



从新疆吉木乃地区冬季泌乳双峰驼中培养的细菌多样性及产酸、产酶活效果

薛杉¹, 侯敏^{2*}, 侯新强², 曹英¹, 杨蓉², 陈钢粮³, 涂德江³, 崔卫东^{2*}

1 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

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

3 新疆旺源生物科技集团有限公司, 新疆 福海 836400

薛杉, 侯敏, 侯新强, 曹英, 杨蓉, 陈钢粮, 涂德江, 崔卫东. 从新疆吉木乃地区冬季泌乳双峰驼中培养的细菌多样性及产酸、产酶活效果. 微生物学报, 2022, 62(9): 3489–3502.

Xue Shan, Hou Min, Hou Xinqiang, Cao Ying, Yang Rong, Chen Gangliang, Tu Dejiang, Cui Weidong. Diversity of culturable bacteria in lactating Bactrian camels in Jimunai area of Xinjiang during winter and the acid- and enzyme-producing activities. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3489–3502.

摘要:【目的】本研究拟通过可培养获得驼源细菌, 分析菌种分布规律, 获得产酸、产酶特性的菌株资源, 为驼源益生菌的开发和利用提供资源和技术支撑。【方法】采用稀释法筛选新疆吉木乃地区冬季养殖双峰泌乳骆驼驼乳、唾液及直肠粪便中的细菌, 通过 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定; 透明圈法对产酸和产酶的菌株进行初筛, 并对菌株产有机酸能力及产淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶活力进行复筛。【结果】共培养出 63 株细菌菌株, 经分子鉴定得知, 从驼粪中分离的 35 株菌以嗜冷杆菌属和不动杆菌属为主; 驼乳中分离出的 21 株菌以假单胞菌属和明串珠菌属为优势菌属; 唾液中分离纯化出 7 株, 主要为芽孢杆菌属; 平板初筛得到产酸菌共有 11 株, 1 株粪源肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) 2F11M 乳酸产量最高, 达到 3.93 mg/mL; 1 株奶源乳酸明串珠菌(*Leuconostoc lactis*) 2N5M 乙酸产量最高, 达到 12.73 mg/mL; 1 株粪源蒙氏肠球菌(*Enterococcus*

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金计划-新疆少数民族科技人才特殊培养(2021D03002); 新疆农业科学院农业科技创新平台能力提升建设专项(重点实验室)(2014211B033); 新疆维吾尔自治区乡村振兴产业发展科技行动项目(2020NC013); 国家地区科学基金(31960681)

Supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation Program-Special Training of Xinjiang Minority Scientific and Technological Talents (2021D03002), by the Xinjiang Academy of Agricultural Sciences Agricultural Science and Technology Innovation Platform Capacity Improvement Project (key Laboratory) (2014211B033), by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Rural Revitalization Industry Development Science and Technology Action Project (2020NC013) and by the National Regional Science Foundation Project (31960681)

*Corresponding author. E-mail: HOU Min, hmde_092@163.com; CUI Weidong, cuwedo@163.com

Received: 15 January 2022; Revised: 11 April 2022; Published online: 31 May 2022

mundtii) 2F17M 丙酸产量最高, 达到 10.36 mg/mL; 根据初筛产透明圈, 产酶菌株主要分离自驼粪和驼奶, 其中产淀粉酶的菌株 17 株, 产纤维素酶的菌株 10 株, 产蛋白酶的菌株 15 株; 1 株奶源的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) Nail 的淀粉酶活性最高, 为 509.07 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 1 株粪源鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*) 2F5N 的纤维素酶活性最高, 为 156.87 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 1 株奶源枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 2N2N 产蛋白酶活性最高, 为 3.59 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。【结论】从新疆泌乳双峰骆驼中筛选出了多种产酸、产酶菌株, 且活力都较好, 具有制备微生态制剂的潜力。

关键词: 双峰泌乳骆驼; 可培养细菌; 产酸; 产酶

Diversity of culturable bacteria in lactating Bactrian camels in Jimunai area of Xinjiang during winter and the acid- and enzyme-producing activities

XUE Shan¹, HOU Min^{2*}, HOU Xinqiang², CAO Ying¹, YANG Rong², CHEN Gangliang³, TU Dejiang³, CUI Weidong^{2*}

¹ College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

² Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Special Environmental Microbiology Laboratory, Urumqi 830091, Xinjiang, China

³ Wangyuan Science and Technology, Fuhai 836400, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] Culturable bacteria were isolated from camel and the distribution of bacteria was analyzed. On this basis, the acid-producing and enzyme-producing bacteria were screened out. This study is expected to provide resource and technical support for the development and utilization of camel-derived probiotics. **[Methods]** Serial dilution-coating method was used to screen bacteria in milk, saliva, and rectal feces of lactating Bactrian camels in Jimunai area of Xinjiang in winter, and the strains were identified by 16S rRNA gene sequencing. Strains producing acid and enzyme were identified with the transparent circle method, and the ability of producing organic acid, amylase, cellulase, and protease was further evaluated. **[Results]** A total of 63 bacterial strains were cultured, with 35 strains from camel feces (mainly *Psychrobacter* and *Acinetobacter*), 21 from camel milk (dominated by *Pseudomonas* and *Leuconostoc*), and 7 from saliva (mainly *Bacillus*). A total of 11 acid-producing strains were screened out, with the feces-derived *Leuconostoc mesenteroides* 2F11M yielding the most lactic acid (up to 3.93 mg/mL), milk-derived *L. lactis* 2N5M achieving the highest acetic acid yield (12.73 mg/mL), and the feces-derived *Enterococcus Mundtii* 2F17M topping the bacteria in propionic acid yield (10.36 mg/mL). According to the transparent circle, the enzyme-producing strains were mainly from camel feces and camel milk. Among them, 17, 10, and 15 strains produced amylase, cellulase, and proteinase, respectively. The milk-derived *Bacillus velezensis* Nail had the highest amylase activity (509.07 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$) and feces-derived *Acinetobacter lwoffii* 2F5N had the highest cellulase activity (156.87 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}$). In addition, milk-derived *B. subtilis* 2N2N achieved the highest protease activity (3.59 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$). **[Conclusion]** A variety of acid-producing

and enzyme-producing strains with high activities were screened from lactating Bactrian camels in Xinjiang, which have the potential for the preparation of microecologies.

