteri* 的 ANI 值小于 95.00%, 与其余菌株的 ANI 值均大于 95.00%, 与模式菌株 DSM 20016^T 的 ANI 值达到 95.38%。值得注意的是, 菌株 CHF7-2 与分离自人源的 MD IIE-43 菌株具有最高的同源性, 其 ANI 值达到 98.01%。因此, 上述结果表明菌株 CHF7-2



图8 菌株CHF7-2细菌素的编码基因簇

Figure 8 Coding gene cluster of strain CHF7-2 bacteriocin.

属于 *L. reuteri*。

2.12 泛-核心基因集构建

菌株 CHF7-2 与表 1 中 27 株 *L. reuteri* 的泛基因集包含 10 069 个基因，其中核心基因有 1 023 个，特有基因高达 7 373 个。由图 10 可知，随着 *L. reuteri* 基因组数量的增加，泛基因数量呈现增加趋势，而核心基因数量趋于稳定，该现象证实 *L. reuteri* 的基因组呈现开放式基因组特征。

2.13 核心基因构建系统发育树

本研究基于菌株 CHF7-2 与表 1 中的 27 株 *L. reuteri* 的 1 129 个核心基因构建系统发育树。如图 11 所示，28 株 *L. reuteri* 共分为 3 大分支，分别命名为分支 I、II 和 III。其中，分支 I 由 3 株鼠源 *L. reuteri* (M1、RE225、Byun-re-01) 和 1 株鸡源 *L. reuteri* (SKKU-OGDONS-01) 组成，而 *L. reuteri* 标准株 DSM 20016^T (人源) 位于分支 III，且与另外 4 株人源 *L. reuteri* (VHProbi M07、

表3 菌株CHF7-2具有的益生特性相关基因

Table 3 Genes related to probiotic characteristics of strain CHF7-2

Gene ID	Gene name	Gene product
Acid resistance		
GE000509	<i>arcA</i>	Arginine deiminase
GE000477	<i>arcC</i>	Carbamate kinase
GE000510	<i>argR</i>	Transcriptional regulator of arginine metabolism
GE000785	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase
GE000786	<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase
GE000561	<i>gadA/B</i>	Glutamate decarboxylase
GE000562	<i>gadC</i>	Glutamate: GABA antiporter
GE000525	<i>atpB</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit a
GE000526	<i>atpE</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit c
GE000527	<i>atpF</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit b
GE000528	<i>atpH</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit delta
GE000529	<i>atpA</i>	F-type H ⁺ /Na ⁺ -transporting ATPase subunit alpha
GE000530	<i>atpG</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit gamma
GE000531	<i>atpD</i>	F-type H ⁺ /Na ⁺ -transporting ATPase subunit beta
GE000532	<i>atpC</i>	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit epsilon
GE000191	<i>nhaC</i>	Na ⁺ :H ⁺ antiporter, NhaC family
Bile salt resistance		
GE000784	<i>cbh</i>	Choloylglycine hydrolase
Production of adhesion molecules		
GE001572	<i>efg</i>	Elongation factor G
GE001943	<i>ltaS</i>	Lipoteichoic acid synthase
GE001415	<i>mgs</i>	1,2-diacylglycerol 3-alpha-glucosyltransferase
Oxidative resistance		
GE000418	<i>trxR</i>	Thioredoxin reductase (NADPH)
GE000602	<i>trxA</i>	Thioredoxin 1

(待续)

(续表3)

Gene ID	Gene name	Gene product
GE000073	<i>gshA</i>	Glutamate-cysteine ligase
GE001494	<i>gsr</i>	Glutathione reductase (NADPH)
GE001865	<i>g6pd</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
GE001866	<i>pgd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase
GE001991	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N
Riboflavin biosynthesis		
GE000144	<i>ribBA</i>	3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II
GE000759	<i>ribF</i>	Riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase
GE000869	<i>ribT</i>	Riboflavin biosynthesis RibT protein
GE000931	<i>ribD</i>	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine Deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase
GE000932	<i>ribE</i>	Riboflavin synthase
GE000934	<i>ribH</i>	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
Organic acid biosynthesis		
GE000624	<i>ackA</i>	Acetate kinase
Heat resistance		
GE000763	<i>dnaK</i>	Molecular chaperone DnaK
GE000764	<i>dnaJ</i>	Molecular chaperone DnaJ
GE000762	<i>grpE</i>	Molecular chaperone GrpE
GE000761	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcriptional repressor
GE000388	<i>groES</i>	Chaperonin GroES
GE000389	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL
Cold resistance		
GE000670	<i>cspA</i>	Cold shock protein

ATCC PTA 4659、*reuteri*、SD-LRE2-IT)的遗传进化距离较近。值得注意的是,菌株 CHF7-2 与 3 株鸡源 *L. reuteri* (CNEI-KCA3、3632、P43)均位于分支 II,并且与 CNEI-KCA3 的遗传进化距离最近,形成一个独立的进化小分支。可见,相同来源的 *L. reuteri* 分离株因生存环境相似,其基因组差异较小,因此在系统发育树上存在一定的聚集性。

2.14 CAZy 注释结果

本研究从基因组层面探究了包括菌株 CHF7-2 在内的 6 株鸡源 *L. reuteri* (CHF7-2、CNEI-KCA3、AM_LB1、3632、P43 和 SKKU-OGDONS-01)对碳水化合物的利用潜力。结果表

