

研究报告

大熊猫肠道芽孢杆菌的分离鉴定及部分生物学特性

李进^{1Δ} 钟志军^{1Δ} 苏怀益¹ 周紫晓¹ 李魏¹ 刘福芮¹ 兰景超²
周潇潇³ 张文平^{2*} 彭广能^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130)

(2. 成都大熊猫繁育研究基地 四川 成都 610081)

(3. 成都市动物疫病预防控制中心 四川 成都 610000)

摘要:【目的】分析大熊猫肠道中芽孢杆菌的种类、纤维素分解能力、抗微生物作用和常用抗生素药物敏感性。【方法】利用芽孢耐高温特性分离菌株,基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树,通过测量芽孢杆菌在刚果红纤维素培养基上的分解圈分析其纤维素分解能力,采用牛津杯法测定芽孢杆菌的抑菌能力,结合软件分析抑菌能力和进化树之间的关系,通过 PCR 调查芽孢杆菌的抗菌肽分布规律,最后通过药敏试验检测芽孢杆菌是否对常用抗生素敏感。【结果】共分离得到 21 株芽孢杆菌;进化树显示,这些芽孢杆菌分为 6 个类别(Category);羧甲基纤维素钠水解结果显示,所有菌株均能分解纤维素;大部分芽孢杆菌菌株对 3 种肠道病原菌有较强的抑制能力,聚类分析表明,菌株的抗菌能力与基于 16S rRNA 基因的分类有一定的关联性;66.67% (14/21) 的菌株中可以检测到 2 个或 3 个抗菌肽基因;药敏试验结果显示,菌株整体药物耐受率低,仅为 7.54% (19/264),但仍有少数菌株对抗生素耐受。【结论】分离菌株种类丰富,分布平均,且均具有纤维素分解能力。21 株菌株都含有抗菌肽基因,代谢产物对 3 种肠道病原菌具有明显抑制作用。常用抗生素耐受性低,对规范临床用药具有指导性。

关键词: 大熊猫, 芽孢杆菌, 16S rRNA 基因, 耐药性, 肠道菌群, 纤维素分解

Isolation, identification and partial biology research of *Bacillus* in giant panda intestines

LI Jin^{1Δ} ZHONG Zhi-Jun^{1Δ} SU Huai-Yi¹ ZHOU Zi-Yao¹ LI Wei¹ LIU Fu-Rui¹
LAN Jing-Chao² ZHOU Xiao-Xiao³ ZHANG Wen-Ping^{2*} PENG Guang-Neng^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu, Sichuan 610081, China)

(3. Animal Disease Prevention and Control Center of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610000, China)

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31272620); Chengdu Giant Panda Breeding Research Foundation (No. 002Z3102)

***Corresponding author:** E-mail: ZHANG Wen-Ping: zhang-zoology@163.com; PENG Guang-Neng: pgn.sicau@163.com
ΔThese authors equally contributed to this work

Received: May 12, 2015; **Accepted:** July 17, 2015; **Published online** (www.cnki.net): August 17, 2015

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31272620); 成都大熊猫繁育研究基金会项目(No. 002Z3102)

***通讯作者:** E-mail: 张文平: zhang-zoology@163.com; 彭广能: pgn.sicau@163.com

Δ共同第一作者

收稿日期: 2015-05-12; **接受日期:** 2015-07-17; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-08-17

Abstract: [Objective] The purpose of this research was to analyze the *Bacillus* species, cellulose decomposition, antimicrobial activity and antibiotic resistance in giant panda intestines. **[Methods]** *Bacillus* was isolated based on the resistance of high temperature, then to construct the phylogenetic tree with 16S rRNA gene sequences. Hydrolyzed circle on the cellulose-congo red medium was measured to detect the cellulose decomposition. The oxford cup method was adopted to examine the bacteriostatic ability and then we analysed the relationship between the bacteriostatic ability and phylogenetic tree by software. The distribution regularity of *Bacillus* antibacterial peptides was detected by PCR. At last, susceptibility testing was put into use to detect the antibiotic resistance of *Bacillus*. **[Results]** Twenty-one strains was isolated and divided into 6 categories. All of the strains are able to decompose the cellulose on different levels by measuring the hydrolysis circle diameter. Most strains can inhibit the enteric pathogens obviously. Cluster analysis shows that the antibacterial ability is relevant to gene classification based on 16S rRNA gene in some cases. Susceptibility testing shows that most *Bacillus* strains are sensitive to common antibiotics, but a few strains are still resistant to the antibiotics. **[Conclusion]** The *Bacillus* strains isolated in giant panda intestines are abundant and able to decompose cellulose. The metabolic product of the antimicrobial peptide gene contained in all of 21 *Bacillus* strains can significantly inhibit three kinds of enteric pathogens. The *Bacillus* are sensitive to common antibiotics which is helpful to standardize clinical medicine.

