DOI:10.12441/spyswjs.20240628003 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0112-10

稻米内生贝莱斯芽孢杆菌BR-1的安全性评估

张鑫宇 赖泽萍 石鸿辉 王 婷 于雅君 朱军莉 赵 艳*

(浙江工商大学食品与生物工程学院,浙江 杭州 310018)

摘要:【目的】对从稻米中分离的一株稻米内生贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*, *B. velezensis*)BR-1进行安全性评估。**【方法】**在全基因组测序的基础上,应用综合抗生素耐药数据库(CARD)和毒力因子数据库(VFDB)对BR-1的抗生素耐药基因和毒力基因进行注释,同时对BR-1进行抗生素药敏试验和溶血试验,并利用KEGG数据库注释贝莱斯芽孢杆菌BR-1与益生菌相关的基因。**【结果】**该稻米内生贝莱斯芽孢杆菌BR-1总碱基对为1 071 550 432 bp,平均GC占比46.3%,包含4 027个蛋白质编码基因,含有14个CRISPR-Cas;不含有编码溶血素BL(Hbl)、非溶血性肠毒素(Nhe)、肠毒素(细胞毒素K)和催吐毒素(cereulide-Ces)等毒素基因;KEGG数据库注释到可耐酸、耐高温、耐胆盐等具有良好的胃肠耐受性、抗氧化活性和优异益生菌特性的基因;预测到菌株BR-1含有2个耐药基因*vmlR*和*clbA*,对9种抗生素高度敏感且不含有耐药质粒。**【结论】**贝莱斯芽孢杆菌BR-1不含有编码毒素的基因,不具有广谱耐药性,不具有溶血活性,含有益生菌特性相关的基因,符合GB/T 41728—2022《微生物肥料质量安全评价通用准则》的安全性要求,可以作为微生物肥料。

关键词:稻米内生贝莱斯芽孢杆菌BR-1;全基因组测序;毒力基因;抗生素耐药基因;抗生素药敏试验;溶血试验

Safety Assessment of Endophytic *Bacillus velezensis* BR-1 in Rice

*ZHANG Xinyu LAI Zeping SHI Honghui WANG Ting YU Yajun ZHU Junli ZHAO Yan**

(School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of the study is to evaluate the safety of an endophytic strain *Bacillus velezensis* (*B. velezensis*) BR-1 isolated from rice. [**Method**] The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) and the Virulence Factor Database (VFDB) were employed to annotate the antibiotic resistance genes and virulence genes, respectively, of BR-1 based on the whole genome sequence. The antibiotic sensitivity test and hemolysis test of BR-1 were performed, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was used to annotate the genes related to probiotic properties of *B. velezensis* BR-1. [**Result**] The total genome length of *B. velezensis* BR-1 was 1 071 550 432 bp, with an average GC ratio of 46.3%, containing 4 027 protein-coding genes and 14 CRISPR-Cas. It did not contain genes encoding toxins such as hemolysin BL (Hbl), non-hemolytic enterotoxin (Nhe), enterotoxin (cytotoxin K), and deoxynivalenol (cereulide-Ces). The KEGG annotation revealed genes with good gastrointestinal tolerance, antioxidant activity, and excellent probiotic properties such as acid tolerance, high temperature tolerance, and bile salt tolerance. It was predicted that strain BR-1 contained two antibiotic resistance genes *vmlR* and *clbA*. This strain was highly sensitive to 9 antibiotics and did not contain

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31772100);浙江省基础公益研究计划项目(LTNG23C200011);浙江省“三农九方”科技计划协作项目(2022SNJF011)。

通信作者:赵艳(1970—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物新种质创制、资源开发和生物新技术研究。E-mail:yanzhao9918@163.com

收稿日期:2024-06-28 **修回日期:**2024-08-19

drug-resistant plasmids. [**Conclusion**] *B. velezensis* BR-1 does not contain genes encoding toxins or have broad-spectrum antibiotic resistance and hemolytic activity. It carries genes related to probiotic properties, which meets the safety requirements specified in the General Criteria for Quality and Safety Evaluation of Microbial Fertilizer (GB/T 41728—2022), and can be safely applied as microbial fertilizer.

Keywords: endophytic *Bacillus velezensis* BR-1 in rice; whole genome sequencing; virulence gene; antibiotic resistance gene; antibiotic susceptibility test; hemolysis test

贝莱斯芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌，其菌落多为乳白色、圆形，菌落体积较大，表面粗糙且不规则[1]。该菌生长速度快、抗逆性强、代谢产物丰富，可在15~45 ℃、pH 5.0~10.0的环境中生长，可分泌多种生物活性物质，对植物病原真菌和细菌有显著的拮抗作用，作为生防菌或益生菌在农业生产上有较大的应用潜力。近年来，国内外研究主要集中在菌株分离和功能研究方面。例如，Wang等[2]研究发现，来自腐烂柑橘果实的贝莱斯芽孢杆菌wr8能分泌拮抗真菌（如青霉菌）脂蛋白和拮抗细菌（如大肠杆菌）抗菌肽。Ma等[3]从水稻根际土壤中分离出贝莱斯芽孢杆菌M100S1-4，并发现在农药代森锰锌、2，4-二氯苯氧乙酸和氢氧化铜胁迫下，该菌株可通过产生吲哚乙酸（IAA）、生物膜、胞外多糖（EPS）和脯氨酸来促进植物生长，表现出对农药、盐度和干旱胁迫的耐受性。瞿子惠等[4]从肉鸡盲肠内容物中分离鉴定出贝莱斯芽孢杆菌CL-4，发现该菌株对豆粕进行固态发酵可有效降解豆粕中的抗营养因子，进而提升豆粕的营养价值。