明,6 株 *L. reuteri* 共注释到 4 类碳水化合物活性酶,分别为糖苷水解酶类 (glycoside hydrolases, GHs)、糖苷转移酶类 (glycosyl transferases, GTs)、辅助模块酶类 (auxiliary activities, AAs) 和碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding modules, CBMs),其中包含 15 个 GHs 家族、11 个 GTs 家族、2 个 CBMs 家族和 1 个 AAs 家族(图 12)。GHs 和 GTs 的数量最为丰富,共占据全部碳水化合物活性酶的 96.90%。在 GHs 中, GH73 家族和 GH25 家族占据主导地位,它们在 6 株鸡源 *L. reuteri* 中的平均拷贝数分别约为 5 个和 3 个;在 GTs 中, GT4 和 GT2 占据主导地位,它们在上述 *L.*

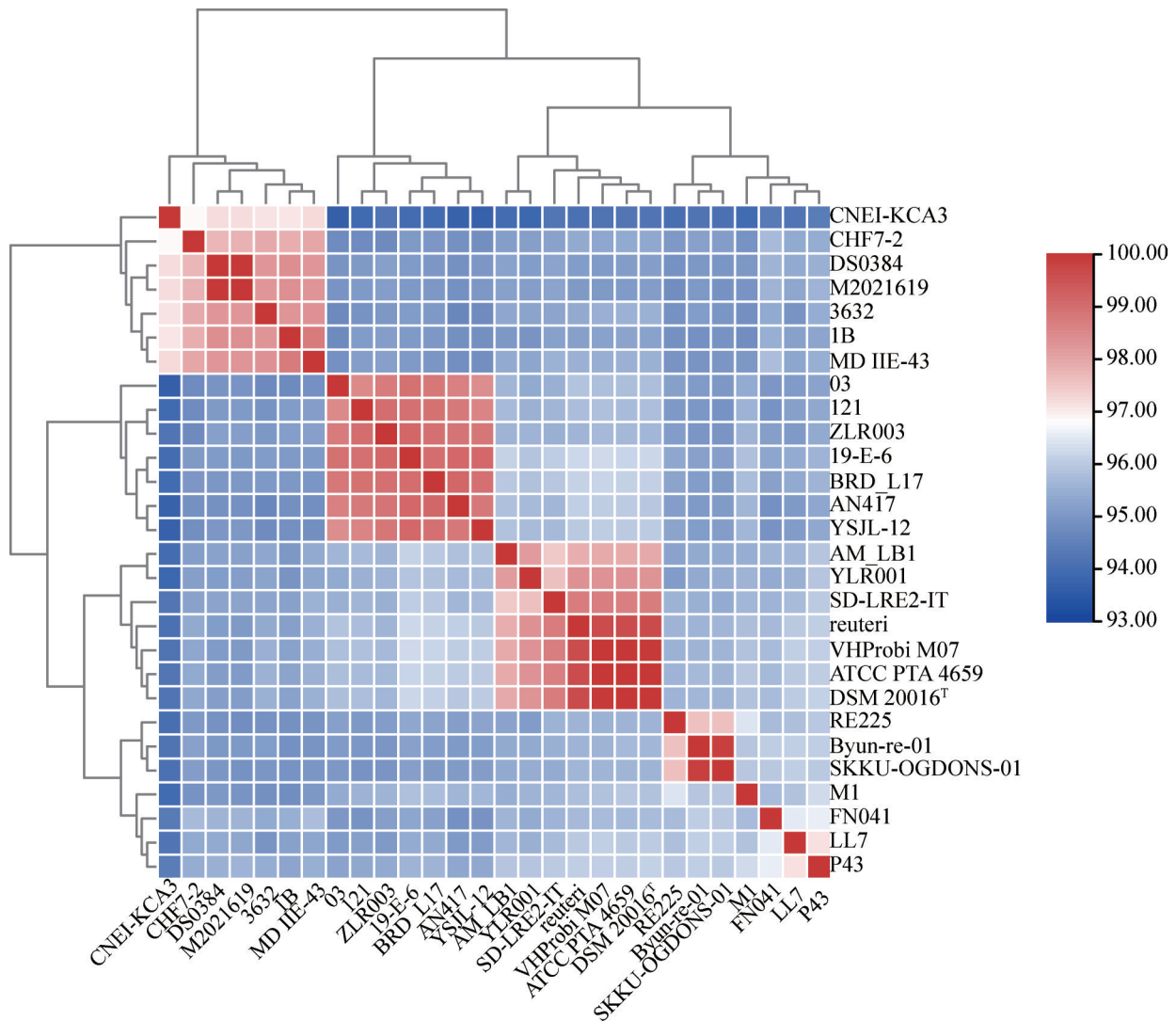


图9 28株罗伊特氏黏液乳杆菌的ANI分析结果

Figure 9 Results of ANI analysis of 28 strains of *Limosilactobacillus reuteri*.

reuteri 中的平均拷贝数分别约为 6 个和 7 个。

3 讨论与结论

大量研究表明, 生长环境和遗传背景均可影响鸡肠道微生物群落的形成和发育, 进而塑造出特定的宿主-微生物共生关系^[30-31]。云南省是我国地方鸡种质资源最为丰富的省份之一, 挖掘其肠道益生菌资源并阐释其益生机制, 对于开发地方鸡源微生态制剂、促进养禽业健康

