藏羊源纤维素降解菌-沙福芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学特性

徐淑琴[1,2]，马祥兆[1,2]，陈晓慧[1,2]，贺曦[1,2]，贺晓龙[1,2]，冶贵生[1,2*]
（1.青海大学农牧学院动物医学系，青海西宁 810016）
（2.青海省动物疾病病原诊断与绿色防控技术研究重点实验室，青海西宁 810016）

摘要：为获得藏羊源纤维素降解益生菌，该试验采用纤维素刚果红培养基从藏羊瘤胃液中分离筛选出可降解纤维素的细菌，结合形态学、生理生化鉴定及16S rDNA序列分析对其进行种属鉴定，通过生长曲线的测定、抑菌试验和药敏试验研究该分离菌株的部分生物学特性。结果表明：筛选出一株纤维素刚果红培养基上呈粉红色、革兰氏染色呈阳性的菌株，命名为BS1-ql。分离菌株BS1-ql产芽孢，氧化酶试验、触酶试验呈阳性等生理生化特征符合芽孢杆菌属的特点，其16S rDNA序列与多株芽孢杆菌属菌株相似度达到96%以上，与沙福芽孢杆菌同源性达100%且处于同一最小分枝，明确该分离菌株是沙福芽孢杆菌。沙福芽孢杆菌BS1-ql生长迅速、接种2 h后进入对数生长期；对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌的抑菌圈均达8.96 nm以上，均有一定的抑制能力；对大多数常用抗生素呈现不同程度的敏感，对头孢他啶抗生素表现为耐药。结论：成功分离鉴定出一株藏羊源沙福芽孢杆菌，该分离菌株生物学特性良好，为藏羊源益生菌提供了候选菌株。

关键词：纤维素分解菌；分离；鉴定；沙福芽孢杆菌；生物学特性

文章篇号：1673-9078(2022)06-84-89 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0821

Isolation, Identification and Biological Characteristics of Cellulose-degrading Bacterium, Bacillus Shaffer, from Tibetan Sheep

XU Shuqin[1,2], MA Xiangzhao[1,2], CHEN Xiaohui[1,2], HE Xi[1,2], HE Xiaolong[1,2], YE Guisheng[1,2*]
(1.Department of Animal Medicine, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)
(2.Qinghai Provincial Key Laboratory of Pathogen Diagnosis for Animal Diseases and Green Technical Research for Prevention and Control, Xining 810016, China)

Abstract: In order to obtain cellulose-degrading probiotics from Tibetan sheep, cellulose Congo red medium was used to isolate and screen cellulose-degrading bacteria from the rumen fluid of Tibetan sheep Species identification was performed through combining morphological examination, physiological and biochemical identification, and 16S rDNA sequence analysis. Some biological characteristics of the isolated strain were studied through the determination of growth curve, antibacterial test and drug susceptibility testing. The results showed that a pink and Gram-positive strain was screened out on cellulose Congo red medium (named BS1-ql). The isolated strain, BS1-ql, produced spores, and its physiological and biochemical characteristics were in line with the characteristics of *Bacillus* genus, such as positive oxidase test and catalase test. Its 16S rDNA sequence was more than 96% similar to that of multiple *Bacillus* strains, 100% homologous to *Bacillus safensis* and in the same smallest branch. It was confirmed that the isolated strain was *Bacillus safensis*. BS1-ql grew rapidly and entered the logarithmic phase 2 h after inoculation; the inhibition zones against *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* were

引文格式：

徐淑琴,马祥兆,陈晓慧,等.藏羊源纤维素降解菌-沙福芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学特性[J].现代食品科技,2022,38(6):84-89,+287

XU Shuqin, MA Xiangzhao, CHEN Xiaohui, et al. Isolation, identification and biological characteristics of cellulose-degrading bacterium, bacillus shaffer, from tibetan sheep [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 84-89, +287

收稿日期：2021-07-29

基金项目：青海省自然科学基金项目（2020-ZJ-928）；2020年青海省“高端创新人才”千人计划

作者简介：徐淑琴（1995-），女，硕士研究生，研究方向：分子病原生物学与免疫学，E-mail：2577855842@qq.com

通讯作者：冶贵生（1977-），男，博士，副教授，研究方向：分子生物学与免疫学，E-mail：qhxjygs@163.com

all above than 8.96 nm, indicating a certain degree of inhibition; BS1-ql was sensitive to most commonly used antibiotics to varying degrees, and resistant to ceftazidime antibiotics. Conclusion: A strain of *Bacillus safensis* from Tibetan sheep was successfully isolated and identified. The isolated strain has good biological characteristics and can be a candidate strain for probiotics from Tibetan sheep.