作者使用的贝莱斯芽孢杆菌BR-1分离自经脱壳和表面消毒的健康稻米内部，属于稻米内生菌，具有广谱抗真菌性，如对多种镰刀菌表现出显著的拮抗作用[5]，并能降解真菌毒素玉米赤霉烯酮[6]。另外，在2023年的草莓种植试验中，应用贝莱斯芽孢杆菌BR-1发酵液喷施能显著促进草莓植株生长，使草莓开花率和挂果率分别增加33.3%和75.0%，草莓果实采摘期提前1~2周，显示出其作为微生物肥料在草莓种植中广阔的应用前景。

随着微生物肥料行业的迅速发展以及消费者对食品安全关注度的不断提高，建立功能微生物安全性评价体系、识别和评估潜在风险因子已成为行业可持续发展的必然选择[7]。为了明确稻米内生贝莱斯芽孢杆菌BR-1能否作为微生物肥料用于农业生产，作者根据GB/T 41728—2022《微生物肥料质量安全评价通用准则》中的程序，对稻米内生贝莱斯芽孢杆菌BR-1的安全性进行评估。利用CARD、VFDB等分析其基因组是否存在抗生素抗性、毒素、溶血素等具有安全风险的基因及基因簇结构，同时结合抗生素药敏试验和溶血试验评估其作为微生物肥料的安全性，并利用KEGG数据库注释了贝莱斯芽孢杆菌BR-1益生特性相关基因，为BR-1的开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和生长条件

作者所在实验室前期从表面消毒的脱壳稻米中分离筛选出贝莱斯芽孢杆菌BR-1，并保存于−80 ℃冰箱中。将活化的贝莱斯芽孢杆菌BR-1于37 ℃、LB肉汤培养基中培养24 h。

1.2 全基因组测序

1.2.1 样品处理

在LB肉汤培养基中接种贝莱斯芽孢杆菌BR-1单菌落，于37 ℃、180 r/min条件下振荡培养18 h。调整菌液浓度使其OD_{600}值为0.6~0.8，高速离心1 min后收集沉淀，液氮速冻1 h，由北京百迈客生物科技有限公司进行全基因组测序分析。

1.2.2 基因组注释

将预测得到的基因序列与eggNOG、KEGG、Swiss-Prot、TrEMBL、Nr等功能数据库中的搜索工具（BLAST）进行比对，得到基因组功能注释结果。

1.3 菌株的安全性评估

使用CARD（https://card.mcmaster.ca）和VFDB（http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm）对贝莱斯芽孢杆菌BR-1的抗生素耐药基因和毒力基因进行预测。要求毒力基因比较结果的相似性≥70%，查找基因组中是否存在编码Hbl、Nhe、细胞毒素K和cereulide-Ces的基因。利用CRT v1.2软件和PlasmidFinder 2.1在线网站分析贝莱斯芽孢杆菌BR-1的基因组，以检测CRISPR-Cas系统和质粒。

1.3.1　溶血试验

将活化的贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 划线接种到羊血琼脂平板上，于 37 ℃培养，直至观察到菌落周围出现清晰的区域。同时，将金黄色葡萄球菌在 37 ℃的 LB 液体培养基中培养 24 h，用作 β 溶血的阳性对照。

1.3.2　抗生素药敏试验

采用临床和实验室标准研究所（CLSI）推荐的纸片扩散法检测贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 的抗生素敏感性。使用头孢噻肟、氨苄西林、青霉素、阿米卡星、庆大霉素、四环素、氯霉素、氟苯尼考、复方新诺明和环丙沙星这 10 种抗生素进行抗生素药敏试验。将过夜培养的贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 接种到 LB 肉汤培养基中，于 37 ℃培养 20 h。取 200 μL 细菌溶液均匀涂布在 MHA 琼脂平板上，待其干燥后，用无菌镊子将抗生素滤纸片放置在培养基表面，然后将平板倒置，于 37 ℃培养 24 h，用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.4　益生特性相关基因注释

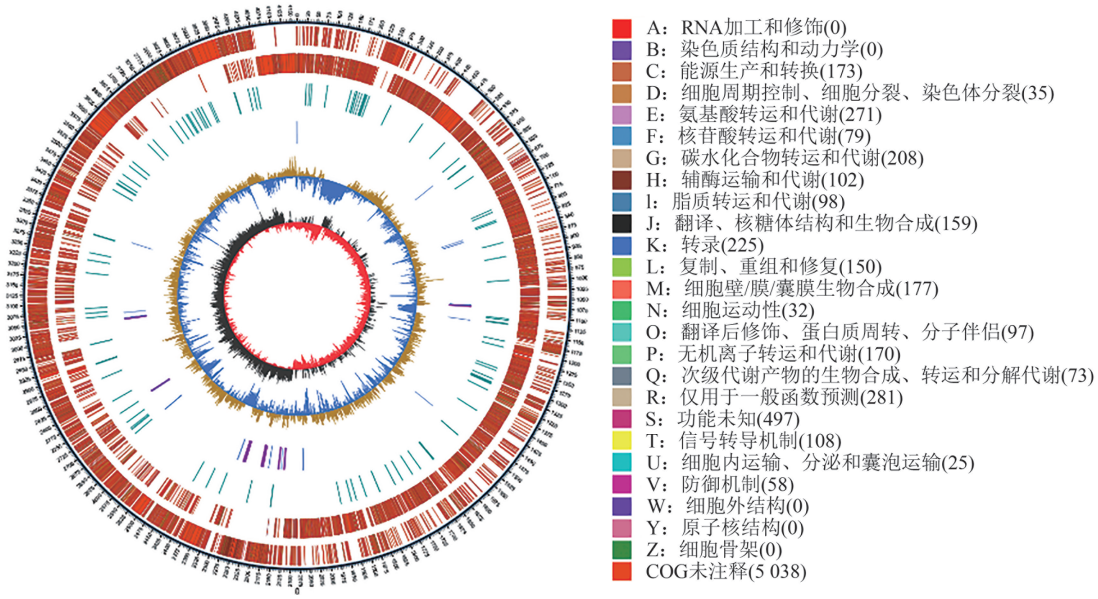
利用 KEGG 数据库（https://www.kegg.jp/）对贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 的耐酸、耐胆盐、耐胃肠液、抗氧化能力等益生特性相关基因进行注释。