Keywords: Giant panda, *Bacillus*, 16S rRNA gene, Drug resistance, Intestinal flora, Cellulose degradation

大熊猫被誉为“活化石”，现存不足两千只^[1]。成年大熊猫每天需要 12.5 kg 左右的鲜竹^[2]，摄入大量纤维素的同时，很多病原体、芽孢杆菌、土壤等也会一起进入消化道。在大熊猫的一生中，肠道菌群存在着一系列的动态变化，其正常和健康的生活与肠道微生物息息相关。研究发现，大熊猫肠道内能够分解纤维素和木质素的细菌占其肠道微生物很大一部分^[3-4]。

芽孢杆菌，G⁺，需氧或兼性厌氧，对环境变化有极强的耐受能力^[5]。包含很多有特殊功能的菌株，在工业、农业、医学等科学领域有重要作用，有十分广泛的应用价值。研究表明，芽孢杆菌的生物防治作用主要是依靠其分泌的细菌素，也叫抗菌肽^[5]，作为一种蛋白质类抗物，能够有效拮抗多种动物病原物。

芽孢杆菌有可能因为抗菌药物的选择压力而产生耐药菌株，故很有必要对芽孢杆菌中常用抗生素耐药性进行研究，进而对抗生素危害进行分析，为大熊猫临床合理用药提供科学指导。

目前对大熊猫肠道菌群的研究还比较浅显，芽孢杆菌和其他菌群对大熊猫肠道的免疫和营养作

用还不是很清楚。本研究旨在了解大熊猫肠道中芽孢杆菌的种类、纤维素分解能力、抗微生物作用和常用抗生素药物敏感性，有助于了解芽孢杆菌对大熊猫肠道健康的贡献，进而有助于大熊猫保护的相关工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物：对四川雅安碧峰峡基地所有亚成年健康大熊猫(2-4 岁)进行粪便样品的采集。经无菌采样袋采集后的样品保存于冰盒中，立刻送实验室检测。

1.1.2 主要试剂：天根细菌总 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR Master Mix 由北京天根生化科技有限公司生产；引物由上海 Invitrogen 公司合成；药敏纸片购置于广州迪景微生物有限公司。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, NaCl 5.0, 加 ddH₂O 将培养基定容至 1 L, pH 7.2-7.4, 0.1-0.15 MPa 灭菌 15 min 备用。固体加琼脂 15.0 g。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离和纯化：无菌环境下称取新鲜粪

便 5.0 g, 加入 50 mL 生理盐水振荡均匀, 置于 80 °C 水浴 20 min, 大部分芽孢杆菌孢子可以耐受这个温度, 而其他细菌则会被高温杀死^[6]。梯度稀释后均匀涂布于 LB 培养基, 37 °C 培养 24 h 后观察。结合菌落形态及镜下观察结果挑取目标菌落, 反复划线分离至获得纯菌株。接种 LB 培养基于 37 °C 扩大培养后, 4 °C 保存备用。

1.2.2 基于 16S rRNA 基因的序列分析及系统发育树构建: 利用天根细菌总 DNA 提取试剂盒提取细菌总 DNA, 以细菌 DNA 为模板 PCR 扩增 16S rRNA 基因, 将扩增 PCR 产物进行凝胶电泳, 照相, 然后送上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果进行 BLAST 同源性检索, 上传至 GenBank 数据库, 并通过 BLAST 算法进行相似性比较。进化树利用 MEGA 6 软件构建, 采用最大简约法和邻接法进行分析, 分支置信度值通过重采样 1 000 次确定。