发展具有重要意义。本课题组邹建华等^[6]从茶花鸡粪便中分离得到菌株 CHF7-2, 经过生理生化试验和 16S rRNA 基因序列鉴定, 确定其为罗伊特氏黏液乳杆菌(*L. reuteri*), 在前期筛选阶段已发现该菌株具有较强的消化液耐受性和抗生素敏感性等益生特性。基于此, 本研究首先探究了 CHF7-2 的表面疏水性、自聚集性及与肠道病原菌的共聚集性, 这些指标与菌株的黏附特性密切相关, 是其发挥益生作用的重要前提^[32]。本研究结果显示, CHF7-2 的表面疏水性和自聚

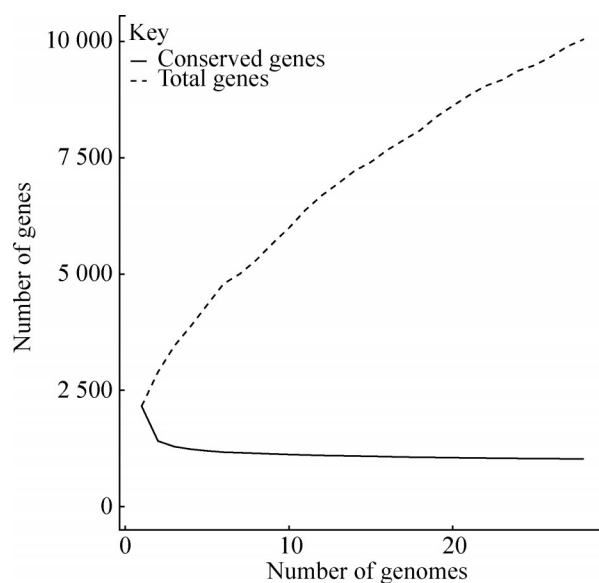


图10 泛基因集和核心基因集曲线
Figure 10 Pan-core gene family curve.

集性分别高达 72.46% 和 85.61%，且与 4 株病原菌的共聚集性均超过 13.00%，表明该菌株具有较强的组织黏附能力，可竞争性抑制肠道病原菌的定殖。抑菌试验显示，菌株 CHF7-2 的上清液对 4 株肠道致病菌均具有抑制活性。通过 BAGEL4 软件对其抑菌物质进行挖掘，发现 CHF7-2 的基因组中存在 2 个 III 类细菌素 Enterolysin A (EnlA) 的合成基因簇。EnlA 是最早在屎肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) LMG 2333 中发现的细胞壁降解细菌素，其水解位点位于肽聚糖短肽的 L-丙氨酸和 D-谷氨酸之间，以及短肽的 L-赖氨酸和肽间桥的 D-天冬氨酸之间^[33-34]。细胞壁的破坏使得细胞易受渗透压等外力损伤，进而加速细菌死亡。据此推测，CHF7-2 可能通