Keywords: lactating Bactrian camels; culturable bacteria; acid production; enzyme production

近年来, 新疆大力发展骆驼特色养殖业, 阿勒泰地区作为新疆双峰骆驼主要养殖区, 拥有新疆双峰驼、阿拉善双峰驼和苏尼特双峰驼等种类, 随着人们生产生活的需求, 它们的功能从驮负重物、长途奔袭、产毛供给毛制品工厂加工出售^[1], 衍生到生产驼肉、驼奶等生活消费品。骆驼从生理结构到生活习性不同于牛、马、羊等家畜, 可以在炎热、干旱的极端恶劣条件下生活, 喜食荒漠植被^[2], 是极好的逆境研究材料, 然而其体内益生微生物资源是否丰富, 菌种资源天然活性物质是否值得开发与应用值得深入开展研究。目前, 动物源菌种资源研究尚处于初级阶段, 人们对牛、羊等反刍动物内源微生物研究报道较多, 对骆驼体内菌群的研究主要集中在内蒙古的阿拉善盟地区, 而对新疆阿勒泰地区双峰骆驼研究较少, 对该地区双峰驼驼乳、唾液及直肠微生物的系统发掘和研究更少。

动物肠道微生物多样性丰富, 基于宏基因组测序表明, 冬季乌拉特后旗-牧场里阿拉善双峰驼肠道中细菌占 93.73%, 古菌占 0.80%, 真菌占 0.40%, 且厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)是双峰驼胃肠道中的优势菌群^[3]。正常肠道细菌对宿主具有营养、代谢、拮抗等作用^[4], 特别是分泌的各种酶, 有机酸等对促进营养吸收, 生物代谢有很大的作用, 同时饲用微生态制剂菌株如果筛选自本物种更有利于益生菌在其体内定殖。因此, 对骆驼肠道菌群结构分析及开展菌种产酶产酸的研究, 对微生物资源开发利用有重要意义^[5-7]。

与其他反刍动物相比, 驼乳中的营养成分更丰富, 也更易被人体吸收^[8]。由于骆驼生活在干旱、半干旱地区, 主要采食的是骆驼刺等具有很强的地域性, 在这种特殊的环境下会直接影响骆驼乳中的营养物, 这些不同的营养物质提供了丰富的微生物来源, 所以驼乳和其他原乳一样, 驼奶里的微生物可以促进发酵, 使驼乳产生益生功能, 是筛选具有产蛋白酶、淀粉酶等潜在益生菌的重要来源。反刍动物腮腺分泌大量碱性唾液, 对于维持瘤胃内 pH 偏近中性, 保证其正常消化代谢, 具有重要作用^[9], 目前对骆驼唾液中微生物鲜有报道。

本文以新疆阿勒泰地区双峰泌乳骆驼为研究对象, 通过对骆驼粪便、唾液和驼乳中可培养细菌进行分离鉴定, 对菌株产酸及产酶特性进行研究, 初步明确吉木乃地区冬季驼源可培养细菌组成及功效, 为建立待开发利用的新疆双峰骆驼源益生微生物贮备库提供资源支持, 为后续监测不同季节下骆驼源细菌变化提供实验基础, 为开发新的功能性饲用微生物资源提供研究基础, 具有潜在的实用价值。

1 材料与方法

1.1 样品

冬季新疆阿勒泰地区吉木乃县万驼园(10±2)岁健康双峰泌乳驼直肠粪便、驼乳、唾液。

1.2 培养基和试剂

营养琼脂培养基(NA, g/L): 蛋白胨 10, 牛肉粉 3, 氯化钠 5, 琼脂 15, 蒸馏水 1 L; 营养肉汤培养基(NB, g/L): 蛋白胨 10, 牛肉浸出

粉 3, 氯化钠 5, 蒸馏水 1 L; 乳酸细菌固体培养基(MRS, g/L): 蛋白胨 10, 牛肉粉 8, 酵母粉 4, 葡萄糖 20, 磷酸氢二钾 2, 柠檬酸氢二铵 2, 乙酸钠 5, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.04, 琼脂 14, 吐温 80 1, 蒸馏水 1 L; 乳酸细菌肉汤培养基(MRS 肉汤, g/L): 蛋白胨 10, 牛肉粉 8, 酵母粉 4, 葡萄糖 20, 磷酸氢二钾 2, 柠檬酸氢二铵 2, 乙酸钠 5, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.04, 吐温 80 1, 蒸馏水 1 L; 蛋白酶选择培养基(g/L): 脱脂奶粉 90, 蛋白胨 10, 牛肉粉 3, 氯化钠 5, 琼脂 15, 蒸馏水 1 L; 纤维素酶选择培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 2, 蛋白胨 10, 牛肉粉 3, 氯化钠 5, 琼脂 15, 蒸馏水 1 L; 淀粉酶选择培养基(g/L): 可溶性淀粉 10, 蛋白胨 10, 牛肉粉 3, 氯化钠 5, 琼脂 15, 蒸馏水 1 L; 产酸培养基(g/L): 溴甲酚紫 0.05, 蛋白胨 10, 牛肉粉 8, 酵母粉 4, 葡萄糖 20, 磷酸氢二钾 2, 柠檬酸氢二铵 2, 乙酸钠 5, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.04, 琼脂 14, 吐温 80 1, 蒸馏水 1 L, pH 7.0。

1.3 主要仪器和试剂

摇床: BSD-YX3200 型, 上海博迅医疗生物仪器公司; 恒温培养箱: ZWY 型, 上海福玛实验设备有限公司; 离心机: Presoo17 型, 上海博迅医疗生物仪器公司; 蒸汽灭菌锅: YXQ-LS-75SII型, 上海博迅医疗生物仪器公司; PCR 扩增仪: TC-XP 型, 杭州博日科技有限公司。羧甲基纤维素钠、刚果红、可溶性淀粉、碘化钾、碘、氯化钠: 分析纯, 天津致远化学试剂有限公司。脱脂奶粉: 购自新疆友好超市。

1.4 细菌菌株的分离鉴定

1.4.1 取样

取骆驼的新鲜粪便、唾液和驼乳, 4 °C 保存。

1.4.2 分离纯化

分别称取 10 g 粪便和唾液样品于 100 mL 无菌水中, 混匀, 依次梯度稀释 10^{-2} – 10^{-7} , 吸

取 0.1 mL 稀释液分别涂布在 NA 和 MRS 固体培养基上。驼乳同上, 吸取 10 mL 驼乳于 90 mL 无菌水中, 梯度稀释 10^{-2} – 10^{-7} 后, 涂布平板, 每个稀释度做 3 个重复。将平板放置在 35 °C 恒温培养箱中培养, 根据菌落形态、大小、颜色等表观特征挑取单菌落, 划线分离纯化 3 次后, 直至获得纯细菌培养物。