Key words: cellulose decomposing bacteria; separation; appraisal; *Bacillus safensis*; biological characteristics

纤维素作为光合作用的主要产物，是地球上含量最丰富、分布最广泛、永不枯竭的可再生资源[1]。纤维素因分子结构特殊，通常的酶分子和化学试剂难以与纤维素表面致密结构结合，对其进行破坏分解[2]，这造成了纤维素利用率低下。纤维素的开发与利用几乎都是通过生物降解法完成的[3]，该方式具有环保、高效、经济等特点[4]。真菌、细菌和放线菌是主要产生纤维素酶的微生物[5]。纤维素降解菌具有培养简单、发酵周期短、生长速度快、耐高温等优点，目前已被广泛应用于多个领域，如微生态添加剂、秸秆还田和重金属污染修复等[6,7]。

纤维素降解菌类中的芽孢杆菌产酶丰富，酶活性相对其他菌株较高，能产生大量的纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶等，提高原料的利用率[8]。芽孢杆菌可形成休眠芽孢，具有抗逆能力强、抑菌谱广、代谢产物丰厚、培养周期短等特点，目前对该菌属报道较多的有枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌。芽孢杆菌在发酵、生防、微生态制剂等方面有重大的研究意义和应用前景[9]。徐同伟等[10]从烟草病株根际土壤中筛选出的沙福芽孢杆菌可有效控制烟草黑胫病危害和提高烟草产量；Rong 等[11]从桂花中分离出沙福芽孢杆菌具有抗真菌活性，是一种防治稻瘟病的生物农药；李庆荣等[12]从蚕沙中分离出沙福芽孢杆菌有溶磷解钾作用可改良土壤，提高土壤肥力；da Fonseca 等[13]从石油中分离出负责降解芳香族化合物和石油芳烃馏分的沙福芽孢杆菌。沙福芽孢杆菌已在农业、生物防治、石油化工等方面被深入研究并得到了广泛应用。

藏羊生活在海拔高、低温、低氧的青藏高原，对严酷的自然环境有较强的适应能力和耐粗饲料的特点，使得藏羊消化道微生物具有较高的生物学研究价值[14]。本实验从青海健康藏羊瘤胃液中分离、筛选出纤维素降解菌，利用形态学观察、生理生化特性和 16S rDNA 分子鉴定等方法鉴定分离菌株的种类及系统分类地位，并对分离菌株的生长特性、抑菌能力和药物敏感性等生物学特性进行研究，以期为纤维素酶制剂的开发和藏羊可持续发展提供潜在候选菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品及菌株

藏羊瘤胃液采集于青海省海北藏族自治州某养殖场。大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌分离菌株，均由青海大学农牧学院青藏高原动物疾病研究室保存。

1.1.2 试剂

纤维素刚果红培养基、细菌生化鉴定管、MH 琼脂（MHA）、胰蛋白胨大豆肉汤，均购于青岛海博生物技术有限公司；药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

T100™ ThermalCycler PCR 仪，美国 BIO-RAD 公司；LRH 生化培养箱，上海一恒科技有限公司；AC2-4S1 生物安全柜，新加坡艺思高科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 纤维素降解菌的分离筛选及形态学观察

用胰蛋白胨大豆肉汤对采集的瘤胃液进行增菌培养。蘸取增菌液划线于纤维素刚果红培养基，37 ℃恒温培养 48 h。挑选粉红色单菌落分离纯化后观察菌落生长情况，并用革兰氏染色法制片观察菌体形态结构[15]。

1.3.2 分离菌株的生理生化鉴定

选取革兰氏阳性、有芽孢的杆状菌株进行生理生化鉴定，具体方法参照《伯杰氏细菌系统鉴定手册》（中文第 8 版）[16]，挑取纯化后的单个菌落接种于生化鉴定管，在 37 ℃培养 24 h 后观察结果。