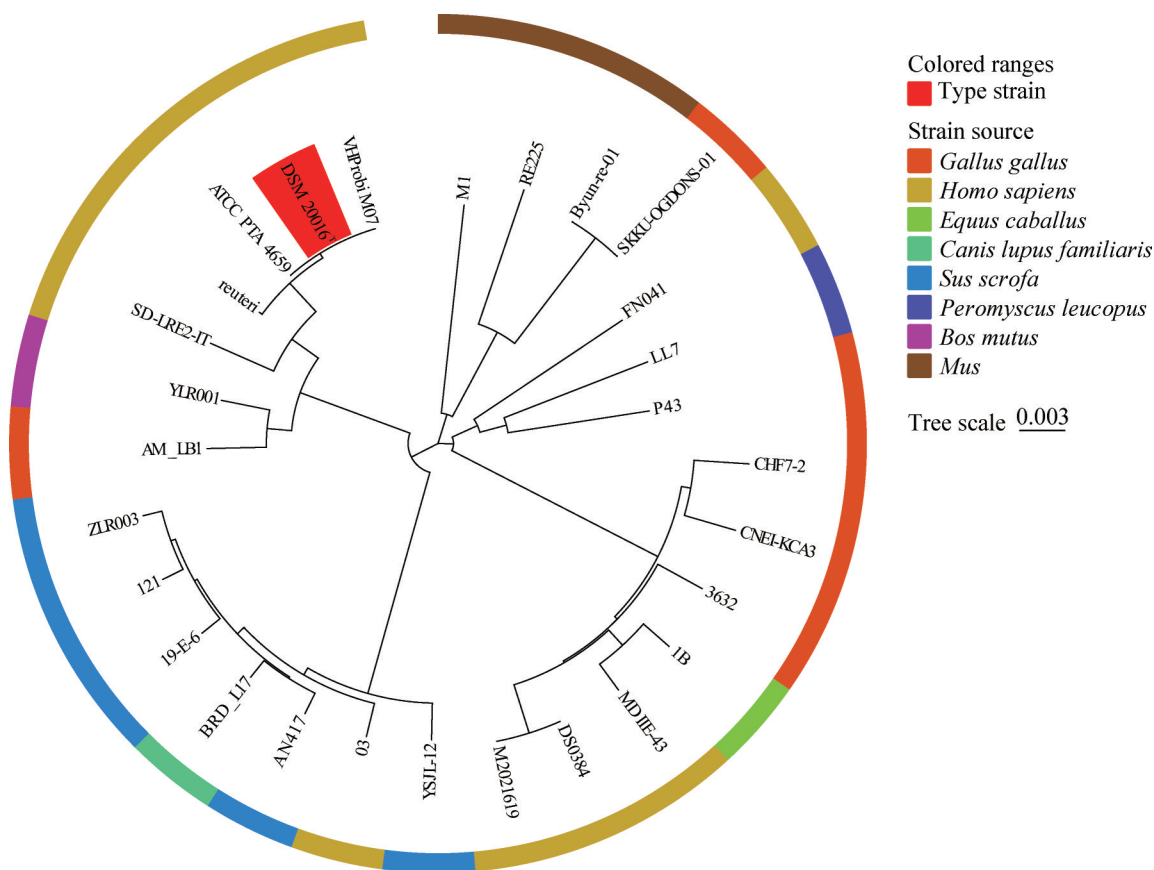


图11 基于核心基因构建的系统发育树
Figure 11 Phylogenetic tree constructed based on core genes.

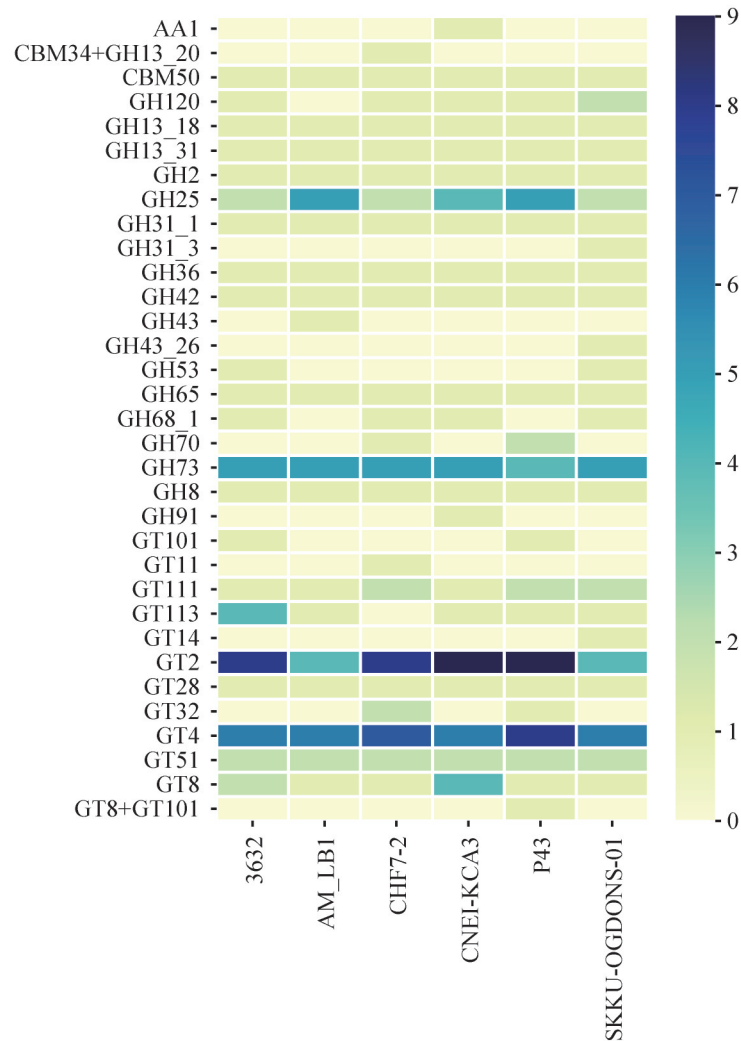


图12 六株鸡源罗伊特氏黏液乳杆菌CAZy数据库注释结果

Figure 12 Annotation results of CAZy database for six chicken-derived *Limosilactobacillus reuteri* strains.

过合成并分泌细菌素 EnlA 来抑制肠道致病菌。值得注意的是, 定殖于肠道内的乳酸菌能够释放抗氧化物质, 减少氧化应激引起的肠道损伤, 进而维护动物肠道和机体的健康^[35]。本研究证实菌株 CHF7-2 的胞外产物具有较强的总抗氧化能力、SOD 和 GSH 活性, 以及对 DPPH 自由基和羟自由基的清除作用, 显示出其作为抗氧化剂的潜力。在产酶特性研究中发现, CHF7-2 的胞外分泌物具有酸性蛋白酶和脂肪酶活力, 但无淀粉酶和纤维素酶活性, 这可能会限制其单

独作为饲料发酵菌剂的使用。Petrova 等^[36]指出, 仅有少量乳酸菌具备分解淀粉的能力, 这类乳酸菌被称为淀粉水解乳酸菌 (amylolytic lactic acid bacteria, ALAB), 可产生 α -淀粉酶、支链淀粉酶、普鲁兰酶。对于纤维素降解过程则主要涉及 3 类酶: 外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β -葡聚糖酶^[37], 而在菌株 CHF7-2 的基因组中未发现上述酶基因。此外, 参照《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》的要求, 对菌株 CHF7-2 的安全性进行检