2　结果与讨论

2.1　贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 全基因组测序

2.1.1　测序数据分析

为了解贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 的遗传背景，测定了其完整的基因组序列，见图 1。贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 的总碱基对为 1 071 550 432 bp，其完整基因组为一条 4 165 730 bp 的单环染色体。共获得高质量测序长片段 150 118 条，平均长度为 7 138 bp，N_{50} 为 9 137 bp。该基因组的平均 GC 占比为 46.3%，在基因组中共鉴定出 27 个 rRNA 基因和 87 个 tRNA 基因。基于 Nr、eggNOG、GO、KEGG、Pfam、Swiss-Prot、TrEMBL、CARD 和 VFDB 等数据库预测 BR-1 的基因组功能注释，最终注释结果见表 1。其中，在 Nr、eggNOG、GO、KEGG、Pfam、Swiss-Prot、TrEMBL 数据库中进行功能注释的基因序列数量较多，分别为 4 004、3 072、2 908、2 187、3 462、2 870、2 870 条。Nr 数据库比对到序列的物种分布结果如图 2 所示，在 Nr 数据库[8]比对到的 4 004 条序列中，有 1 773 条为芽孢杆菌相关序列，且注释到种的序列中，属于贝莱斯芽孢杆菌的序列有 457 条，占大多数。这表明 BR-1 符合芽孢杆菌物种基因组的一般特征，可归为贝莱斯芽孢杆菌种。



最外面一圈为基因组大小的标示，每个刻度为 5 kb；第二圈和第三圈分别为基因组正链和负链上的基因，不同颜色代表不同的 COG 功能分类；第四圈为重复序列；第五圈为 tRNA 和 rRNA，蓝色为 tRNA，紫色是 rRNA；第六圈为 GC 占比，浅黄色部分表示该区域 GC 占比高于基因组的平均 GC 占比，峰值越高表示平均 GC 占比差异越大，蓝色部分则表示该区域 GC 占比低于基因组的平均 GC 占比；最内圈为 GC 偏移，深灰色代表 G 占比大于 C 的区域，红色代表 C 占比大于 G 的区域；数字表示在 COG 数据库的功能注释中各功能比对到的序列数量。

图 1　贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 基因组圈图

Fig. 1　Genome circle map of *B. velezensis* BR-1

表1　贝莱斯芽孢杆菌BR-1功能基因注释的数据库分布

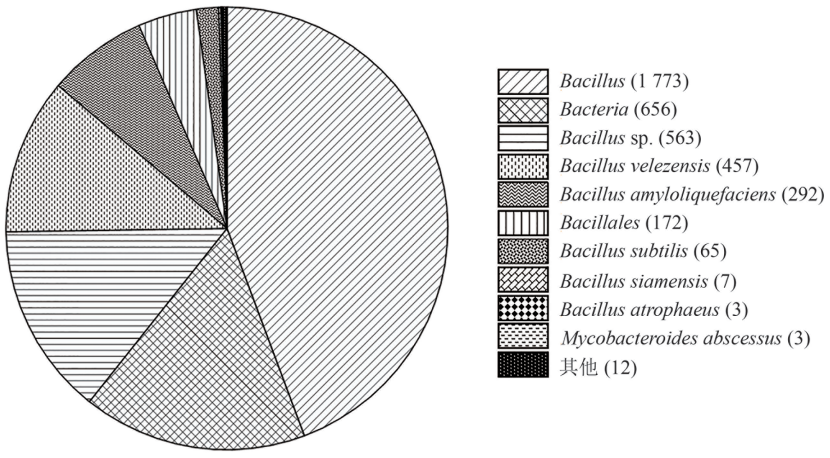
Table 1　Database distribution of annotated functional genes of *B. velezensis* BR-1

数据库	基因序列/条
eggNOG	3 072
GO	2 908
KEGG	2 187
Nr	4 004
Pfam	3 462
Swiss-Prot	2 870
TrEMBL	2 870
CAZy	163
TCDB	1 034
PHI	1 267
CARD	2
VFDB	715

eggNOG[9]功能注释如图3所示，在比对到的3 072条序列中，主要涵盖了氨基酸转运和代谢（281、8.98%）、碳水化合物转运和代谢（221、7.06%）、转录（229、7.32%）、能源生产和转换（180、5.75%）、翻译、核糖体结构和生物合成（160、5.11%）、复制、重组和修复（151、4.83%）等功能。KEGG共注释到了BR-1的2 187条基因，见图4，通过该注释可以方便地找到与某类功能相关的基因。其中，新陈代谢相关的基因有1 204条，占50.05%。