1.2.3 芽孢杆菌纤维素分解能力检测: 将 21 株芽孢杆菌分别接种于 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 恒温振荡培养, 18 h 后吸取 1 μL 培养液点种于刚果红纤维素培养基, 37 °C 于恒温箱培养, 48 h 后观察结果并测量透明圈直径^[7]。

1.2.4 芽孢杆菌的抑菌能力测定: 参照文献[8], 将各芽孢杆菌菌液 13 800×g 离心 10 min, 经过旋转蒸发仪处理, 获得发酵提取物, 将粗提取物稀释至 1 g/L。将肠道常见病原菌肠道大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌划线培养后, 挑取单个菌落接种于营养肉汤培养基中培养 12 h 作为原菌液。采用牛津杯法^[9]测定抑菌能力, 通过软件 Statistica ver. 10 比较芽孢杆菌对病原菌的抑制能力和其进化树之间的关系和特征。

1.2.5 芽孢杆菌抗菌基因的分布调查: 根据文献[5,10], 选取芽孢杆菌含有的常见 6 种抗菌肽 *ituA* (*Iturin A*)、*hag* (*Flagellin*)、*tasA* (*TasA*)、*srf* (*Surfactin*)、*spaS* (*Subtilin*)和 *mrsA* (*Mersacidin*)进行 PCR 反应。25 μL PCR 扩增反应体系: 2×Taq PCR Mix 12.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH₂O 8.5 μL。反应程序: 95 °C 3 min;

95 °C 30 s, 51 °C 60 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 终止反应。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。随机选取 10 个阳性结果, 纯化后送上海英骏生物技术有限公司测序, 以验证 PCR 结果。试验还尝试利用统计学方法寻找 6 种抗菌肽基因的分布规律, 由 Statistica ver. 10 软件的主成分分析法完成。

1.2.6 药敏试验: 采用纸片琼脂扩散法(Kirby-Bauner 法)测定 21 种芽孢杆菌对抗生素的敏感性, 参照 CLSI 推荐方法进行操作, 根据 CLSI 标准判断敏感(S)、中介(I)和耐药(R), 分析病原菌的耐药率及耐药谱^[11]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化和 16S rRNA 基因序列分析

为调查大熊猫肠道中芽孢杆菌种类, 利用芽孢杆菌孢子的耐高温特性, 从粪便中分离培养芽孢杆菌, 经纯化后, 分离到 21 株芽孢杆菌, 并以它们的宿主名字命名。采用 16S rRNA 基因序列分析, 将这些菌株分为 6 类。图 1 为 21 株细菌的同源树。表 1 列出了这些菌株的名称、16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号和参考菌株。结果表明, 大熊猫肠道中芽孢杆菌的多样性较为丰富, 分布平均。

2.2 芽孢杆菌纤维素分解能力检测

21 株芽孢杆菌在刚果红纤维素培养基上培养 48 h 后, 均能形成大小不一的透明圈, 即都具有纤维素酶活性。水解圈直径见图 2。

2.3 芽孢杆菌的抑菌能力

采用牛津杯法, 利用芽孢杆菌抗菌肽提取物对病原菌的生长抑制作用检测芽孢杆菌抗菌活性。发现大多数的芽孢杆菌菌株对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有较高的抑制力, 然而, 它们对沙门氏菌没有明显的抑制作用。其中, YH8 对大肠杆菌抑菌圈最大(5.40±0.14 cm), YS1 对沙门氏菌抑制性最强(1.88±0.02 cm), GG2 抑制金黄色葡萄球菌最强(5.95±0.06 cm)。F 组与其他组相比具有针对 3 种病原体的最佳平均抑制能力, 而 D 组最小。各个芽孢杆菌菌株对病原菌的抑菌圈细节见图 3。