测, 结果显示其无溶血活性, 且基因组中无毒力和耐药基因, 表明其不具有产生机会性毒力及耐药基因转移的风险。

全基因组测序有助于了解目标菌株的基因组结构及基因功能^[38]。本研究采用三代 PacBio Sequel II 和二代 Illumina NovaSeq 6000 平台对菌株 CHF7-2 进行全基因组测序分析。其基因组序列全长为 2 116 761 bp, 平均 G+C 含量为 38.8%, 与模式菌株 (*L. reuteri* subsp. *reuteri*) DSM 20016^T 高度相似^[39]。基于 GO 功能注释的结果显示, 与代谢过程相关的基因数量最多 (917 个)。KEGG 通路注释发现, 参与新陈代谢的基因所占比例最高, 这与 GO 功能注释的结果相一致, 表明菌株 CHF7-2 具有较强的营养物质吸收和能量代谢能力, 能够适应不同的生存环境。值得注意的是, 乳酸菌作为发酵剂使用时会积累大量乳酸, 从而对菌体产生酸胁迫。若将其用于动物饲喂, 则需抵御 pH 低于 3.0 的胃部环境。因此, 酸胁迫是乳酸菌发挥益生作用所面临的严峻挑战之一。Wu 等^[40]研究表明, 乳酸菌可通过 F 型质子泵以及 Na⁺/H⁺ 反转运蛋白驱动 ATP 水解, 将 H⁺ 排出胞外以维持胞内 pH 稳态, 从而实现耐酸机制。此外, 乳酸菌还可利用谷氨酸脱羧酶将胞内谷氨酸转化为偏碱性的 γ -氨基丁酸, 此过程会消耗胞内 H⁺^[41]。精氨酸脱氨酶途径也是乳酸菌抵御酸胁迫的重要方式, 该过程利用精氨酸脱亚氨酶和氨基甲酸激酶, 催化精氨酸转变为 NH₃ 和 CO₂, NH₃ 结合 H⁺ 以升高胞内 pH 值^[42]。菌株 CHF7-2 的基因组中存在 Na⁺/H⁺ 反转运蛋白和完整的 F 型质子泵编码基因 (*nhaC*、*atpA-atpH*); 谷氨酸脱羧酶和 γ -氨基丁酸反转运蛋白基因 (*gadA/B*、*gadC*); 精氨酸脱亚氨酶、氨基甲酸激酶和精氨酸代谢相关基因 (*arcA*、*arcC*、*argR*、*argG*、*argH*)。动物体消化道中, 除胃酸外, 胆盐也可破坏乳酸

菌细胞结构, 导致细胞死亡, 而菌株 CHF7-2 的基因组中具有胆酰甘氨酸水解酶基因 (*cbh*), 可编码胆盐水解酶^[43], 从而实现对胆盐的抗性。本研究同时发现, 菌株 CHF7-2 的基因组中存在潜在的黏附基因: 延伸因子 G (*efg*)、脂磷壁酸合成酶 (*ltaS*) 和 1,2-二酰基甘油 3- α -葡糖基转移酶 (*mgs*)。延伸因子 G 是一种乳酸菌表面蛋白, 可与纤维蛋白原、胶原蛋白和黏蛋白特异性结合^[44], 而这些蛋白又是肠道上皮细胞必不可少的成分^[45-47], 因此延伸因子 G 可参与 CHF7-2 对肠道的黏附。脂磷壁酸作为革兰氏阳性菌细胞壁的组分, 其脂质部分可与上皮细胞纤维连接蛋白受体结合, 进而介导黏附过程^[48], 而 *ltaS* 和 *mgs* 均为脂磷壁酸合成的关键基因。此外, 乳酸菌在成功定殖于动物肠道后或在发酵、保藏过程中会受到氧化胁迫, 只有具有较强的抗氧化能力才能最大限度地发挥益生作用。本研究分析显示, 菌株 CHF7-2 的基因组中存在谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (*gshA*)、谷胱甘肽还原酶 (*gsr*)、葡萄糖-6-磷酸 1-脱氢酶 (*g6pd*) 等与谷胱甘肽代谢相关的基因。同时, 菌株 CHF7-2 的基因组中还存在硫氧还蛋白系统相关基因: 硫氧还蛋白还原酶 (*trxR*) 和硫氧还蛋白 1 (*trxA*)。其中, 谷胱甘肽系统广泛存在于乳酸菌中, 谷胱甘肽除直接作为抗氧化剂中和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 外, 还可作为多种抗氧化和解毒酶的辅因子参与抗氧化过程^[49-50]。硫氧还蛋白系统则通过将电子提供给硫醇依赖性过氧化物酶, 从而快速完成对 ROS 的清除^[51]。对代谢产物进行分析显示, 菌株 CHF7-2 的基因组中含有核黄素 (*ribBA*、*ribF*、*ribT*、*ribD*、*ribE*、*ribH*) 和乙酸合成相关基因 (*ackA*)。核黄素也称维生素 B₂, 大多数微生物具有合成核黄素的功能, 而动物则不能自身合成, 其在机体中参与氧化还原反应, 起到抗氧化和抗炎作用^[52-53]。乙酸作为一