2.1.2　抗生素耐药基因注释

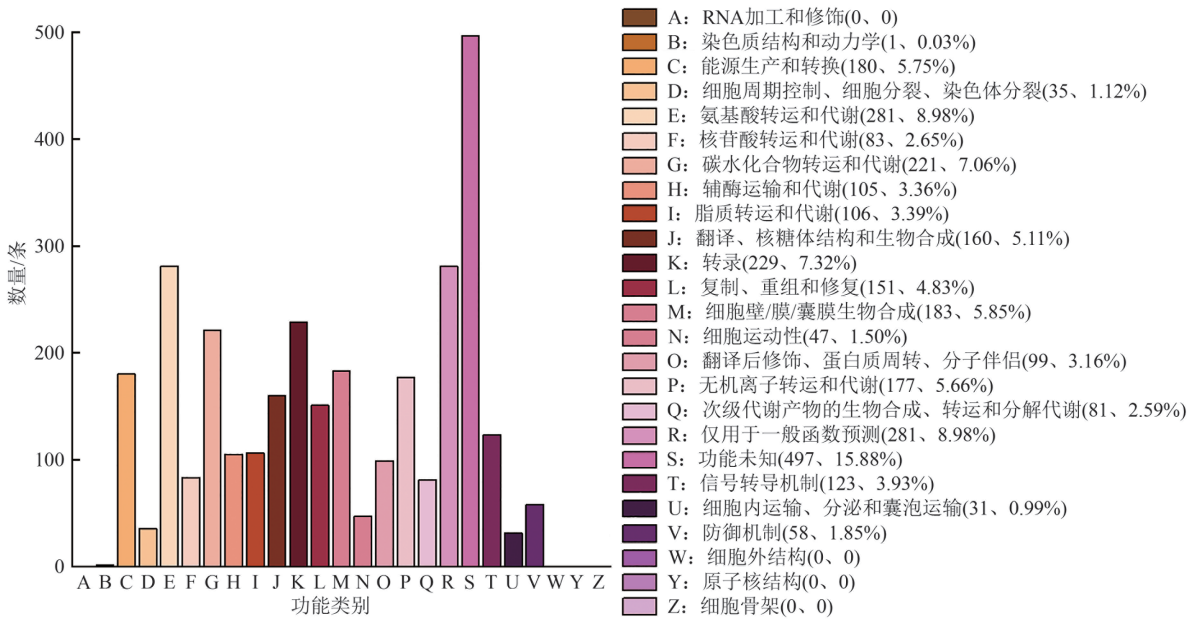
细菌通过质粒水平转移、外源DNA重组或染色体位点突变等方式不断增强对抗生素的耐药性，对健康构成了巨大威胁[10]。为了评价其安全性，利用CARD数据库对贝莱斯芽孢杆菌BR-1基因组中的抗生素耐药基因进行分析，结果见表2。在BR-1中仅鉴定出2个与抗生素耐药相关的基因，即*clbA*和*vmlR*。其中*clbA*基因属于Cfr 23S核糖体RNA甲基转移酶的AMR基因家族，其基因编码产物对胸膜菌素、链菌素、氯霉素、林可酰胺类抗生素、大环内酯类抗生素、恶唑烷酮类抗生素具有抗性。*vmlR*基因在枯草芽孢杆菌中编码ABC-F-ATP酶核糖体保护蛋白，对大环内酯类抗生素和林可酰胺类抗生素具有抗性。李虹梅等[11]对生防菌贝莱斯芽孢杆菌MC2-1进行耐药基因预测，鉴定出208条可能对30类抗生素起抗性作用的耐药基因，这些基因以大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类抗生素相关的耐药基因为主。此外，在BR-1基因组中还鉴定出了CRISPR系统，CRISPR系统和一些Cas蛋白共同组成了广泛存在的免疫系统，能保护细菌基因组免受质粒入侵[12]。与贝莱斯芽孢杆菌MC2-1相似，BR-1也缺乏质粒并含有限制抗生素抗性基因转移的CRISPR-Cas系统原件，但BR-1的抗生素耐药基因数量低于MC2-1，因此BR-1的安全性高于MC2-1。这表明BR-1菌株基因组中存在抗生素耐药相关的基因*clbA*和*vmlR*，其发生水平转移的风险较低，安全性较高。