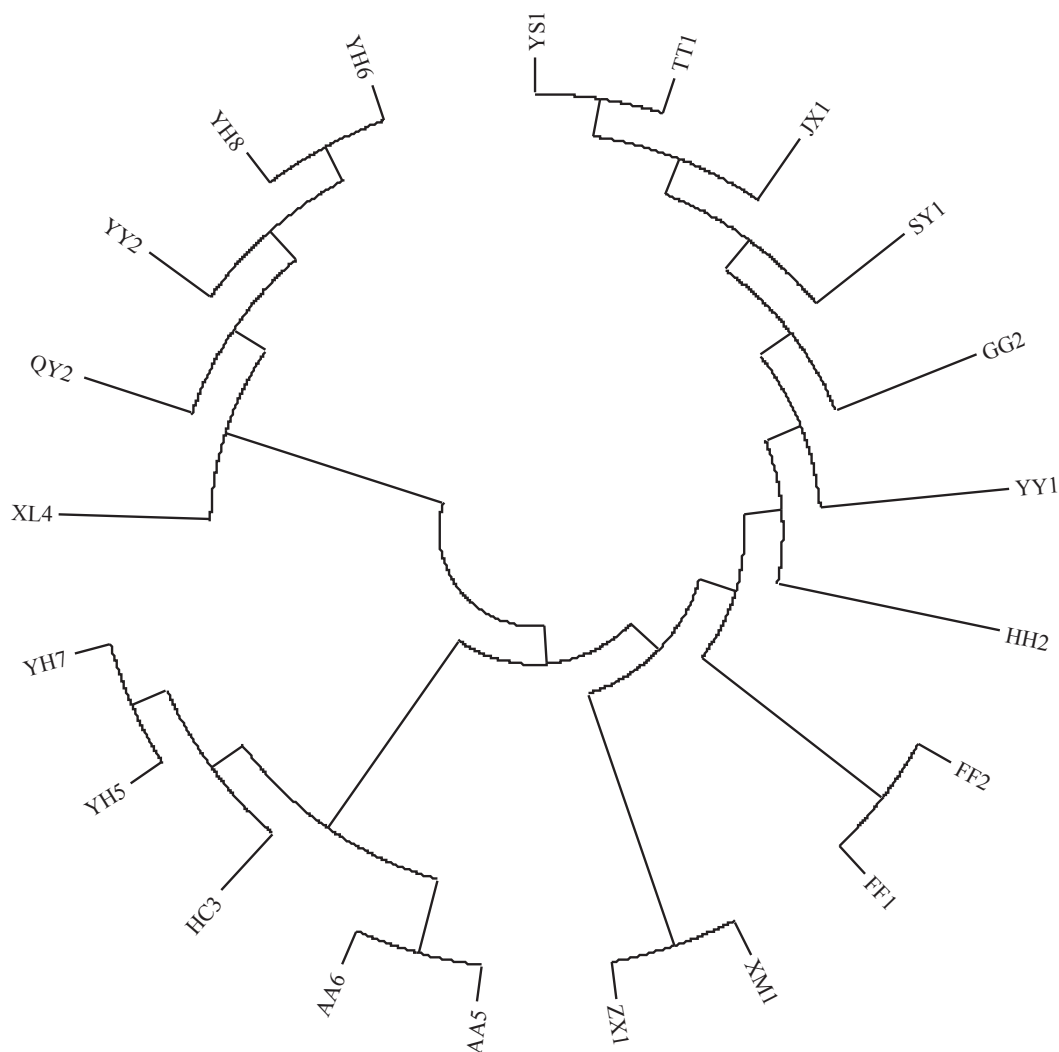


图 1 21 株芽孢细菌的进化树

Figure 1 The homologous tree of *Bacillus* strains

2.4 6 种常见芽孢杆菌抗菌基因的分布特性

通过 PCR 检测大熊猫芽孢杆菌中 6 种常见抗菌基因的分布。66.67% (14/21) 的菌株可以检测到 2 个或 3 个抗菌肽基因。其中, 检测到最多的抗菌肽基因是 *hag*, 而 *tasA* 最少。随机选择的阳性 PCR 产物通过 BLAST 序列比对, 与目的基因呈 96%–99% 的相似性, 可以证实 PCR 扩增的准确性。在结果中, A 组和 F 组平均含有的抗菌肽基因最多, 而 C 组最少。完整的抗微生物肽的基因 PCR 检测结果见表 2。

有趣的是, 这些抗微生物肽基因的分布与他们基于 16S rRNA 基因分类的结果是相似的。例如,

hag 和 *srf* 可以同时 A 组的大多数成员中发现; *spaS*、*hag* 和 *mrsA* 可以在全部的 F 组中检测到; B 组的抗菌肽分布情况是完全一样的。将结果和芽孢杆菌的抑菌谱结果相比较, 发现在每一株中抗菌肽基因的数量与他们的抗菌能力正相关, 此外还发现, 在所有组别中, F 组中抗菌肽基因的分布最广, 而 D 组最少。