1.4.3 形态鉴定

观察并记录单菌落的大小、颜色、透明度、边缘特征、湿润度、气味、菌落凸起或凹陷等特征。

1.5 16S rRNA 基因测序及系统多样性分析

细菌基因组提取按 DNA 提取试剂盒的操作进行, 采用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3' 来扩增 16S rRNA 序列, PCR 反应体系: 1×Taq PCR Green Mix 预混液 25 μL, 引物 27F 和 1492R (10 μmol/L) 各 1 μL, ddH₂O 23 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min^[10]。结束后用 2.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物, 将产物送至上海生工检测, 扩增产物测序结果在 EzBioCloud 中与典型菌种进行比对, 选取与分离菌株相似度最高的标准株。

将细菌种类作为数量测度, 引入生态学多样性测度 Shannon-Wiener (H'), Simpson 优势度指数 (D) 来分析菌群的多样性^[11]。Shannon-Wiener 多样性指数 $H' = \sum P_i \ln P_i$; Simpson 优势度指数 $D = 1 / \sum P_i^2$, 式中, P_i 为此物种占该试验中总个体数比例^[12]。

1.6 产酸菌株的筛选

1.6.1 菌株筛选

将分离纯化的菌株在产酸培养基平板上划线, 35 °C 培养 24 h, 观察平板产酸情况。

1.6.2 有机酸含量测定

通过 HPLC 测定。乳酸、乙酸测定条件:

(1) 流动相的配制: 800 mL 水加 1.56 g 磷酸二氢钠混匀。用磷酸调节 pH 至 4–5, 最后加入 16 mL 甲醇。安装好色谱柱, 在方法组中设置进样量 10 μ L, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 走样时间为 30 min, 紫外检测波长为 214 nm, 设置完成保存方法组。(2) 用流动相过柱子, 待基线稳定后开始加样。丙酸测定条件: (1) 流动相: 1 000 mL 水+136 μ L 硫酸, 流速 0.6 mL/min, 柱温 55 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。(2) 用流动相过柱子, 待基线稳定后开始加样。

1.7 产酶菌的筛选及酶活测定

1.7.1 产蛋白酶菌株筛选

将分离纯化菌株点接到产蛋白酶固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 直接观察透明圈。

1.7.2 产纤维素酶菌株筛选

将分离纯化菌株点接到产纤维素酶固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 用 0.5% 刚果红染色 1 h, 1 mol/L 氯化钠脱色 2 h, 冲洗后观察透明圈。

1.7.3 产淀粉酶菌株筛选

将分离纯化菌株点接到产淀粉酶固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 碘液染色观察。

1.7.4 酶活测定

用接种环挑取产酶菌株至相应液体培养基中, 在 35 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 24 h, 于 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心, 上清液即为粗酶液, 后对粗酶液测酶活性。淀粉酶活: 淀粉水解酶催化淀粉水解生成还原糖, 还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质, 在 540 nm 有吸收峰, 通过测定 540 nm 处吸光度增加速率, 计算淀粉酶活性。纤维素酶活: 采用蒽酮比色法测定纤维素酶催化羧甲基纤维素钠降解产生的还原糖的含量。蛋白酶活: 蛋白酶水解酪蛋白生成酪氨酸, 在碱性条件下, 酪氨酸还原磷钨酸

生成钨蓝, 钨蓝在 680 nm 处有特征吸收峰, 测定 680 nm 处吸光度增加速率, 计算蛋白酶活性。

2 结果与分析

2.1 驼源菌群的分离鉴定

2.1.1 形态鉴定

样品稀释、涂布平板后 35 $^{\circ}$ C 培养 24–48 h, 根据菌落形态、湿润度、是否凸起、是否产色素等特征, 共分离获得 63 株菌株。从驼粪中分离出 35 株菌株, 菌落主要呈灰白色、光滑湿润, 圆形, 其中有 16 株来自 MRS 培养基, 有 19 株来自 NA 培养基。从驼乳中分离出 21 株菌株, 其中 16 株来自 NA 培养基, 5 株来自 MRS 培养基, 菌落以白色偏黄, 圆形隆起, 较湿润者居多。用 NA 培养基从唾液中分离出 7 株菌株, 菌落以灰白色, 不透明, 圆形为主。

2.1.2 根据 16S rRNA 序列同源性对分离菌株的鉴定结果

将 63 株菌基因序列与 EzBioCloud 中模式菌株的基因序列进行比对, 结果表明(表 1, 图 1), 筛选菌株与数据库中的模式菌株具有高度相似性, 相似度均在 98.70%–100.00%, 分属于 12 个属。

骆驼粪源微生物中, 共筛出 35 株菌, 主要是集中在变形菌门(*Proteobacteria*), 占 51%。分属于 9 个属, 菌种数量排名前列的是不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*), 分别占 28% 和 17%。其余 7 个属分别是芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)和食酸菌属(*Acidovorax*)。驼乳中分离出 21 株菌, 门水平上, 丰度最高为变形菌门(*Proteobacteria*), 占 57%。属水平上, 分离出 5 种不同菌属, 占

表 1 驼源菌株 16S rRNA 基因序列分析

Table 1 The closest relatives of the bacterial strains camel based on 16S rRNA gene sequence homology