1.3.3 分离菌株的 16S rDNA 鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株基因组，用细菌的通用引物对分离株进行 16S rDNA[17] 片段扩增。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶检测后进行测序。将得到的测序序列提交至NCBI中进行Blast比对，选取相关近缘菌株序列用 MEGA 7.0 软件中的邻接（neighbor-joining，NJ）法聚类构建系统发育树[18]。

1.3.4 生长曲线的测定

将分离菌株菌液浓度调整为 0.5 个麦士比浊度，接种 LB 液体培养基，180 r/min 37 ℃恒温培养 26 h，每 2 h 测定其在 600 nm 处吸光度值[19]，记录数据并绘制生长曲线。

1.3.5 抑菌实验

将致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及产气荚膜梭菌（1×10^{8} CFU/mL）涂布于营养琼脂上，放置四联式牛津杯，将培养的分离菌株菌液接入牛津杯中，培养皿 4 ℃下放置 12 h 后，37 ℃恒温培养 12 h，测量抑菌圈直径[20]。

1.3.6 药物敏感性试验

采用纸片扩散法（Kirby-Bauer 法）[21]检测分离菌株对 30 种抗生素的敏感程度，将分离菌株菌液浓度调整为 0.5 个麦士比浊，涂布于 MH 平板表面，将药敏片贴于平板表面，37 ℃恒温箱中培养 18 h~24 h，记录抑菌圈的直径。依据国家临床实验室标准委员会（National Committee for Clinical Laboratory Standards，NCCLS）的标准进行判定结果。

1.3.7 数据处理

实验结果采用 Excel 整理试验数据并处理绘图。

2 结果与讨论

2.1 纤维素降解菌的分离筛选及形态学观察结果

纤维素刚果红培养基筛选结果如图 1a，分离菌株的菌落呈圆形、表面光滑、边缘整齐，培养初期为粉红色小菌落，后期中间乳白略带粉色边缘有透明圈。在光学显微镜下观察到菌体为单个直杆状、两端钝圆、有芽孢，革兰氏染色结果如图 1b，分离菌株呈阳性，将其命名为 BS1-ql。研究表明食草反刍动物消化道内共生的细菌、真菌等微生物能够分泌纤维素酶，可帮助分解纤维素为动物提供能量[22]。本研究以纤维素为单一碳源的刚果红培养基筛选纤维素降解菌，通过观察长出菌落颜色及形态特点判定该菌株是否能降解纤维素，操作简单便捷，结果可靠高效。但难以判断产酶水平的高低，需要通过酶活测定法精确测定菌株产酶水平的高低[23]。

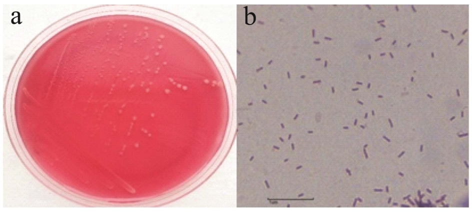

图 1 形态学结果

Fig.1 Morphological results

注：a：菌落形态；b：革兰氏染色镜检结果（100×）。

2.1.1 分离菌株的生理生化鉴定

生理生化试验结果表明，分离菌株 BS1-ql 能够利用甘露醇、水杨苷、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖作为单一碳源，不能利用西蒙氏枸橼酸盐和丙酸盐，且不能还原硝酸盐；过氧化氢酶和氧化酶检测呈阳性（表 1）；生长 pH 值在 5.7，能耐受 7% NaCl 环境，不能水解淀粉。生理生化结果符合芽孢杆菌的特征，且通过对菌株形态特征的观察，并对照《伯杰细菌鉴定手册》，初步将菌株 BS1-ql 鉴定为芽孢杆菌属。

表 1 生理生化鉴定试验结果

Table 1 Biochemical identification results

项目	结果	项目	结果	项目	结果
甘露醇	+	葡萄糖	+	硝酸盐还原	-
山梨醇	-	果糖	-	氧化酶试验	+
水杨苷	+	蔗糖	+	触酶试验	+
棉子糖	-	吲哚试验	-	纤维二糖	-
木糖	-	乳糖	-	西蒙氏枸橼酸盐	-
硫化氢	-	淀粉水解	-	pH 5.7 生长管	+
麦芽糖	+	甲基红	-	7%氯化钠	+
松三糖	-	V-P 试验	-	葡萄糖 OF	产碱型
阿拉伯糖	-	丙酸盐	-		