数字表示在Nr数据库中比对到的各物种的基因序列数量。

图2　贝莱斯芽孢杆菌BR-1 Nr数据库比对到序列的物种分布图

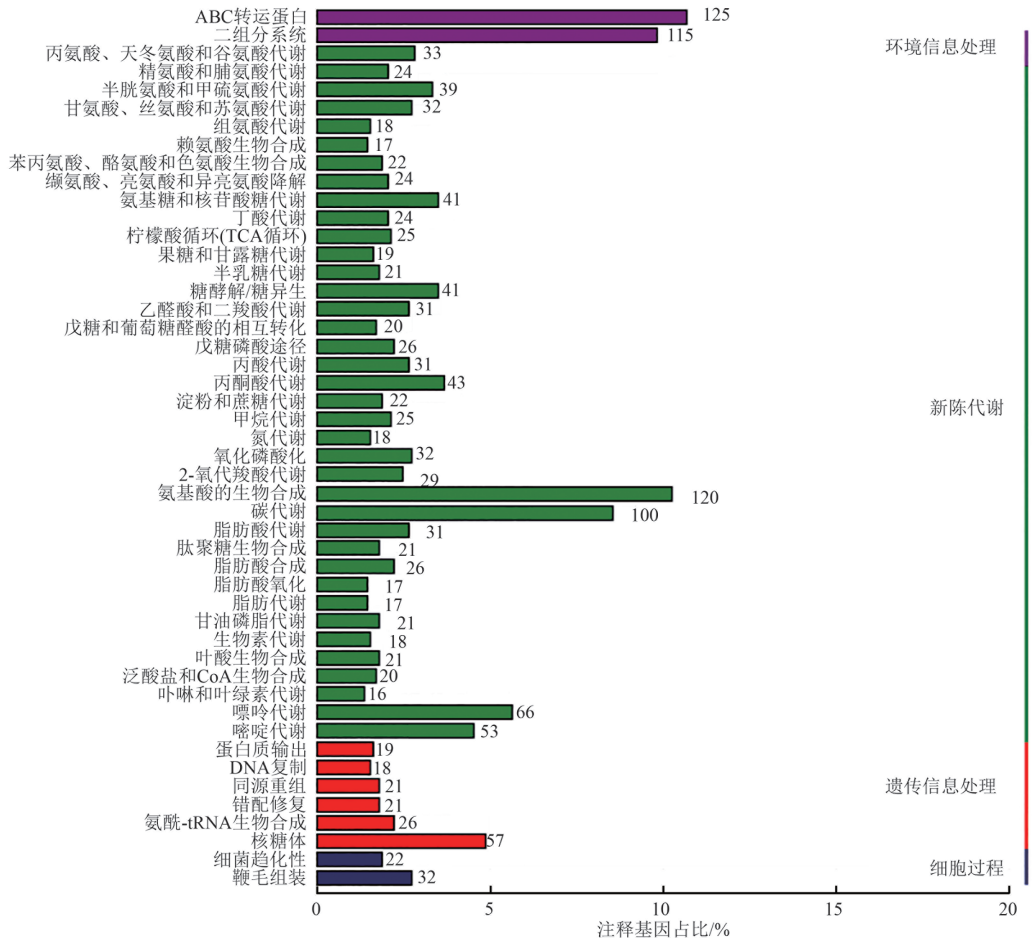
Fig. 2　Species distribution map of *B. velezensis* BR-1 sequences annotated in the Nr database



括号中第一个数字表示在eggNOG的功能注释中各功能比对到的序列数量；括号中第二个数字代表该功能的序列数量在总序列中的占比。

图 3　贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 eggNOG 功能基因分类统计图

Fig. 3　Statistics of categories of *B. velezensis* BR-1 functional genes annotated in the eggNOG database



数字表示在KEGG功能注释中各功能比对到的序列数量。

图 4　KEGG 注释分类统计图

Fig. 4　Statistics of pathways annotated in KEGG

表2　贝莱斯芽孢杆菌BR-1的抗生素抗性基因及其描述

Table 2　Antibiotic resistance genes of *B. velezensis* BR-1 and their descriptions

预测基因ID	抗性基因	抗性基因描述	抗性机制
GE002690	*clbA*	*clbA*是Cfr 23S核糖体RNA甲基转移酶基因	抗生素靶点改变
GE002719	*vmlR*	*vmlR*是在枯草芽孢杆菌中鉴定的ABC-F-ATP酶核糖体保护蛋白基因	抗生素靶点改变

2.1.3　毒力基因注释

细菌的毒力因子可分为4类：与宿主黏附和入侵相关、细菌分泌系统和效应物、毒素、铁离子系统[13]。通过将待测菌株基因组与VFDB中已知毒力基因进行同源性比较以识别潜在的毒力基因，即判断待测菌株是否含有一种或多种毒力基因亚型或病原体亚类[14]。通过VFDB数据库比对分析，在贝莱斯芽孢杆菌BR-1中共发现了715条毒力基因，其中712个假定的毒力基因与VFDB中毒力基因的相似度<70%，这表明与数据库中的基因相似度较低。Deng等[15]在评价植物乳植杆菌的安全性时检测到99个毒力相关因子，未检测到与毒素产生相关的基因，且检测出的基因都表现出较低的相似性。以相似度≥70%为筛选条件[16]，在菌株BR-1中发现3个潜在的毒力基因，见表3。其中*clpP*基因参与蛋白酶水解，是菌株在逆境条件下生长所必需的；*clpC*基因是促进巨噬细胞吞噬体早期逃逸的一种ATP酶基因，是黏附和侵袭所必需的；*capP*基因能够抑制吞噬作用，只有非常弱的免疫原性使细菌能够逃避宿主免疫防御。然而，这些基因可能并非真正的毒力基因，Wu等[17]评价格式乳杆菌LGZ1029的益生菌特性时，在LGZ1029的基因组中鉴定出许多适应性应激反应基因，包括7种通用应激反应蛋白基因和多种蛋白酶基因，如*clp*蛋白酶基因。在蛋白酶基因中，*clpC*、*clpB*和*clpE*能够参与热应激反应，以增强对人体胃肠环境的适应性。Safronova等[18]对具有杀虫活性、可用于生产植物保护生物制剂的苏云金芽孢杆菌商品株进行全基因组测序，检测到了10个管家基因以及*capC*、*capA*等8个毒力基因。说明上述3种潜在的毒力基因并非真正的毒力基因。另外，未检测到与毒素产生相关的基因，如编码Hbl、Nhe、细胞毒素K和cereulide-Ces的基因。

表3　贝莱斯芽孢杆菌BR-1的假定毒力基因及其描述

Table 3　Putative virulence genes of *B. velezensis* BR-1 and their descriptions

预测的基因ID	VFDB基因	VFDB基因功能	期望值	相似度/%	覆盖度/%
GE001566	*clpP*	ATP依赖的Clp蛋白酶蛋白水解亚基	3.919×10^{-100}	77.89	95.45
GE001685	*capP*	CapC，参与γ-聚谷氨酸的合成	9.130×10^{-78}	76.35	98.66
GE002283	*clpC*	内肽酶Clp ATP结合链C	0	78.36	99.14