种短链脂肪酸, 可促进动物肠道发育和营养吸收^[54]。最后, 乳酸菌在生产过程中常会遭遇不适宜的冷热环境, 需要诱导产生一系列的伴侣蛋白或蛋白酶, 以降低或消除冷热胁迫造成的损伤。菌株 CHF7-2 的基因组中存在包含 *dnaK*、*dnaJ*、*hrcA*、*grpE*、*groES*、*groEL* 在内的伴侣分子和转录调控因子基因, 这些基因可组成 DnaK-GrpE-DnaJ 和 GroES-GroEL 伴侣蛋白复合体, HrcA 则作为 DnaK 和 GroESL 这 2 个操纵子的负调控蛋白参与对热胁迫的响应^[55]。冷休克蛋白基因(*cspA*)也被发现存在于 CHF7-2 的基因组中, 该基因可表达冷休克蛋白, 冷休克蛋白作为 RNA 分子伴侣, 能够促进核酸有效折叠, 保证菌体在受到冷胁迫时维持核酸的正常转录和翻译^[56]。

通过对包含 CHF7-2 在内的 28 株不同来源的 *L. reuteri* 进行 ANI 分析显示, CHF7-2 与罗伊特氏黏液乳杆菌 (*L. reuteri*) 模式株 DSM 20016^T 的 ANI 值达到 95.38%, 在全基因组水平上证实其属于 *L. reuteri*。值得注意的是, 28 株 *L. reuteri* 的泛-核心基因集具有开放式特征, 泛基因组大小随菌株数量的增加而不断扩大, 但核心基因数量却趋于稳定, 仅占有所有基因的 11.21%, 这一现象可能源于不同 *L. reuteri* 具有产生或接受新遗传物质的能力以适应不同生态环境的需要^[57]。此外, CAZy 注释显示, 菌株 CHF7-2 与其他 5 株鸡源 *L. reuteri* 在 GHs 和 GTs 上的注释最为丰富, 特别是 GH73、GH25 家族和 GT4、GT2 家族。GHs 以内切或外切方式水解含糖化合物中的糖苷键, 生成单糖、寡糖或糖复合物, 而 GTs 则负责糖苷键的形成, 参与糖蛋白、糖脂和多糖的合成^[58-59]。其中, GT4 和 GT2 主要参与细菌细胞壁中 β -1,4-糖苷键、脂磷壁酸和胞外多糖的合成^[60-61], 可能与菌体的益生功效有关。GH73 和 GT25 则均与细

菌溶菌酶的合成相关, 特别是 GH73 可切割细菌肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和 N-乙酰胞壁酸(MurNAc)部分之间的 β -1,4-糖苷键, 进而参与溶菌过程^[62-63], 也证实了乳酸菌中普遍存在这 2 种 GHs 糖苷酶家族, 通过抑菌作用适应宿主复杂的微生物环境^[64]。

综上所述, 罗伊特氏黏液乳杆菌 CHF7-2 具有良好的黏附性能、抗菌活性和抗氧化活性。同时, 其基因组中含有大量潜在的益生基因, 且不存在毒力基因和耐药基因。因此, 该菌株有望成为饲用微生态制剂的重要候选菌株。

作者贡献声明

徐乐: 实验设计、实验操作、数据分析和论文撰写; 陈诗宇: 实验操作、数据分析和论文撰写; 王上: 实验操作、数据分析; 张志翔: 实验操作; 董斌: 实验操作; 林秋叶: 实验设计、数据分析、论文审阅和修改; 曹振辉: 实验设计、数据分析、论文审阅和修改。

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] HUO JL, WU GS, CHEN T, HUO HL, YUAN F, LIU LX, GE CR, MIAO YW. Genetic diversity of local Yunnan chicken breeds and their relationships with Red Junglefowl[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(2): 3371-3383.
- [2] 王坤, 葛长荣. 云南地方鸡资源现状与保护[J]. *中国畜禽种业*, 2023, 19(12): 129-139.
WANG K, GE CR. Present situation and protection of Yunnan local chicken resources[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2023, 19(12): 129-139 (in Chinese).
- [3] 杨亮宇. 三种云南地方鸡肠道微生物宏基因组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2022.
YANG LY. Metagenomic studies on gut microbiome of three kinds of native chicken breeds in Yunnan Province[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).