2.5 耐药性

采用 K-B 法对所分离鉴定的芽孢杆菌菌株进行 12 种抗生素的药敏试验, 结果显示 12 种抗生素对 21 株芽孢杆菌敏感性较高, 整体药物耐受率低,

表 1 菌株名称和 16S rRNA 基因的 GenBank 登录号
Table 1 Names of strains and the GenBank accession numbers of 16S rRNA gene

分组 Group	名称 Name	序列号 Accession number	参照菌株 Reference strain	相似度 Identity (%)
A	HH2	KF860135	CP006881.1	99
A	TT1	KF860141	JX126865.1	99
A	GG2	KF860130	KF410851.1	100
A	JX1	KF860137	EU256502.1	99
A	YY1	JX482116	CP006881.1	100
A	YS1	JX489621	JQ308561.1	99
A	SY1	JX489618	GQ861467.1	100
B	FF1	JX489619	JX843447.1	99
B	FF2	JX489622	KC915229.1	99
C	XM1	KF860144	EU661712.1	99
C	ZX1	JX444509	KF601957.1	100
D	AA5	KF860127	AB680477.1	99
D	AA6	KF860128	AB680477.1	99
D	YH7	KF860148	KF254668.1	99
D	HC3	KF860133	JQ936679.1	99
D	YH5	KF860146	KF254668.1	100
E	XL4	KF860143	AB680892.1	99
F	QY2	KF860140	AB680399.1	99
F	YY2	KF860150	KF054925.1	99
F	YH6	KF860147	KF054925.1	99
F	YH8	KF860149	KF054925.1	99

仅为 7.54% (19/264), 但仍有个别菌种对抗生素敏感性较低, 其中 ZX1 和 QY2 对抗生素的敏感性均达到 25% (4/12); F 组芽孢杆菌平均抗生素耐受率为 16.67% (8/48), A 组芽孢杆菌对抗生素最为敏感, 平均耐受率为 1.2% (1/84); 21 株芽孢杆菌对 β 内酰胺类抗生素耐受性最强, 达到 12.70% (8/63), 而氟喹诺酮类抗生素、四环素和大环内脂类抗生素敏感性高, 没有耐药性。具体结果见表 3。

3 讨论

试验利用芽孢杆菌的耐热性将其从肠道菌群中分离, 基于 16S rRNA 基因分类将 21 株芽孢杆菌分为 6 类, 多样性丰富。大熊猫肠道内菌群种类丰富与熊猫食谱复杂有关, 特别是处于断奶期的大熊猫, 断奶前以乳糖作为主要碳水化合物供能, 断奶后以纤维素作为主要碳源, 处于这个时期的大熊猫肠道内环境的变化必然导致体内微生物分布、结构和功能等变化, 从而与环境相适应。芽孢杆菌凭借其能够形成芽孢、抵抗高温和耐酸碱等特殊能力, 表现出极强的环境适应性。21 株芽孢杆菌分布平均, 其中 A 组、D 组和 F 组种类最多, 占所分离芽孢杆菌的 76.19% (16/21), 是大熊猫肠道内环境的优势菌种, 在维持消化道内微生物平衡起重要作用; 成年大熊猫以竹子为生, 对分离得到的 21 株芽孢杆菌进行纤维素分解试验发现, 所有菌株对纤

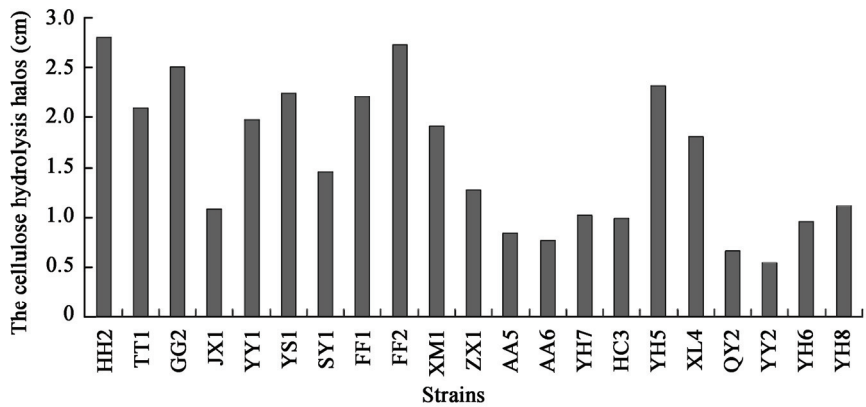


图 2 21 株芽孢杆菌的纤维素水解圈直径

Figure 2 The hydrolyzed circle caused by cellulose degradation of *Bacillus* strains