2.1.2 分子鉴定结果

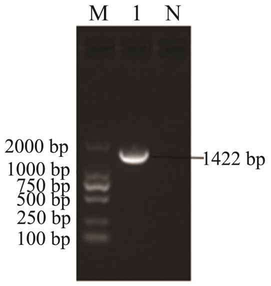

图 2 分离菌株的 16S rDNA 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of 16S rDNA of the isolated strain

注：M：DL2000 DNA Marker；1：分离菌株；N：阴性对照。

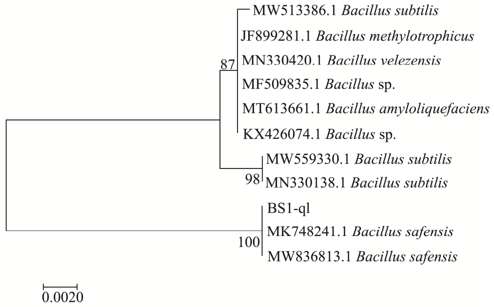

图 3 16S rDNA 序列与参考序列同源性比较结果

Fig.3 Homology comparison between 16S rDNA sequence and reference sequence

PCR 扩增结果如图 2 显示，分离菌株所在泳道出现长度在 1400 bp 左右的目的条带，测序序列显示其长度为 1422 bp，同源比对结果表明分离菌株与参考芽孢杆菌菌株同源性均在 87%以上、与沙福芽孢杆菌同源性高达 100%且处于进化树同一分支上，如图 3，亲

缘关系最近。结合菌株形态特点与生理特征，鉴定分离菌株是沙福芽孢杆菌（*Bacillus safensis*）。

传统的细菌鉴定方法操作繁琐、试验周期长且存在主观判断。生理生化鉴定通过测定 pH 变化和底物利用，可验证细菌间新陈代谢的方式、产物的不同，再利用被称为细菌鉴定“金标准”的 16S rDNA 基因检测技术就可以实现对微生物快速、微量、精确地鉴定分析[24]。耿晓杰等[25]研究采用 16S rDNA 基因测序和序列比对分析从青稞小曲中分离到 5 种芽孢杆菌。Shafi 等[26]使用不同的鉴定方法，包括传统的、生物化学的和分子方法精准的鉴定分离出湖水内的 16 株细菌。本试验与上述研究相同，通过形态学观察、生理生化试验及 16S rDNA 分子鉴定相结合，短时间内可明确分离菌株为沙福芽孢杆菌。分离筛选的藏羊源沙福芽孢杆菌 BS1-ql V-P 试验为阴性，与大黑山土壤中[27]分离的沙福芽孢杆菌不同；与中华鳖肠道中[28]分离的 2 株沙福芽孢杆菌的硝酸盐还原、甲基红、淀粉水解试验结果不一致，可能是由于不同来源或同一来源的菌株之间生化特性会有所差异。

2.2 生长曲线的测定

分离菌株 BS1-ql 的生长曲线如图 4 所示，沙福芽孢杆菌生长速度较快，0 h~2 h 为迟缓期，2 h 后细菌开始快速繁殖进入对数生长期，14 h~18 h 菌体量趋于稳定，到 18 h~22 h 内菌体量又迅速增加，22 h 后生长速率逐渐降低进入到平稳期。