Strains	Closest species	GenBank accession No.	Similarity/%	Sources
F10431	<i>Bacillus subtilis</i>	MW721260	100.00	Dung
Fen3	<i>Bacillus mojavensis</i>	MW721276	99.93	Dung
Fen4	<i>Bacillus tequilensis</i>	MW721275	99.93	Dung
Nai1	<i>Bacillus velezensis</i>	MW721264	99.50	Milk
2N2N	<i>Bacillus subtilis</i>	OL989244	99.93	Milk
2N13N	<i>Bacillus subtilis</i>	MW721308	99.93	Milk
Kou2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MW721273	100.00	Saliva
Kou7	<i>Bacillus halotolerans</i>	MW751269	99.93	Saliva
Kou10	<i>Bacillus halotolerans</i>	MW721268	100.00	Saliva
2F6N	<i>Pseudomonas nitrititolerans</i>	MW721284	100.00	Dung
2F15N	<i>Pseudomonas litoralis</i>	MW721294	99.70	Dung
Nai2	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MW721265	99.90	Milk
Nai3	<i>Pseudomonas atacamensis</i>	MW721266	99.57	Milk
Nai4	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MW721267	99.36	Milk
2N1N	<i>Pseudomonas cedrina</i>	OL989243	100.00	Milk
2N3N	<i>Pseudomonas cedrina</i>	MW721299	99.85	Milk
2N4N	<i>Pseudomonas lundensis</i>	MW721301	100.00	Milk
2N5N	<i>Pseudomonas salomonii</i>	OL989241	99.80	Milk
2N7N	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	MW721304	99.93	Milk
2N10N	<i>Pseudomonas cedrina</i>	MW721305	100.00	Milk
2F8M	<i>Leuconostoc inhae</i>	MW721286	100.00	Dung
2F11M	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MW721288	99.97	Dung
2N1M	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MW721297	100.00	Milk
2N3M	<i>Leuconostoc citreum</i>	MW721298	99.93	Milk
2N4M	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MW721300	99.98	Milk
2N5M	<i>Leuconostoc lactis</i>	MW721302	99.97	Milk
2N11N	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MW721306	99.93	Milk
2N12N	<i>Leuconostoc fallax</i>	MW721307	99.93	Milk
F10432	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i>	MW721261	99.93	Dung
2F1M	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OM135602	99.92	Dung
2F1N	<i>Prolinoborus fasciculus</i>	MW721278	99.90	Dung
2F2M	<i>Acinetobacter albensis</i>	MW721279	99.93	Dung
2F3M	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i>	MW721280	98.94	Dung
2F5N	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	OL989242	99.97	Dung
2F7M	<i>Acinetobacter gandensis</i>	MW721285	99.95	Dung
2F7N	<i>Prolinoborus fasciculus</i>	OM169345	100.00	Dung
2F9N	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i>	MW721287	98.94	Dung
2F13M	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	MW721291	100.00	Dung
2N6N	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	MW721303	99.55	Milk
F10435	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	MW721263	99.78	Dung
2F3N	<i>Psychrobacter faecalis</i>	MW721281	99.85	Dung
2F4N	<i>Psychrobacter alimentarius</i>	MW721282	100.00	Dung

(待续)

续表 1

2F11N	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	OM135574	98.96	Dung
2F12N	<i>Psychrobacter immobilis</i>	MW721290	99.95	Dung
2F19N	<i>Psychrobacter maritimus</i>	MW721296	99.85	Dung
2F5M	<i>Escherichia coli</i>	MW721283	100.00	Dung
2F6M	<i>Shigella flexneri</i>	OM049750	99.96	Dung
2F14M	<i>Escherichia coli</i>	MW721292	99.70	Dung
2F16N	<i>Escherichia fergusonii</i>	OM131733	99.98	Dung
2F18N	<i>Escherichia coli</i>	MW721295	100.00	Dung
2F12M	<i>Shigella sonnei</i>	MW721289	100.00	Dung
Fen1	<i>Enterococcus faecalis</i>	MW721277	100.00	Dung
2F9M	<i>Enterococcus lactis</i>	OM049751	99.95	Dung
2F17M	<i>Enterococcus mundtii</i>	OM049752	99.96	Dung
Kou3	<i>Enterococcus hulanensis</i>	MW721272	100.00	Saliva
2F10N	<i>Arthrobacter luteolus</i>	OL989240	99.13	Dung
2F15M	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	MW721293	99.40	Dung
Kou1	<i>Priestia megaterium</i>	MW721274	99.93	Saliva
Kou6	<i>Priestia filamentosa</i>	MW721270	100.00	Saliva
2N2M	<i>Serratia bozhouensis</i>	OM132207	99.96	Milk
2N8N	<i>Serratia liquefaciens</i>	OM131728	100.00	Milk
F10433	<i>Acidovorax antarcticus</i>	MW721262	99.48	Dung
Kou4	<i>Streptococcus equinus</i>	MW721271	100.00	Saliva

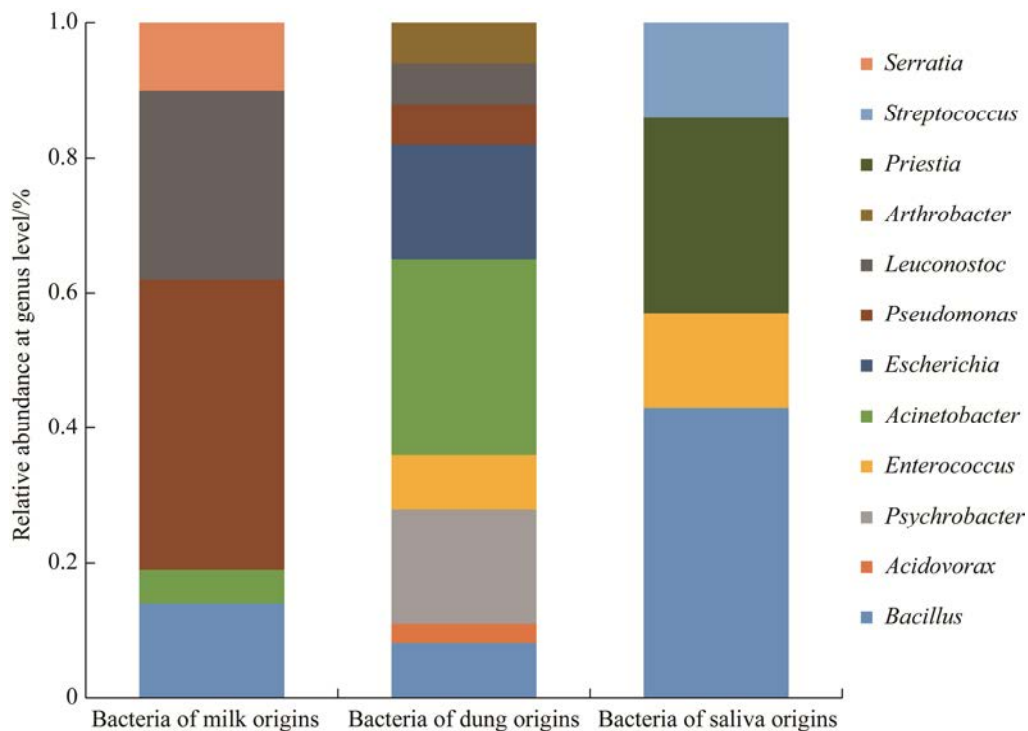


图 1 驼源菌群属水平相对丰度

Figure 1 Relative abundance at genus level of bacteria from camels.