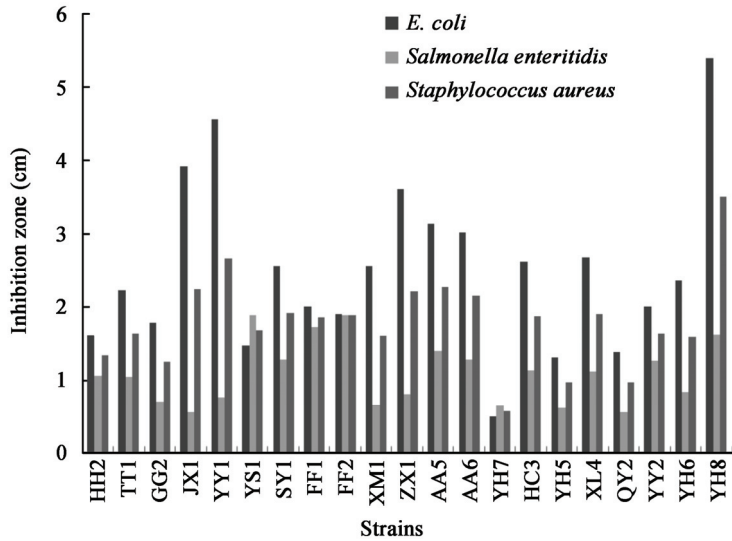


图3 芽孢杆菌菌株的抑菌圈大小
Figure 3 The inhibition zones of *Bacillus* strains

表2 21株芽孢杆菌抗菌肽基因分布
Table 2 Distribution of antimicrobial genes in 21 *Bacillus* spp. strains

分组 Group	菌株 Strains	抗菌基因 Antimicrobial genes					
		<i>tasA</i>	<i>spaS</i>	<i>ituA</i>	<i>hag</i>	<i>srf</i>	<i>mrsA</i>
A	HH2	-	-	-	-	+	-
A	TT1	-	+	-	-	+	-
A	GG2	+	-	-	+	+	-
A	JX1	-	-	+	+	+	-
A	YY1	-	+	+	+	-	+
A	YS1	-	-	-	+	+	-
A	SY1	-	-	-	+	+	-
B	FF1	-	-	+	+	+	-
B	FF2	-	-	+	+	+	-
C	XM1	-	+	-	-	-	+
C	ZX1	-	-	-	+	+	-
D	AA5	-	+	-	+	-	+
D	AA6	-	+	-	+	-	+
D	YH7	-	-	-	+	-	-
D	HC3	-	-	-	-	+	+
D	YH5	+	+	-	+	-	-
E	XL4	-	+	+	+	-	+
F	QY2	-	-	-	+	-	-
F	YY2	+	+	-	+	+	+
F	YH6	-	+	-	+	-	+
F	YH8	+	+	+	+	+	+

注：+：检测阳性；-：阴性。
Note：+：Detection positive；-：Detection negative.

纤维素都有一定的分解能力,其中A组和B组的菌株平均分解能力最强,纤维素水解圈直径分别达到了2.5 cm和2.0 cm;在芽孢杆菌抑菌能力检测中发现,C组、A组和E组中芽孢杆菌对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌3种常见致病菌的抑制能力较强,抑菌圈分别平均达到3.1、2.6和2.7 cm。

由16S rRNA基因分类发现A组细菌是大熊猫肠道内分解纤维素的优势菌种,结合其较强的纤维素消化能力,可以推断A组菌株能消化大熊猫进食的大部分纤维素。各组细菌均具有较强的抑菌能力,且组间抑菌能力差异不大,对致病性大肠杆菌的抑制作用最强而对致病性金黄色葡萄球菌的抑菌能力稍弱。分析各芽孢杆菌的分布、纤维素分解能力和抑菌能力有助于进一步研究大熊猫食性转换期的肠道微生物所发挥的生物学功能,同时,也提示我们可以将其开发为微生态制剂,对处于食性转换期的大熊猫有目的性的加入具有抗菌能力的芽孢杆菌,预防致病菌的威胁。