- [4] CARRASCO JMD, CASANOVA NA, MIYAKAWA MEF. Microbiota, gut health and chicken productivity: what is the connection?[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(10): 374.
- [5] RYCHLIK I. Composition and function of chicken gut microbiota[J]. *Animals*, 2020, 10(1): 103.
- [6] 邹建华, 叶朋飞, 毕润, 柴宁, 汤中洁, 汪思凡, 潘洪彬, 曹振辉. 散养茶花鸡源乳酸菌分离鉴定及益生特性研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2018, 33(4): 647-654.
ZOU JH, YE PF, BI R, CHAI N, TANG ZJ, WANG SF, PAN HB, CAO ZH. Isolation and identification of lactic acid bacteria from free range Chahua chickens and their probiotic properties[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2018, 33(4): 647-654 (in Chinese).
- [7] JIANG JY, LI K, XIAO Y, ZHONG AA, TANG JJ, DUAN YF, LI ZJ. *Limosilactobacillus reuteri* regulating intestinal function: a review[J]. *Fermentation*, 2023, 9(1): 19.
- [8] ABUQWIDER J, ALTAMIMI M, MAURIELLO G. *Limosilactobacillus reuteri* in health and disease[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 522.
- [9] LUO ZC, CHEN AL, XIE AN, LIU XY, JIANG SY, YU RQ. *Limosilactobacillus reuteri* in immunomodulation: molecular mechanisms and potential applications[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1228754.
- [10] 饲料添加剂品种目录(2013)[J]. 中华人民共和国农业部公报, 2014(1): 61-63.
Catalogue of feed additive varieties (2013)[J]. *Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China*, 2014(1): 61-63 (in Chinese).
- [11] 解读关于《可用于食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿食品的菌种名单》更新的公告(2022年第4号)[J]. *饮料工业*, 2022, 25(5): 3-4.
Announcement on the updates to the *List of Strains Usable in Food* and the *List of Strains Usable in Infant Food* (2022 No. 4) [J]. *Beverage Industry*, 2022, 25(5): 3-4 (in Chinese).
- [12] PENG XQ, ED-DRA A, YUE M. Whole genome sequencing for the risk assessment of probiotic lactic acid bacteria[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 63(32): 11244-11262.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验: GB 4789.35—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
National Health Commission of the People's Republic of China, National Medical Products Administration. *Food Safety National Standard, Food Microbiological Examination, Lactic Acid Bacteria Test: GB 4789.35-2023*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023 (in Chinese).
- [14] FITRI F, TAWALI AB, LAGA A, DWYANA Z. Enzyme activity assay of lactic acid bacteria from civet (*Paradoxurus hermaphroditus*) digestive tract[J]. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2021, 9(10): 1649-1654.
- [15] KANPIENGJAI A, LUMYONG S, NGUYEN TH, HALTRICH D, KHANONGNUCH C. Characterization of a maltose-forming α -amylase from an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21[J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2015, 120: 1-8.
- [16] KAUSHIK JK, KUMAR A, DUARY RK, MOHANTY AK, GROVER S, BATISH VK. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*[J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8099.
- [17] 李忠琴, 王泽楠, 黄文树, 杨求华, 邹文政. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 肠道源植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) HY21 的生长及益生特性分析[J]. *微生物学报*, 2024, 64(3): 840-853.
LI ZQ, WANG ZN, HUANG WS, YANG QH, ZOU WZ. Growth and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* HY21 from intestinal tract of *Apostichopus japonicus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(3): 840-853 (in Chinese).
- [18] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法: GB/T 28715—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. *Determination of acidic and neutral protease activity in feed additives—Spectrophotometric method: GB/T 28715—2012*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013 (in Chinese).
- [19] FATHI F, QAMSARI EM, KERMANSHAHI RK, MOOSAVI-NEJAD Z, GHASHGHAEI T. Optimization of lipase production by a newly isolate of *Lactobacillus fermentum*[J]. *Iranian Journal of Science and Technology Transactions A-Science*, 2022, 46(4): 1103-1113.
- [20] DASH BK, RAHMAN MM, SARKER PK. Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BII9 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 859805.
- [21] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲用纤维素酶活性的测定 滤纸法: GB/T 23881—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. *Determination of feed cellulase activity—Filter paper assay method: GB/T 23881—2009*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [22] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (Database issue): D325-D328.
- [23] JIA BF, RAPHENYA AR, ALCOCK B, WAGLECHNER N, GUO PY, TSANG KK, LAGO BA, DAVE BM, PEREIRA S, SHARMA AN, DOSHI S, COURTOT M, LO R, WILLIAMS LE, FRYE JG, ELSAYEGH T, SARDAR D, WESTMAN EL, PAWLOWSKI AC, JOHNSON TA, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D566-D573.
- [24] 农业农村部办公厅关于印发《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》的通知[J]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2021(11): 97-111.