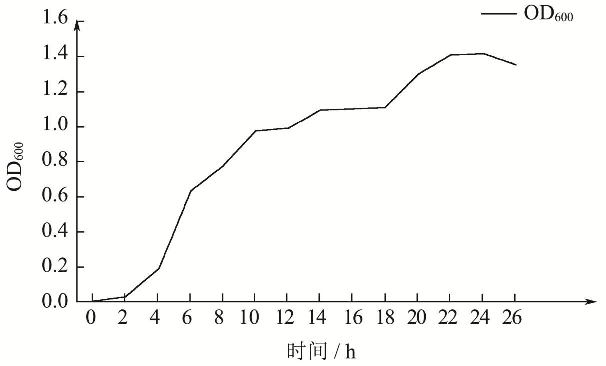

图 4 生长代谢曲线

Fig.4 Strain growth curves of strains

2.3 抑菌实验结果

分离菌株 BS1-ql 对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌分离株的抑菌圈直径分别为 8.96、10.34、13.74、14.90 nm，结果表明沙福芽孢杆菌 BS1-ql 对这 4 种致病菌有一定抑制能力，对产气荚膜梭菌的抑制能力最强。芽孢杆菌主要通过竞争、拮抗和诱导这三种作用方式对病原菌产生显著的抑制效果[29]。Abdelli 等[30]通过研究沙福芽孢杆菌的表面活性物质发现该菌对表皮葡萄球菌等致病菌有抑制能力和抗肿瘤活性。Ngalimat 等[31]报道沙福芽孢杆菌对藤黄微球菌有一定的抑制能力。与之相似，本试验分离的沙福芽孢杆菌 BS1-ql 对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌均有明显的抑制效果，良好的抑菌活性是沙福芽孢杆菌作为候选益生菌株的重要特征。

表 2 贝莱斯芽孢杆菌分离株对不同药物的敏感性试验结果

Table 2 The susceptibility test results of *Bacillus velez* isolates to different drugs

药物	药物含量/(μg/片)	敏感程度	药物	药物含量/(μg/片)	敏感程度
青霉素	10	S	新霉素	30	S
氨苄西林	10	S	庆大霉素	10	S
羧苄西林	100	S	丁胺卡那	30	S
哌拉西林	100	S	卡那霉素	30	S
苯唑西林	1	S	诺氟沙星	10	S
头孢曲松	30	S	环丙沙星	5	S
头孢他啶	30	R	氧氟沙星	5	S
头孢呋辛	30	I	复方新偌明	25	S
头孢氨苄	30	S	红霉素	15	S
头孢拉定	30	S	麦迪霉素	30	S
头孢唑啉	30	S	克林霉素	2	I
头孢哌酮	75	S	万古霉素	30	S
四环素	30	S	氯霉素	30	S
多西环素	30	S	多粘菌素	30	I
米诺环素	30	S	呋喃唑酮	30	S

注：R 表示耐药；S 表示敏感；I 表示中度敏感。

2.4 药敏试验

药敏试验结果表明（表 2），沙福芽孢杆菌分离菌株 BS1-ql 对绝大多数抗生素表现出敏感，包括青霉素类的青霉素、氨苄西林和羧苄西林等，氨基糖苷类的新霉素、庆大霉素和卡那霉素等，四环素类、大环内酯类和喹诺酮类；对多肽类的多粘菌素 B 和万古霉素及头孢类的头孢呋辛中度敏感；而对头孢他啶表现出耐药性。与宋梦思等[32]所报道虾肠道中的沙福芽孢杆菌对头孢噻肟、青霉素、杆菌肽、奥格门汀 4 种抗生素耐药不同，此次试验分离得到的沙福芽孢杆菌 BS1-ql 仅对头孢他啶表现为耐药；对其它 29 种常用抗生素皆表现为不同程度的敏感，说明在藏羊养殖过程中使用的抗生素较少，分离菌株可能含有的耐药基因较少，这降低了抗生素抗性基因传播的风险，减少了对环境及人类健康的威胁。

3 结论

本试验从青海藏羊瘤胃中分离筛选到了 1 株能降解纤维素的细菌，菌落呈圆形、表面光滑、边缘整齐，革兰氏染色呈阳性，菌体为单个直杆状、两端钝圆、有芽孢，能够利用甘露醇等，结合 16S rDNA 基因分子鉴定结果，最终确定其为沙福芽孢杆菌。该藏羊源沙福芽孢杆菌生物学特性良好；生长周期短，培养 2 h 后进入对数生长期；抑菌能力强，对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌的抑菌圈均在 8.96 mm 以上；对青霉素、头孢氨苄、诺氟沙星等大多数常见抗生素敏感，仅对头孢他啶抗生素耐药。因此具有潜在的益生价值，这能为该菌藏羊源微生态制剂的研发提供重要基础。