相对于A、D两组芽孢杆菌较为平均的抑菌能力,F组整体抑菌圈较小,但是YH8和YH6两株芽孢杆菌表现出很强的抑菌能力,YH8对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别达到2.70 cm

表 3 21 株芽孢杆菌的耐药性 Table 3 The drug resistance of 21 <i>Bacillus</i>													
分组 Group	菌株 Strains	利福平 Rifampin	氯霉素 Chloramphenicol	克林霉素 Clindamycin	青霉素 Penicillin	头孢噻肟 Cefotaxime	氨苄西林 Ampicillin	诺氟沙星 Norfloxacin	红霉素 Erythrocin	四环素 Tetracycline	庆大霉素 Gentamicin	阿米卡星 Amikacin	复方新诺明 SMZ
A	HH2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A	TT1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A	GG2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A	JX1	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
A	YY1	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A	YS1	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
A	SY1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	FF1	S	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S
B	FF2	S	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S
C	XM1	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	ZX1	I	S	S	R	R	R	S	S	I	S	S	R
D	AA5	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
D	AA6	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S
D	YH7	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	R
D	HC3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	YH5	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
E	XL4	S	S	R	I	S	R	S	I	S	S	S	S
F	QY2	S	R	R	R	S	R	I	S	I	S	S	S
F	YY2	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	YH6	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
F	YH8	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	R

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药。
Note: S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistance.

和 0.81 cm, YH6 对沙门氏菌的抑菌圈直径达到 2.43 cm, 由此可知, 它们共同参与了大熊猫肠道菌群的稳定。此外, 本研究发现, 微生物的 16S rRNA 基因的同源性可以作为一个指数来预测它们的功能。通过使用统计方法发现, 这些菌株的抗菌能力与他们基于 16S rRNA 基因的分类有一定的关联性。类似的情况也出现在 6 种常见的抗菌基因分布中, 这些基因分布在 3 个集群, 同时基因分布和系统发育之间也有可能存在一些相关性。然而, 统计方法可以只显示了他们之间相关性, 但无法说明具体原因。我们并没有证据来确切证明这些相关性, 还需要更多的试验来探索和识别影响抑菌作用的具体原因或基因。

由于抗生素在大熊猫疾病预防和治疗中发挥着突出作用^[12], 因此被广泛用于大熊猫临床。本试验发现, 分离得到的 21 株芽孢杆菌药物耐受率低, 即普遍对常规抗生素药物敏感, 但依然有个别菌种对抗生素表现出耐药性。Zhang 等^[12]对从大熊猫粪便中分离出的细菌进行药敏试验发现, 32.20% 的菌株对至少 1 种抗生素耐药, 同时耐受 3 种以上抗生素的菌株占 16.95%。Wang 等^[13]对从大熊猫粪便中分离得到的大肠杆菌进行耐药性分析发现 76% 的菌株至少 1 种抗生素耐药, 同时耐受 3 种以上抗生素的菌株占 36%。本次试验中至少对一种抗生素耐药的芽孢杆菌占 42.68%, 介于 Zhang 和 Wang 的研究结果之间, 同时耐受种以上抗生素的菌株占 14.29%, 低于 Zhang 和 Wang 的研究结果, 可能与近几年药物管制严格导致交叉耐药性降低有关。

Zhu 等^[4]对 7 只野生大熊猫、8 只圈养大熊猫肠道菌群宏基因组进行了测定和功能基因分类鉴定, 发现在大熊猫肠道菌群中芽孢杆菌纲(Bacilli)是除梭菌纲(Clostridia)以外的第 2 大菌群, 并检测到编码纤维素酶及半纤维素酶相关基因。过去已报道的大熊猫肠道中分离到的芽孢杆菌有蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌等^[7,14-15]。本试验丰富了大熊猫肠道芽孢杆菌的种类, 而且为研究大熊猫肠道有益微生物奠定了更好基础。