比较高的是假单胞菌属(*Pseudomonas*)和明串珠菌属(*Leuconostoc*), 分别占 43%和 28%, 另外 3 种是芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)。从骆驼唾液中筛选的菌株中, 厚壁菌门(*Firmicutes*)占主导, 达到 71%。属水平上, 分离出 4 种菌属, 分别是芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)及 *Priestia*, 与标准菌株的匹配度都达到 99.9%。

结果显示, 不同来源的细菌种群结构有所差异, 芽孢杆菌属分布最广, 在粪便、驼乳和唾液中均有发现, 其占所筛细菌总数的 14%。另外, 还筛选到专属性的菌株, *Acidovorax*、*Escherichia*、*Arthrobacter*、*Psychrobacter* 只分离自驼粪, *Serratia* 仅分离自驼乳样品中, *Streptococcus*、*Priestia* 仅分离自唾液中。从菌群结构多样性分析, 驼粪、驼乳和唾液中菌株分别属于 9 个、5 个和 4 个不同菌属, 其 Shannon-Wiener 多样性指数分别为 1.976、1.368 和 1.277, 表现出粪源菌 > 乳源菌 > 唾液源菌; Simpson 优势度指数分别为 0.834、0.703 和 0.694, 表现出粪源菌 > 乳源菌 > 唾液源菌, 说明驼粪中细菌种群丰富度最高, 分布较均匀; 唾液中细菌优势菌群集中, 种群丰富度低。

2.2 产酸菌株的筛选与产酸能力测定

利用溴甲酚紫作为指示剂, 产酸菌释放的酸致使 pH 降低而呈黄色, 见图 2。观察平板颜色变化, 得出产酸菌共有 11 株, 分别是 Kou3、2N1M、2N5M、2F5M、2F6M、2F8M、2F9M、2F11M、2F12M、2F14M、2F17M。主要为肠球菌属(*Enterococcus*), 不动杆菌属(*Acinetobacter*)和明串珠菌属(*Leuconostoc*)。

由图 3 可知, 分离出 11 株产酸菌, 乳酸产量最高的是肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 2F11M, 达到了 3.93 mg/mL; 乙酸产量最高的是乳酸明串珠菌(*Leuconostoc lactis*)

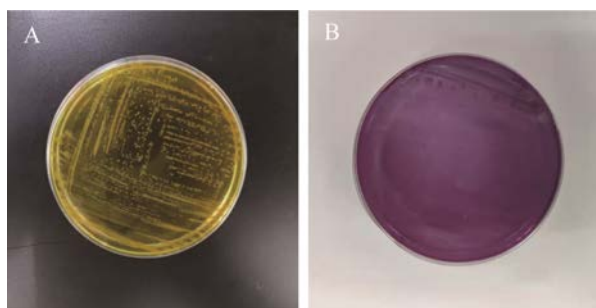


图 2 平板颜色变化

Figure 2 Color change of the plate. A: acid producing strains; B: non acid producing strains.

2N5M, 达到了 12.73 mg/mL; 丙酸产量最高的是蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*) 2F17M, 产量达到了 10.36 mg/mL。其中有 8 株分离自驼粪, 肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) 2F11M 和乳酸肠球菌 (*Enterococcus lactis*) 2F9M 乳酸含量均大于 2.50 mg/mL, 乙酸含量均大于 10.00 mg/mL, 产量都较高, 具有成为益生菌的潜力。

2.3 产酶菌的筛选与测定

2.3.1 产酶菌的初筛

分离的 63 株驼源细菌, 经淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶活性初筛, 共有 25 株产酶菌, 结果见表 2。其中驼粪筛选出 7 株产淀粉酶菌, 占总骆驼粪源菌总数的 20%; 5 株产纤维素酶菌, 占粪源菌的 14%; 3 株产蛋白酶菌, 占骆驼粪便筛菌总数的 9%; 能同时产两种以上酶的细菌有 2 株, 为 F10431 和 2F16N, 以产纤维素酶为主。驼乳中分离出 10 株产淀粉酶菌, 占骆驼奶源菌总数的 48%; 5 株产纤维素酶菌, 占奶源菌的 24%; 12 株产蛋白酶菌, 占驼奶筛菌总数的 57%; 能同时产两种以上酶的细菌有 9 株, 以产淀粉酶和蛋白酶为主。奶源细菌中产酶菌占比较高, 体现了驼乳中丰富的产酶菌种资源。唾液中并没有分离出产酶菌。综上所述, 能同时产淀粉酶、纤维素酶及蛋白酶的菌株有 6 株, 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)有 4 株, 是产酶的主要贡献者。

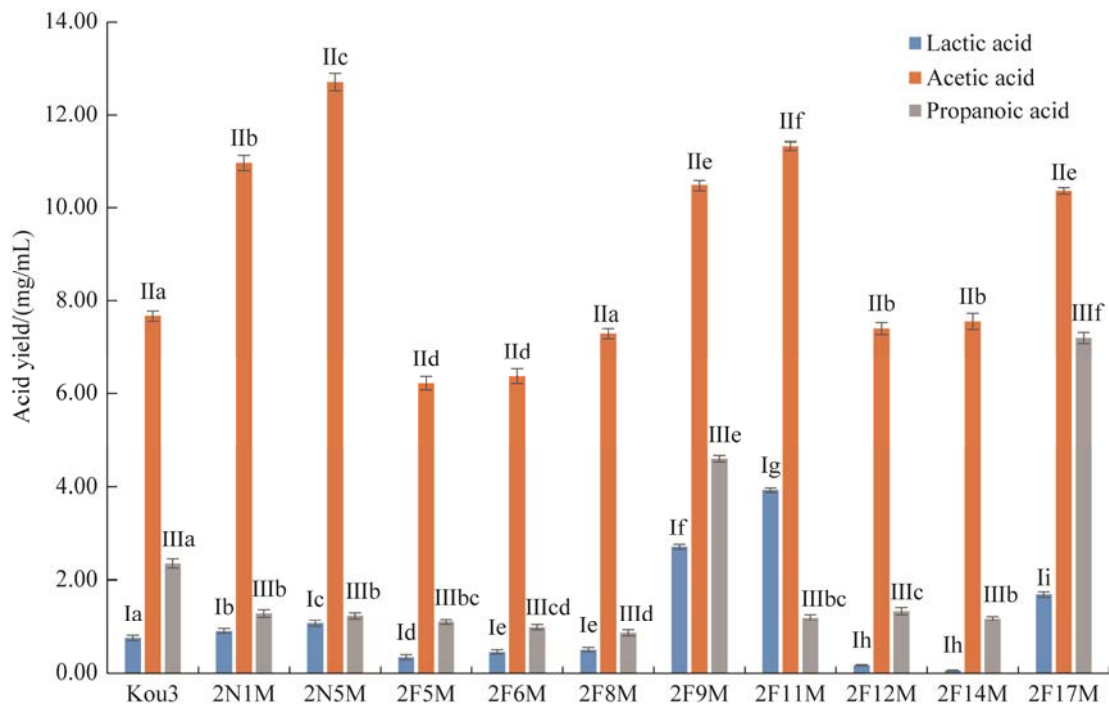


图3 分离产酸菌产乳酸、乙酸、丙酸测定结果

Figure 3 Determination results of lactic acid, acetic acid and propionic acid produced by isolated acid-producing bacteria. I: lactic acid; II: acetic acid; III: propionic acid. The different lowercase letter means significant difference ($P < 0.05$).