- Notice from the General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on the Issuance of the *Guidelines for Identification and Safety Evaluation of Strains Used in Direct Feeding of Microorganisms and Fermented Products*[J]. Bulletin of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2021(11): 97-111 (in Chinese).
- [25] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [26] PAGE AJ, CUMMINS CA, HUNT M, WONG VK, REUTER S, HOLDEN MTG, FOOKES M, FALUSH D, KEANE JA, PARKHILL J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [27] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [28] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [29] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114.
- [30] KERS JG, VELKERS FC, FISCHER EAJ, HERMES GDA, STEGEMAN JA, SMIDT H. Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 236.
- [31] BINDARI YR, GERBER PF. Centennial review: factors affecting the chicken gastrointestinal microbial composition and their association with gut health and productive performance[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(1): 101612.
- [32] LIN XN, XIA YJ, YANG YJ, WANG GQ, ZHOU W, AI LZ. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* AR113 and its molecular mechanism of antioxidant[J]. *LWT*, 2020, 126: 109278.
- [33] NILSEN T, NES IF, HOLO H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2975-2984.
- [34] KHAN H, FLINT SH, YU PL. Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(2): 484-494.
- [35] CHEN FM, CHEN JY, CHEN QH, YANG LY, YIN J, LI YH, HUANG XG. *Lactobacillus delbrueckii* protected intestinal integrity, alleviated intestinal oxidative damage, and activated Toll-like receptor-bruton's tyrosine kinase-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 468.
- [36] PETROVA P, PETROV K, STOYANCHEVA G. Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria-structures, properties, and applications[J]. *Starch-Starke*, 2013, 65(1/2): 34-47.
- [37] WANG K, GAO PW, GENG LL, LIU CQ, ZHANG J, SHU CL. Lignocellulose degradation in *Protaetia brevitarsis* larvae digestive tract: refining on a tightly designed microbial fermentation production line[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 90.
- [38] 刘文俊, 张和平. 益生菌基因组学在乳酸菌筛选和功能评价中的应用[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(1): 1-11.
- LIU WJ, ZHANG HP. Application of probiogenomics in screening and functional evaluation of probiotics lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24(1): 1-11 (in Chinese).
- [39] SMYTHE P, EFTHIMIOU G. *In silico* genomic and metabolic atlas of *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016: an insight into human health[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1341.
- [40] WU JJ, ZHOU QY, LIU DM, XIONG J, LIANG MH, TANG J, XU YQ. Evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacillus gasserii* LGZ1029 based on whole genome analysis[J]. *LWT*, 2023, 184: 114759.
- [41] YOGESWARA IBA, MANERAT S, HALTRICH D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria-a key enzyme in GABA synthesis[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 1923.
- [42] YANG H, HE MW, WU CD. Cross protection of lactic acid bacteria during environmental stresses: stress responses and underlying mechanisms[J]. *LWT*, 2021, 144: 111203.
- [43] LIANG LF, YI YH, LV YY, QIAN JW, LEI XJ, ZHANG GY. A comprehensive genome survey provides novel insights into bile salt hydrolase (BSH) in *Lactobacillaceae*[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1157.
- [44] YU YX, ZONG ML, LAO LF, WEN JZ, PAN DD, WU Z. Adhesion properties of cell surface proteins in *Lactobacillus* strains in the GIT environment[J]. *Food & Function*, 2022, 13(6): 3098-3109.
- [45] SELTANA A, CLOUTIER G, NICOLAS VR, KHALFAOUI T, TELLER IC, PERREAULT N, BEAULIEU JF. Fibrin (ogen) is constitutively expressed by differentiated intestinal epithelial cells and mediates wound healing[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 916187.
- [46] JABAJI Z, BRINKLEY GJ, KHALIL HA, SEARS CM, LEI NY, LEWIS M, STELZNER M, MARTÍN MG, DUNN JCY. Type I collagen as an extracellular matrix for the *in vitro* growth of human small intestinal epithelium[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107814.
- [47] PELASEYED T, HANSSON GC. Membrane mucins of the intestine at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2020, 133(5): jcs240929.
- [48] BEACHEY EH, SIMPSON WA. The adherence of group A streptococci to oropharyngeal cells: the lipoteichoic acid adhesin and fibronectin receptor[J]. *Infection*, 1982, 10(2): 107-111.
- [49] POPHALY SD, SINGH R, POPHALY SD, KAUSHIK JK, TOMAR SK. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 114.
- [50] MAILLOUX RJ. Protein S-glutathionylation reactions as a global inhibitor of cell metabolism for the desensitization of hydrogen peroxide signals[J]. *Redox Biology*, 2020, 32: 101472.

- [51] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75-87.
- [52] OLFAT N, ASHOORI M, SAEDISOMEOLIA A. Riboflavin is an antioxidant: a review update[J]. *British Journal of Nutrition*, 2022, 128(10): 1887-1895.
- [53] BERTOLLO CM, OLIVEIRA ACP, ROCHA LTS, COSTA KA, NASCIMENTO EB, COELHO MM. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 547(1-3): 184-191.
- [54] ZHOU H, SUN J, GE LP, LIU ZH, CHEN H, YU B, CHEN DW. Exogenous infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal functions independently of the gut microbiota[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(12): skaa371.
- [55] CASTALDO C, SICILIANO RA, MUSCARIELLO L, MARASCO R, SACCO M. CcpA affects expression of the *groESL* and *dnaK* operons in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2006, 5: 35.
- [56] JIN SS, WANG YZ, ZHAO XH. Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 169: 105652.
- [57] YU J, SONG YQ, REN Y, QING YT, LIU WJ, SUN ZH. Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 1-10.
- [58] GENG A, JIN M, LI NN, ZHU DC, XIE RR, WANG QQ, LIN HX, SUN JZ. New insights into the co-occurrences of glycoside hydrolase genes among prokaryotic genomes through network analysis[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 427.
- [59] GLOSTER TM. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 28: 131-141.
- [60] OEHME DP, SHAFEE T, DOWNTON MT, BACIC A, DOBLIN MS. Differences in protein structural regions that impact functional specificity in GT2 family β -glucan synthases[J]. *PLoS One*, 2020, 14(10): e0224442.
- [61] ALSHAREEF SA. Metabolic analysis of the CAZy class glycosyltransferases in rhizospheric soil fungione of the plant species *Moringa oleifera*[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2024, 31(4): 103956.
- [62] LIPSKI A, HERVÉ M, LOMBARD V, NURIZZO D, MENGIN-LECREULX D, BOURNE Y, VINCENT F. Structural and biochemical characterization of the β -N-acetylglucosaminidase from *Thermotoga maritima*: toward rationalization of mechanistic knowledge in the GH73 family[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(3): 319-330.
- [63] LÓPEZ-MONDÉJAR R, TLÁSKAL V, VETROVSKY T, STURSOVÁ M, TOSCAN R, da ROCHA UN, BALDRIAN P. Metagenomics and stable isotope probing reveal the complementary contribution of fungal and bacterial communities in the recycling of dead biomass in forest soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2020, 148: 107875.
- [64] CHEN KX, ZHOU XY, ZHAO JX, ROSS RP, STANTON C, CHEN W, YANG B. Comparative genomics of *Lactobacillus johnsonii* reveals extensive intraspecific genetic variation[J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103190.