一般来说, 芽孢杆菌不是严格意义上的土壤生物, 相反, 它具有两相的生命周期, 可以从土壤和肠道获取营养物质。此外, 这些细菌还有抑制病原体的生长、改善食物消化率和维持宿主肠道环境中平衡等重要作用^[16-18]。基于这些性质, 一些芽孢杆菌菌株已被用作益生菌的食品添加剂和营养品^[19]。课题组之前的研究^[7]已经发现, 这些菌株中的部分菌株可能具有良好的抗逆性和纤维素分解能力, 具有潜在的益生菌应用价值。

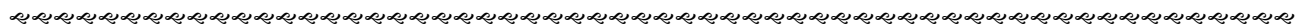
综上所述, 本研究从大熊猫的肠道芽孢杆菌多样性分析了其基于 16S rRNA 基因的系统发育关系, 比较它们对 3 种常见的肠道致病菌的抑制作用, 并检测抗菌基因的分布。结果表明, 芽孢杆菌分泌的抗菌肽可能是其有利于大熊猫肠道健康的作用方式之一, 在今后的研究中, 我们还会对这些菌株基因特性在内的属性进行研究, 以进一步筛选大熊猫中能产生有应用价值的潜在益生菌。

致谢: 粪便采集过程得到四川雅安碧峰峡基地工作人员的帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Zhan XJ, Li M, Zhang ZJ, et al. Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve[J]. *Current Biology*, 2006, 16(12): R451-R452
- [2] Schaller GB, Hu JC, Pan WS, et al. *The Giant Pandas of Wolong*[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1985
- [3] Fang W, Fang Z, Zhou P, et al. Evidence for lignin oxidation by the giant panda fecal microbiome[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50312
- [4] Zhu LF, Wu Q, Dai JY, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(43): 17714-17719
- [5] Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(1): 201-232
- [6] Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(6): 1263-1266
- [7] Zhou XX, He TM, Peng GN, et al. Isolation, identification and resistance analysis of 7 *Bacillus* strains from the intestinal tract of giant panda[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(11): 1115-1121 (in Chinese)
周潇潇, 何廷美, 彭广能, 等. 大熊猫肠道芽孢杆菌的分离鉴定及其抗逆性研究[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(11): 1115-1121
- [8] Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y, et al. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1995, 47(1): 39-47
- [9] Zhang XY, Zhao L, Jiang L, et al. The antimicrobial activity of donkey milk and its microflora changes during storage[J]. *Food*

- Control, 2008, 19(12): 1191-1195
- [10] Gueldner RC, Reilly CC, Pusey PL, et al. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36(2): 366-370
- [11] Li B, Guo LJ, Long M, et al. Isolation and antimicrobial resistance of bacteria from intestinal tract of giant panda[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2014, 33(2): 161-166 (in Chinese) 李蓓, 郭莉娟, 龙梅, 等. 圈养大熊猫肠道微生物分离、鉴定及细菌耐药性研究[J]. 四川动物, 2014, 33(2): 161-166
- [12] Zhang AY, Wang HN, Tian GB, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 Giant pandas[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009, 33(5): 456-460
- [13] Wang X, Yan QG, Xia XD, et al. Serotypes, virulence factors, and antimicrobial susceptibilities of vaginal and fecal isolates of *Escherichia coli* from giant pandas[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(17): 5146-5150
- [14] Fan C, Li SJ, Li CL, et al. Isolation, identification and cellulase production of a cellulolytic bacterium from intestines of giant panda[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(9): 1113-1121 (in Chinese) 樊程, 李双江, 李成磊, 等. 大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1113-1121
- [15] Wu CB, Wu LL, Zhang LL, et al. Characterization of eight *Bacillus thuringiensis* isolates originated from fecal samples of Fuzhou Zoo and Fuzhou Panda Center[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2014, 17(3): 395-397
- [16] Tam NKM, Uyen NQ, Hong HA, et al. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(7): 2692-2700
- [17] Ochoa-Solano JL, Olmos-Soto J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds[J]. Food Microbiology, 2006, 23(6): 519-525
- [18] Roughead Z, Benyacoub J, Roessle C, et al. Nutritional composition for promoting gut microbiota balance and health[P]. Google Patents, 2010
- [19] Cartman ST, la Ragione RM, Woodward MJ. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5254-5258



(上接 p.329)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

- 3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。
- 3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>