参考文献

[1] Cui J, Mai G, Wang Z,et al. Metagenomic insights into a cellulose-rich niche reveal microbial cooperation in cellulose degradation [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 618-647

[2] 杨腾腾,周宏,王霞,等.微生物降解纤维素的新机制[J].微生物学通报,2015,42(5):928-935
YANG Tengteng, ZHOU Hong, WANG Xia, et al. New mechanism of microbial degradation of cellulose [J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 928-935

[3] 邵帅,王玲玲,林剑,等.产纤维素酶真菌分离及高效菌株筛选[J].河南农业科学,2020,49(4):55-61
SHAO Shuai, WANG Lingling, LIN Jian, et al. Isolation of cellulase-producing fungi and screening of highly efficient strains [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(4): 55-61

[4] 佟硕秋,王嫱,林宗梅,等.纤维素降解菌研究进展[J].山东化工,2020,49(3):67,91
TONG Shuoqiu, WANG Qiang, LIN Zongmei, et al. Research progress of cellulose degrading bacteria [J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(3): 67, 91

[5] 杨茜,李维尊,鞠美庭,等.微生物降解木质纤维素类生物质固废的研究进展[J].微生物学通报,2015,42(8):1569-1583
YANG Qian, LI Weizun, JU Meiting, et al. Advances in microbial degradation of lignocelluloses biomass solid waste-a review [J]. Microbiology China, 2015, 42(8): 1569-1583

[6] 杨伟平,丁雅倩,马梦柯,等.动物粪便中纤维素分解菌的分离和鉴定[J].家畜生态学报,2019,40(2):75-79,85
YANG Weiping, DING Yaqian, MA Mengke, et al. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from animal feces [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2019, 40(2): 75-79, 85

[7] 潘知乐,杨鸿,时佳旭,等.纤维素降解菌的筛选鉴定及其特性研究概况[J].环境科学与管理,2019,44(4):102-105
PAN Zhile, YANG Hong, SHI Jiaxu, et al. Screening identification and characterization of cellulose degrading bacteria [J]. Environmental Science and Management, 2019, 44(4): 102-105

[8] Vidal A, Marin S, Sanchis V, et al. Hydrolysers of modified mycotoxins in maize: *α*-amylase and cellulase induce an underestimation of the total aflatoxin content [J]. Food Chem, 2018, 248(6): 86-92

[9] 侯进慧,蔡侃,郑宝刚,等.一株牛蒡根际纤维素降解芽孢菌的分离鉴定和发酵分析[J].食品科学,2010,31(21):312-315
HOU Jinhui, CAI Kan, ZHENG Baogang, et al. Isolation, identification and fermentation analysis of a cellulose-degrading bacterium from *Arctium lappa* L. rhizosphere [J]. Food Science, 2010, 31(21): 312-315

[10] 徐同伟,周建云,祖庆学,等.两株烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定和促生防病潜力评价[J].中国烟草科学,2017,38(3):44-50
XU Tongwei, ZHOU Jianyun, ZU Qingxue, et al. Screening, identification, biocontrol and growth-promoting potential evaluation of two bacterial strains against tobacco black shank [J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(3): 44-50

[11] Rong S, Xu H, Li L, et al. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast [J]. Pestic Biochem Physiol, 2020, 162: 69-77

[12] 李庆荣,廖森泰,邢东旭,等.蚕沙堆肥过程中解磷解钾细菌的分离与鉴定[J].蚕业科学,2018,44(5):753-759
LI Qingrong, LIAO Sentai, XING Dongxu, et al. Isolation and identification of phosphate and potassium solubilizing bacteria from fermented silkworm excrement [J]. Acta Sericologica Sinica, 2018, 44(5): 753-759

[13] Da Fonseca F S, Angolini C F, Arruda M A, et al. Identification of oxidoreductases from the petroleum *Bacillus safensis* strain [J]. Biotechnol Rep (Amst), 2015, 8: 152-159

[14] 孙晓萍,刘建斌,袁超,等.藏绵羊高海拔适应性及生产性能分析[J].今日畜牧兽医,2018,34(4):50-52
SUN Xiaoping, LIU Jianbin, YUAN Chao, et al. Analysis on high altitude adaptability and production performance of Tibetan sheep [J]. Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 34(4): 50-52