2.2　抗生素药敏结果

抗生素药敏试验结果如表4所示，BR-1除了对青霉素具有表型耐药性外，对β-内酰胺类抗生素（氨苄西林）中度敏感，对头孢菌素类（头孢噻肟）、氨基糖苷类（阿米卡星、庆大霉素）、四环素类（四环素）、酰胺醇类（氯霉素、氟苯尼考）、磺胺类（复方新诺明）、硅诺酮类（环丙沙星）抗生素高度敏感。青霉素属于β-内酰胺类抗生素，各种β-内酰胺类抗生素的作用机制相似，即抑制青霉素结合蛋白（PBPs），阻碍细胞壁黏肽合成，使细菌细胞壁缺损，菌体膨胀裂解[19]。Wash等[20]从单作小麦根际分离的贝莱斯芽孢杆菌HU-91也对青霉素具有耐药性，特定抗生素的耐药性可能是细菌种类或属所固有的，这些菌株的耐药性具有一定的相似性，不影响其作为益生菌或生防菌的安全性。结合BR-1菌株的药敏试验结果，可判定其符合GB/T 41728—2022《微生物肥料质量安全评价通用准则》中对抗菌药物敏感试验的要求。

2.3　溶血试验结果

溶血活性一般是由病原菌引起的，因此是否缺乏溶血活性是判断菌株安全性的重要标准。当在羊血琼脂上培养时，BR-1菌株的溶血试验结果见图5。阳性对照金黄色葡萄球菌在羊血琼脂平

表 4 贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 对抗生素的敏感性

Table 4 Sensitivity of *B. velezensis* BR-1 to antibiotics

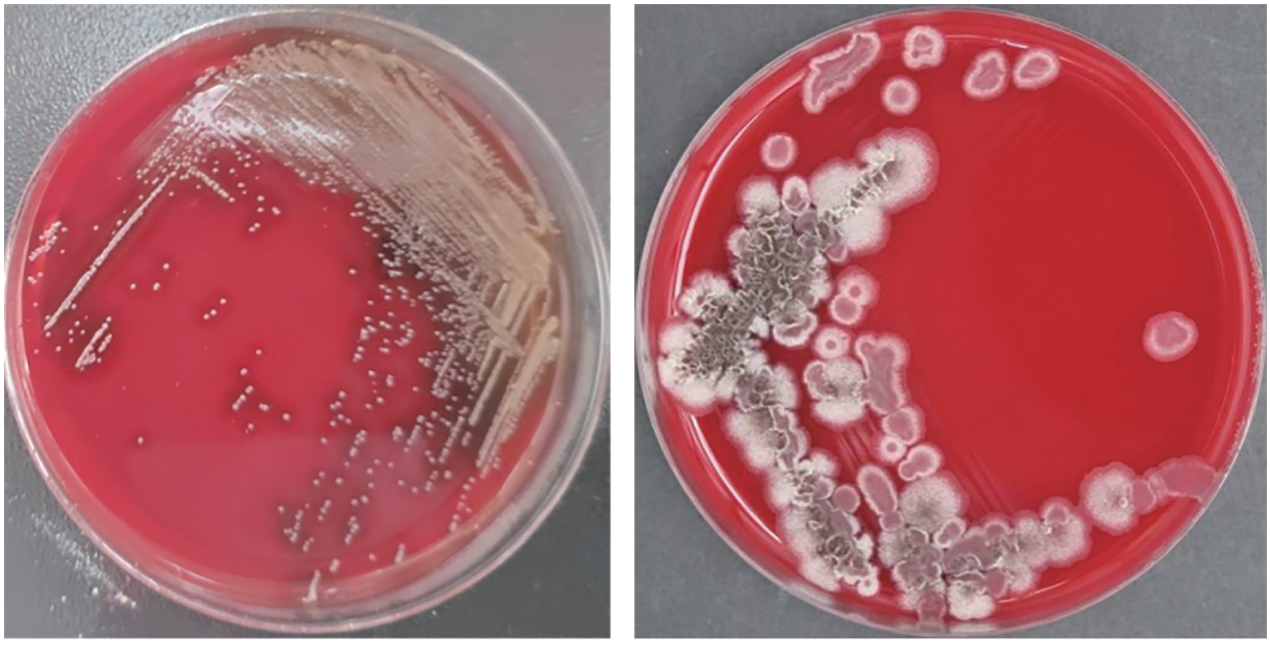
抗生素	抑菌圈直径/mm	敏感度
头孢噻肟	30.33	S
氨苄西林	13.10	I
青霉素	0	R
阿米卡星	21.70	S
庆大霉素	22.73	S
四环素	23.20	S
氯霉素	23.63	S
氟苯尼考	22.77	S
复方新诺明	16.43	S
环丙沙星	35.83	S

注：S 表示高度敏感；I 表示中度敏感；R 表示耐药。

板培养基上培养 18 h 后出现明显的溶血圈，诱导 β 溶血；而 BR-1 没有溶血圈，即 γ 溶血，表明贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 不具有溶血活性，这与上述其毒力基因的预测结果相符。