2.3.2 产酶活性的测定

综合淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶定性筛选结果,对产酶菌酶活性进行测定,见表2。产淀粉酶菌主要分离自驼乳,占产淀粉酶菌株总数的58.8%,奶源产淀粉酶菌平均酶活为449.93 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,远远大于粪源产淀粉酶菌的平均酶活417.67 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。其中奶源菌贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) Nai1和假单胞菌(*Pseudomonas atacamensis*) Nai3的淀粉酶活性最强,分别为509.07 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 、495.69 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,淀粉酶活性大于450.00 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 有6株,5株来自奶源,表明驼乳在消化和发酵方面具有较强的益生作用。本研究中产淀粉酶菌株主要是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*),目前应用的淀粉酶主要集

中在栖热菌属(*Thermus*)、芽孢杆菌属和噬纤维菌属(*Cytophaga*)^[13],而本研究扩展了产淀粉酶菌株在分类学中的范围。

从驼粪和驼乳中分离出的产纤维素酶菌数目相同,但粪源产纤维素酶菌平均酶活为151.71 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,奶源产纤维素酶菌平均酶活为141.54 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。其中粪源鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*) 2F5N和粪源小束噬脯氨酸菌(*Prolinoborus fasciculus*) 2F7N的纤维素酶活性最强,分别为156.87 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 、153.79 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。产纤维素酶菌主要菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*),占40%。纤维素酶活性大于145.00 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 的菌株有6株,其中5株来自驼粪,证明了骆驼肠道具有较强的自产纤维素酶的能力,这与骆驼以高纤维的饲草为食有很大关系。

产蛋白酶菌主要分离自驼乳，占总产蛋白酶菌的 80%，其蛋白酶平均活性为 2.75 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ ，驼粪中产蛋白酶菌株平均活性为 2.17 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。产蛋白酶菌主要是假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)，分别占 53%和 33%。其中产蛋白酶活性最强的 2 株菌是奶源枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 2N2N 和奶源液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*) 2N8N，分

别为 3.59 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ ，3.24 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$ 。

综上所述，产淀粉酶和产蛋白酶菌主要筛选自驼乳，菌群丰富且活力较高，而在驼粪中筛选出的产纤维素酶菌相对与驼乳中有较高的酶活力。同时能产 3 种酶的 3 株枯草芽孢杆菌 F10431，2N2N 和 2N13N，其产酶效果都比较好，符合国家《饲用添加剂目录(2013)》，具有微生态制剂的潜力。

表 2 驼源产酶菌含酶活性

Table 2 Enzyme activity of camel-derived enzyme-producing bacteria

Strains	Protease [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$]	Amylase [$\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$]	Cellulase [$(\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL}))$]
Nai1	2.49	509.07	132.30
Nai2	2.01	457.49	139.67
Nai3	2.65	495.69	—
Nai4	1.86	461.03	139.89
F10431	2.17	475.54	151.02
Fen4	2.41	—	—
2N1N	2.69	—	—
2N2N	3.59	435.88	143.87
2N3N	3.12	420.89	—
2N5N	2.73	—	—
2N7N	2.96	449.43	—
2N8N	3.24	423.47	—
2N10N	2.96	—	—
2N13N	2.73	388.65	151.95
2F10N	1.94	—	—
2N6N	—	457.65	—
F10432	—	420.09	—
2F6N	—	443.30	—
2F9N	—	391.23	—
2F15N	—	375.11	—
2F16N	—	395.26	149.89
2F18N	—	423.15	—
2F5N	—	—	156.87
2F7N	—	—	153.79
2F19N	—	—	146.99
AM	2.75	449.93	141.54
AF	2.17	417.67	151.71
PM	80.0%	58.8%	50.0%
PF	20.0%	41.2%	50.0%

—: no activity; AM: average enzyme activity of bacteria in milk source; AF: average enzyme activity of bacteria in fecal source; PM: proportion of milk-derived bacteria; PF: proportion of fecal bacteria.

3 讨论与结论

目前少有报道相关驼源纯培养细菌的研究, 由于骆驼的生存环境具有很强的地域性, 生存环境和饮食结构的差异导致其微生物资源的多样性。本研究的目的是通过常规培养方式筛选驼源细菌, 然后进行产酶、产酸的研究, 从而获得天然易培养、开发、利用的菌株。本研究以新疆阿勒泰吉木乃地区冬季双峰泌乳驼为研究对象, 通过形态学观察, 16S rRNA 分子鉴定得到培养细菌 63 株, 驼粪分离出 35 株, 其中门水平以变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为主导, 属水平以不动杆菌(*Acinetobacter*)和嗜冷杆菌(*Psychrobacter*)为主, 这与阿拉伯单峰驼研究机构得出的结论相似^[14]; Samsudin 等测得单峰驼肠道微生物主要以拟杆菌门(*Bacteroidia*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为主^[15], 这可能由于其不同品种、居住环境和饮食结构造成; 何静^[3]研究表明双峰驼大肠和粪便微生物具有高度相似性, 但不同部位的肠道微生物可能存在差异^[16]。肠道微生物群落的多样性以及优势菌属在双峰驼胃肠道中有助于分解复杂的植物, 如牛、羊不吃的多刺和高盐碱植物^[17], 有助于其适应新疆北部严寒的自然环境, 因此, 可以看到肠道微生物对双峰驼植食和环境的高度适应性。在驼乳中, 筛选出的主要菌属为假单胞菌属(*Pseudomonas*)和明珠串菌属(*Leuconostoc*), 表明鲜驼乳中也有丰富的乳酸菌。张苗苗等^[18]从新疆哈密地区 9 份原驼乳中筛选出了 65 株乳酸菌, 其中明珠串菌属(*Leuconostoc*)占 35%, 是原驼乳样品中的优势属, 乳明珠串菌(*Leuconostoc lactis*) (26%) 是优势菌种, 与本研究结果吻合。驼乳中有食源性致病菌和环境污染菌, 在张敏等^[19]和 Oliver 等^[20]的研究报道中也出现过, 原乳中的微生物一般是来自不同骆驼的乳房表皮、不同的牧场