[15] 黄秀梨.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1999
HUAN Xiuli. Microbiology Experiment Guidance [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999

[16] 布坎南RE,吉本斯NE.伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M].北京:科学出版社,1984
Buchanan RE, Gibbons NE. Berger's Handbook on Bacterial Identification (8th ed) [M]. Beijing: Science Press, 1984

[17] Takuya Y, Tatsuji S, Takenori N, et al. *Lactic acid bacteria* from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells [J]. Foods, 2018, 7(4): 48-56

[18] Zhao W, Li Z, Huang X, et al. The complete mitochondrial genome of *Salmacis sphaeroides variegate* (Mortensen, 1942) [J]. Mitochondrial DNA B Resour, 2019, 4(2): 3829-3830

[19] 徐中阳,陈雯莉.萘降解菌的分离、鉴定及降解途径[J].华中农业大学学报,2015,34(1):59-65
XU Zhongyang, CHEN Wenli. Isolation and identification of naphthalene degrading bacteria and characterization of its degradation pathways [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(1): 59-65

[20] 张丽.传统发酵牦牛奶中益生乳杆菌筛选及其免疫调节功能研究[D].兰州:甘肃农业大学,2011
ZHANG Li. Evaluation of the potential probiotic properties and immune regulation function of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented yak milk [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011

[21] Yin D, Guo Y, Li M, et al. Performance of VITEK 2, E-test, Kirby-Bauer disk diffusion, and modified Kirby-Bauer disk diffusion compared to reference broth microdilution for testing tigecycline susceptibility of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and *A. baumannii* in a multicenter study in China [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(6): 1149-1154

[22] Kameshwar, A K S, Qin W. Genome wide analysis reveals the extrinsic cellulolytic and biohydrogen generating abilities of Neocallimastigomycota fungi [J]. Journal of Genomics, 2018, 6: 74-87

[23] 赵龙妹,张玲.产蛋白酶芽孢杆菌的筛选鉴定及酶学特性分析[J].畜牧与兽医,2021,53(3):59-64
ZHAO Longmei, ZHANG Ling. Screening, identification and characterization of protease producing *Bacillus* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(3): 59-64

[24] 皮乔木,王倩楠,刘有华,等.鲫源嗜水气单胞菌的分离、鉴定及药敏分析[J].江苏海洋大学学报(自然科学版),2021,30(1):12-16
PI Qiaomu, WANG Qiannan, LIU Youhua, et al. Isolation, idengtification and drug sentivity analysis of *Aeromonas hydrophila* from *Carassius auratus* [J]. Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition), 2021, 30(1): 12-16

[25] 耿晓杰,张玉红,薛洁,等.西藏青稞小曲中优良微生物的筛选与鉴定[J].食品与发酵工业,2019,45(15):66-73
GENG Xiaojie, ZHANG Yuhong, XUE Jie, et al. Screening and identification of excellent microorganisms in Tibetan highland barley Xiaoqu [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 66-73

[26] Shafi S, Kamili An, Shah Ma, et al. Dynamics of bacterial class bacilli in the deepest valley lake of Kashmir-the Manasbal lake [J]. Microb Pathog, 2017, 104: 78-83

[27] 袁慎亮,邢德明,窦少华,等.一株产纤溶酶菌株的分离鉴定及其纤溶组分分析[J].微生物学通报,2014,41(9):1843-1849
YUAN Shenliang, XING Deming, DOU Shaohua, et al. Isolation and identification of a fibrinolytic enzyme producing bacterium and its analysis of the fibrinolytic components [J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1843-1849

[28] 王志丽,管越强,王颖,等.养殖中华鳖肠道中芽孢杆菌的分离鉴定及其噬菌体的分离和性质分析[J].水产科学,2012,31(7):419-424
WANG Zhili, GUAN Yueqiang, WANG Ying, et al. Isolation and identification of bacterium *Bacillus* from soft-shelled turtle *Trionyx sinensis* and isolation and characteristics of bacteriophage from *Bacillus* [J]. Fisheries Science, 2012, 31(7): 419-424

（下转第 287 页）