2.4 贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 的益生菌特性相关基因

贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 作为芽孢益生菌，在通过肠道时对胃肠中的酸、胆盐、渗透压、氧化胁迫具有耐受能力[21-22]。根据基因注释结果，贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 基因组中至少有 50 个基因编码与应激耐受性相关的蛋白质，见表 5。这些蛋白质主要包括：1）与酸耐受性相关的 F1F0-ATP 酶，它可以通过消耗细胞 ATP 将 H^+ 泵出细胞，以维持细胞内的 pH 稳定性并适应酸性环境[23]；2）在高温和低温条件下能被诱导的热休克蛋白和冷休克蛋白，在凝结芽孢杆菌的 13 002 个基因组中观察到类似的热休克蛋白基因和冷休克蛋白基因[24]；3）与胆盐抗性相关的胆盐水解酶；4）与渗透压耐受性相关的 ABC 转运蛋白基因，其编码 ABC 家族的多组分结合蛋白依赖的运输系统（OpuABCD），该系统在细胞内积累能够适应渗透环境的酸性和碱性化合物，以响应外部渗透压力[25-26]；5）氧化应激反应相关的蛋白质，包括谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、硫氧还蛋白还原酶（NADPH）等。过氧化氢酶和过氧化物酶直接参与过氧化氢和活性氧（ROS）的解毒，谷胱甘肽还原酶是一种重要的抗氧化酶，而谷胱甘肽是主要的抗氧化代谢产物之一[27]。此外，在 BR-1 中检测到了超氧化物歧化酶基因，该基因很少存在于其他益生菌中，如格氏乳杆菌 LGZ1029[17]。这些基因使 BR-1 能够在通过胃肠道时经受住胃肠道的恶劣环境，并初步证明了 BR-1 的益生菌特性。



(a) 金黄色葡萄球菌　　(b) 贝莱斯芽孢杆菌BR-1

图 5 贝莱斯芽孢杆菌 BR-1 的溶血试验

Fig. 5 Hemolysis test of *B. velezensis* BR-1

表5 贝莱斯芽孢杆菌BR-1的益生菌特性相关基因

Table 5 Probiotic property-related genes of *B. velezensis* BR-1

耐受力指标	基因ID	基因名称	基因功能
热应激	GE002764	*groES*	伴侣蛋白GroES
	GE000716	*dnaJ*	分子伴侣DnaJ
	GE000717	*dnaK*	分子伴侣DnaK
	GE000718	*GRPE*	分子伴侣GrpE
	GE002056	*dnaG*	分子伴侣HtpG
	GE002266	*HslO*	分子伴侣Hsp33
	GE000046	*HSP20*	HSP20家族蛋白
冷应激	GE000152	*CSP*	冷激蛋白质
	GE002674	*CSP*	冷激蛋白质
	GE003071	*CSP*	冷激蛋白质
离子和重金属应激	GE000680	*zurR*	Fur家族转录调节因子，锌摄取调节因子
	GE002463	*znuC*	锌转运系统通透酶蛋白
	GE002962	*corA*	镁转运蛋白
酸应激	GE001776	*atpD*	F型H^+/Na^+转运ATP酶β亚基
	GE001778	*atpA*	F型H^+/Na^+转运ATP酶α亚基
	GE001782	*atpB*	F型H^+转运ATP酶亚基*a*
	GE001777	*atpG*	F型H^+转运ATP酶亚基γ
	GE001779	*atpH*	F型H^+转运ATP酶亚基δ
	GE001780	*atpF*	F型H^+转运ATP酶亚基*b*
	GE001781	*atpE*	F型H^+转运ATP酶亚基*c*
	GE001775	*atpC*	F型H^+转运ATP酶亚基ε
胆盐应激	GE001967	*bsh*	胆盐水解酶、胆酰甘氨酸水解酶
	GE002493	*bsh*	胆盐水解酶、胆酰甘氨酸水解酶
	GE003351	*bsh*	胆盐水解酶、胆酰甘氨酸水解酶
渗透压应激	GE001481	*opuBD*	渗透保护剂运输系统渗透蛋白
	GE001483	*opuBD*	渗透保护剂运输系统渗透蛋白
	GE001486	*opuBD*	渗透保护剂运输系统渗透蛋白
	GE001488	*opuBD*	渗透保护剂运输系统渗透蛋白
	GE001482	*opuC*	渗透保护剂转运系统底物结合蛋白
	GE001487	*opuC*	渗透保护剂转运系统底物结合蛋白
	GE001484	*opuA*	渗透保护剂转运系统ATP结合蛋白
	GE001489	*opuA*	渗透保护剂转运系统ATP结合蛋白
氧化应激	GE001002	*tpx*	巯基过氧化物酶，非典型2-Cys过氧化物氧化还原酶
	GE000149	*gpx*	谷胱甘肽过氧化物酶
	GE002071	*ahpF*	谷胱甘肽过氧化物酶
	GE001966	*CAT*	过氧化氢酶
	GE001966	*CAT*	过氧化氢酶
	GE003041	*CAT*	过氧化氢酶
	GE002625	—	含锰过氧化氢酶
	GE002747	—	含锰过氧化氢酶
	GE003398	—	含锰过氧化氢酶
	GE003399	—	含锰过氧化氢酶
	GE000451	*trxB*	NADPH

续表

耐受力指标	基因ID	基因名称	基因功能
氧化应激	GE001297	*trxB*	NADPH
	GE001582	*trxB*	NADPH
	GE002499	*trxB*	NADPH
	GE000915	*trxA*	硫氧还蛋白
	GE000200	*trxA*	硫氧还蛋白
	GE000054	*SOD*	超氧化物歧化酶,Fe-Mn家族
	GE000673	*SOD*	超氧化物歧化酶,Fe-Mn家族
	GE000062	*SOD*	超氧化物歧化酶,Cu-Zn家族