和挤奶环境、与奶直接接触的挤奶工人和容器^[21]。唾液中分离的菌株以厚壁菌门(*Firmicutes*)为主, 属水平以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主。由于骆驼腮腺分泌大量碱性唾液, 能维持瘤胃内 pH 偏近中酸性, 保证其正常消化代谢, 因此确定唾液中的菌群结构对分析骆驼饮食消化有重要意义。微生物的多样性是衡量一个稳定微生态环境的重要指标之一, 粪源菌群的 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数最大, 唾液源菌群最小, 这是由于唾液中高碱环境, 细菌优势菌属集中, 主要集中在芽孢杆菌属, 而肠道环境更为复杂, 所以粪源菌群表现出更高的多样性, 物种丰富度更高。

在产酸试验中, 筛选出了 11 株产酸菌, 其中粪便中筛选出 8 株, 以明珠串菌属(*Leuconostoc*)为主, 占所筛产酸菌总数的 72%。同时在驼乳中发现了 2 株产酸菌, 为明珠串菌属(*Leuconostoc*)。唾液中筛的 1 株产酸菌为肠球菌属(*Enterococcus*)。代谢的短链脂肪酸以乙酸为主, 且所筛产酸菌的产乙酸含量均大于 6.00 mg/mL。李阳^[22]对生料醋醅中优势产酸菌进行优化后, 乳酸、乙酸含量分别达到 4.77 mg/mL 和 13.01 mg/mL, 肠膜明珠串菌 2F11M 与其相比产酸能力相差不明显, 表明其巨大产酸潜力。动物体内乙酸、丙酸等短链脂肪酸来源有两途径, 一是来自食物, 二是来自微生物对碳水化合物的代谢分解^[23]。短链脂肪酸可以调节肠道环境的 pH, 大多数研究表明有机酸是抑制病原微生物生长的重要因素^[24-25], 同时短链脂肪酸的产生能促进肠道蠕动, 减少营养物质在小肠内留存的时间, 提高营养物质的转运速度^[26-28], 因此, 其对于提高骆驼免疫力和消化能力具有重要意义。

本研究中, 共筛选出 25 株产酶菌, 分属于 9 个属。产淀粉酶菌株和产蛋白酶菌株主要筛选自驼乳, 占总产酶菌数的 58.8%和 80.0%, 且酶活

力较粪源菌更强, 驼乳中产蛋白酶菌平均酶活为 $2.75 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 产淀粉酶菌平均酶活为 $449.93 \mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 宋梦思等^[29]在对虾肠道中分离产蛋白酶菌的最大活力为 $2.5 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 邹建威^[30]在岩扇贝肠道中分离产酶菌 YN-1-1 最高淀粉酶活性仅为 $438.00 \mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 唐丽江等^[31]选用 10 株芽孢杆菌进行产淀粉酶能力测定, 其中 9 株具有产淀粉酶的能力, 该 9 株菌淀粉酶活最高为 $313.3 \mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 最低酶活为 $3.7 \mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, 体现所分离产酶菌具有优良的产酶潜力, 其中菌株 Nai1 和 2N2N 表现突出。淀粉酶和蛋白酶可以将乳中的糖类和蛋白质分解成小分子物质, 有助于人体对其营养的吸收, 同时, 分解的蛋白质也用于微生物自身的蛋白需求, 导致驼乳中细菌快速滋生。驼粪和驼乳中筛选的产纤维素酶菌株数相同, 但粪源产纤维素酶菌的平均酶活比奶源产纤维素酶活高 $10.17 \mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{mL})$, Gharechahi^[32]等研究表明由于骆驼以其他反刍动物难以消化的天然植物为食, 其肠道微生物组成和主要纤维素分解细菌的产酶能力与牛肠道中的相比表现出明显差异, 体现在纤维素分解细菌的显著富集, 为宿主提供了在不易消化的食物中生存的极好能力。同时产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶的有 6 株菌, 芽孢杆菌属占了 4 种, 是产酶的主要贡献者, 其中枯草芽孢杆菌 F10431、2N2N 的综合产酶能力突出。基于微生态理论, 一般动物都缺乏完整的酶系统, 而正是有了体内这些细菌分泌大量的酶, 才能保证骆驼能在恶劣的环境中, 从营养匮乏甚至带有毒性的植物中获取营养, 维持生存^[33]。且近些年, 养殖生产中所用的产酶菌株大多分离自土壤, 由于益生菌肠道定殖具有种属特异性, 筛选驼源产酶菌可为骆驼养殖提供更好的选择。

新疆阿勒泰吉木乃地区双峰骆驼, 由于其

特殊的生存和饮食环境, 对骆驼源菌群结构研究甚少。研究明确了驼源可培养细菌的分布结构, 并挖掘驼源产酸、产酶特性的微生物资源, 为驼源可培养益生菌的开发利用提供了理论支持。

参考文献

- [1] 萨仁图娅, 斯仁达来, 付龙霞, 刘强德, 吉日木图. 中国双峰驼种质资源保护调查研究. *中国草食动物科学*, 2015, 35(6): 62–65, 78.
Sa R, Si R, Fu LX, Liu QD, Ji R. Investigation and study on the protection of Bactrian camel germplasm resources in China. *China Herbivore Science*, 2015, 35(6): 62–65, 78. (in Chinese)
- [2] Gupta L. Feeds and feeding of *Dromedary Camels*: a review. *Journal of Camel Practice and Research*, 2021, 28(3): 249–263.
- [3] 何静. 双峰驼肠道微生态特征及纤维素分解菌的研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2019.
- [4] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431–438.
- [5] 陈群, 鲍大鹏. 人及动物胃肠道正常微生物群的研究. *安徽农业技术师范学院学报*, 1999, 13(4): 39–42.
Chen Q, Bao DP. Study on normal microflora of human and animal gastrointestinal tract. *Journal of Anhui Agrotechnical*, 1999, 13(4): 39–42. (in Chinese)
- [6] 高绘菊, 路国兵, 查传勇, 刘敬瑞, 牟志美. 家蚕肠道产酶菌的分离与筛选. *蚕业科学*, 2007, 33(2): 228–233.
Gao HJ, Lu GB, Zha CY, Liu JR, Mu ZM. Isolation and screening of the enzyme-producing bacteria in the intestine of silkworm. *Science of Sericulture*, 2007, 33(2): 228–233. (in Chinese)
- [7] 黄永春, 蔡葆青, 林祥日. 微生态制剂在水产饲料中应用的前景. *台湾海峡*, 1998, 17(S1): 100–104.
Huang YC, Cai BQ, Lin XR. Application of microbiological ecological agents in aquaculture feed. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1998, 17(S1): 100–104. (in Chinese)
- [8] Alebie G, Yohannes S, Worku A. Therapeutic applications of camel's milk and urine against cancer: current development efforts and future perspectives. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 9(5): 1–11.

- [9] 姜兰. 饲料对家畜唾液分泌的影响. 畜牧兽医杂志, 2019, 38(6): 65–66.
Jiang L. Effect of feed on saliva secretion in livestock. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2019, 38(6): 65–66. (in Chinese)
- [10] 曹林青, 詹发强, 高宇洁, 侯新强, 包慧芳, 侯敏, 杨蓉, 王宁, 龙宣杞. 嗜线虫致病杆菌抑制灰葡萄孢的效应. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4123–4133.
Cao LQ, Zhan FQ, Gao YJ, Hou XQ, Bao HF, Hou M, Yang R, Wang N, Long XQ. The inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophilus* on *Botrytis cinerea*. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4123–4133. (in Chinese)
- [11] 孙海新, 刘训理. 茶树根际微生物研究. 生态学报, 2004, 24(7): 1353–1357.
Sun HX, Liu XL. Microbes studies of tea rhizosphere. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(7): 1353–1357. (in Chinese)
- [12] 刘学周, 赵智灵, 李绍宾, 张连学, 田义新, 孙福仁. 西洋参内生菌群落结构与多样性. 微生物学报, 2015, 55(3): 330–340.
Liu XZ, Zhao ZL, Li SB, Zhang LX, Tian YX, Sun FR. The community structure and diversity of the endophytes in American ginseng. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 330–340. (in Chinese)
- [13] 刘荷, 樊林, 程金莲, 肖建青, 钟小娟, 余冰, 李洪军, 刘祝祥, 陈义光. 发酵车间空气源细菌淀粉酶产生菌筛选及多样性分析. 微生物学杂志, 2015, 35(3): 36–42.
Liu H, Fan L, Cheng JL, Xiao JQ, Zhong XJ, Yu B, Li HJ, Liu ZX, Chen YG. Screening & biodiversity of air borne amylase-producing strains from a liquor fermentation workshop. *Journal of Microbiology*, 2015, 35(3): 36–42. (in Chinese)
- [14] Delbès C, Ali-Mandjee L, Montel MC. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(6): 82–91.
- [15] Samsudin AA, Evans PN, Wright ADG, Al Jassim R. Molecular diversity of the foregut bacteria community in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Environmental Microbiology*, 2011, 13(11): 3024–3035.
- [16] Choi JH, Kim GB, Cha CJ. Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 2014, 93(8): 1942–1950.
- [17] Kayouli C, Jouany JP, Demeyer DI, Taoueb H, Dardillat C. Comparative studies on the degradation and mean retention time of solid and liquid phases in the forestomachs of dromedaries and sheep fed on low-quality roughages from Tunisia. *Animal Feed Science and Technology*, 1993, 40(4): 11–16.
- [18] 张苗苗, 倪永清. 新疆哈密地区原驼乳中乳酸菌多样性分析. 安徽农业科学, 2019, 47(15): 163–166, 182.
Zhang MM, Ni YQ. Biodiversity of lactic acid bacteria isolated from camel milk of Hami area in Xinjiang. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(15): 163–166, 182. (in Chinese)
- [19] 张敏, 张艳, 黄丽丽, 刘忆冬, 周红, 倪永清. 基于16S rDNA高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性. 食品科学, 2017, 38(20): 27–33.
Zhang M, Zhang Y, Huang LL, Liu YD, Zhou H, Ni YQ. Application of 16S rDNA high-throughput sequencing for comparative study of the microbial diversity of dairy products from western and northern Xinjiang, China. *Food Science*, 2017, 38(20): 27–33. (in Chinese)
- [20] Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2005, 2(2): 115–29.
- [21] Sharma A, Satyanarayana T. High maltose-forming, Ca²⁺-independent and acid stable α -amylase from a novel acidophilic bacterium, *Bacillus acidicola*. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(10): 1503–1507.
- [22] 李阳. 生料醋醅中优势醋酸菌的筛选及产酸特性. 山西大学硕士学位论文, 2020.
- [23] Wang CJ, Chang T, Yang H. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 2015, 47: 231–236.
- [24] Coloretti F, Carri S, Armaforte E, Chiavari C, Grazia L, Zambonelli C. Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 271(2): 245–250.
- [25] Lefteris M, Vagelis T, Domitille FM. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 2006, 157(3): 241–7.
- [26] 蒙丹丽, 梁列新, 宋怀宇. 短链脂肪酸在肠道中的生理作用. 中国临床新医学, 2018, 11(2): 198–202.
Meng DL, Liang LX, Song HY. Physiological function

- of short-chain fatty acids in the intestine. *Chinese Journal of New Clinical Medicine*, 2018, 11(2): 198–202. (in Chinese)
- [27] 丁瑞雪, 武俊瑞, 岳喜庆, 吴南, 陶冬冰, 洛雪, 乌日娜. 益生菌对肠道营养健康调控作用的研究进展. *中国乳品工业*, 2018, 46(1): 24–32.
Ding RX, Wu JR, Yue XQ, Wu N, Tao DB, Luo X, Wu RN. Research progress on effects of probiotics on intestinal flora and human health. *China Dairy Industry*, 2018, 46(1): 24–32. (in Chinese)
- [28] 王寅, 冯海霞. 益生菌的产酸性能评价研究. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(12): 43–47.
Wang Y, Feng HX. Evaluation method of acid production of probiotics. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(12): 43–47. (in Chinese)
- [29] 宋梦思, 潘鲁青, 黄飞, 高烁. 对虾肠道中产蛋白酶菌株的筛选、鉴定及其产酶特性初步研究. *海洋湖沼通报*, 2019(6): 58–67.
Song MS, Pan LQ, Huang F, Gao S. Screening, identification and enzymatic characterization of protease-producing probiotics from shrimp intestine. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2019(6): 58–67. (in Chinese)
- [30] 邹建威. 岩扇贝内脏团和肠道可培养微生物及其宏基因组多样性分析. 大连海洋大学硕士学位论文, 2019.
- [31] 唐丽江, 王振华, 王迪. 产淀粉酶芽孢杆菌高产菌株的筛选. *饲料博览*, 2009(4): 23–25.
Tang LJ, Wang ZH, Wang D. Screening of high-yielding strain of *Bacillus* producing amylase. *Feed Review*, 2009(4): 23–25. (in Chinese)
- [32] Gharechahi J, Zahiri HS, Noghabi KA, Salekdeh GH. In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, 38(1): 1–32.
- [33] 龙仲敏. 鸡源益生菌的筛选及穿梭载体的构建. 广西大学硕士学位论文, 2020.