注:“—”表示未报道。

3 结论

作者对稻米内生贝莱斯芽孢杆菌BR-1进行安全性评估,结果发现,BR-1菌株全基因组序列为1 071 550 432 bp,平均GC占比为46.3%,有4 027个蛋白质编码基因,占基因组的88.70%,平均长度为917 bp。尽管在BR-1基因组中预测到抗生素耐药基因*clbA*和*vmlR*,但菌株BR-1携带CRISPR-Cas系统,且不含质粒这一可移动原件。与存在于质粒上的耐药基因相比,其发生水平转移的风险较低,安全性较高。基因组中检测到3个潜在的毒力基因*clpP*、*clpC*和*capP*,但对人和动物不构成安全威胁,而且不含编码Hbl、Nhe、细胞毒素K和cereulide-Ces等产生毒素的基因。应激相关基因推测贝莱斯芽孢杆菌BR-1具有良好的胃肠耐受性、抗氧化活性和优异的益生菌特性。另外,GB/T 41728—2022《微生物肥料质量安全评价通用准则》附录A1(免做毒理学试验的菌株)中包括贝莱斯芽孢杆菌。因此初步探究了贝莱斯芽孢杆菌BR-1的益生菌特性,并推断该菌株符合国家的安全性评价要求,可以作为微生物肥料。

参考文献

[1] LIU G Q, KONG Y Y, FAN Y J, et al. Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 249: 20-24.

[2] WANG X H, WANG R, HE S, et al. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* wr8 secondary metabolites against *Penicillium* sp.[J]. Gene, 2024, 892: 147872.

[3] MA Y N, THEERAKULPISUT P, RIDDECH N. Pesticide tolerant rhizobacteria isolated from rice (*Oryza sativa*) overcomes the effects of salt and drought stress in pesticide contaminated condition[J]. Plant and Soil, 2023, 490(1): 521-539.

[4] 瞿子惠,刘歆,郑琳,等. 贝莱斯芽孢杆菌CL-4固态发酵对豆粕营养品质的影响[J]. 山东农业科学,2023,55(9):87-93.
QU Z H, LIU X, ZHENG L, et al. Effects of solid state fermentation with *Bacillus velezensis* CL-4 on nutritional quality of soybean meal[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(9): 87-93.(in Chinese)

[5] 赵艳,朱军莉,赖泽萍,等. 贝莱斯芽孢杆菌BR-1在拮抗稻米镰刀菌中的应用:202310608682.3[P]. 2023-10-06.

[6] 赖泽萍. 稻米镰刀菌毒素风险评估及生物防控技术初探[D]. 杭州:浙江工商大学,2023.

[7] 刘京京,陈学文,梁爱珍,等. 微生物肥料及其对黑土旱田作物应用的效果[J]. 土壤与作物,2023,12(2):179-195.
LIU J J, CHEN X W, LIANG A Z, et al. Microbial fertilizer and its mechanism on the growth and development of dry farmland crops in black soil[J]. Soils and Crops, 2023, 12(2): 179-195.(in Chinese)

[8] FU L M, NIU B F, ZHU Z W, et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(23): 3150-3152.

[9] POWELL S, FORSLUND K, SZKLARCZYK D, et al. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: 231-239.

[10] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance[J]. EFSA Journal, 2012, 10(6): 2740.

[11] 李虹梅,何明川,高熹,等. 生防菌贝莱斯芽孢杆菌MC2-1全基因组测序分析[J]. 南方农业学报,2022,53(12):3420-3432.
LI H M, HE M C, GAO X, et al. Whole genome sequencing analysis of a biocontrol bacterium *Bacillus*

velezensis MC2-1[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(12): 3420-3432. (in Chinese)

[12] TAO S, CHEN H M, LI N, et al. The application of the CRISPR-Cas system in antibiotic resistance [J]. Infection and Drug Resistance, 2022, 15: 4155-4168.

[13] CHEN L H, YANG J, YU J, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: 325-328.

[14] LIU B, ZHENG D D, JIN Q, et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47: 687-692.

[15] DENG L Q, LIU L M, FU T Y, et al. Genome sequence and evaluation of safety and probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* LPJZ-658[J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1620.

[16] BANG W Y, BAN O H, LEE B S, et al. Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of *Bacillus coagulans* IDCC 1201 isolated from green malt [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2021, 48(5/6): kuab026.

[17] WU J J, ZHOU Q Y, LIU D M, et al. Evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* LGZ1029 based on whole genome analysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 184: 114759.

[18] SAFRONOVA V I, SAZANOVA A L, et al. Whole genome sequencing and the comparative analysis of housekeeping locuses and virulence genes from the commercial strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity[J]. Agricultural Biology, 2015, 50(3): 332-338.

[19] BARLOW M. What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 532: 397-411.

[20] WASH P, YASMIN H, ULLAH H, et al. Deciphering the genetics of antagonism and antimicrobial resistance in *Bacillus velezensis* HU-91 by whole genome analysis[J]. Journal of King Saud University-Science, 2023, 35(11): 102954.

[21] KUEBUTORNYE F K A, LU Y S, WANG Z W, et al. Functional annotation and complete genome analysis confirm the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from the gut of Nile tilapia[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 163: 113541.

[22] 李佳莲，王涛，方芳. 耐盐乳酸菌的益生特性及其在酱油发酵中的应用[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：9-18.
LI J L, WANG T, FANG F. Probiotic properties of salt-tolerant lactic acid bacteria and their applications in soy sauce fermentation [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(5): 9-18. (in Chinese)

[23] PAPADIMITRIOU K, ALEGRÍA Á, BRON P A, et al. Stress physiology of lactic acid bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(3): 837-890.

[24] WU Y P, LIU D M, ZHAO S, et al. Assessing the safety and probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* 13002 based on complete genome and phenotype analysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112847.

[25] GUCHTE M, SERROR P, CHERVAUX C, et al. Stress responses in lactic acid bacteria [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 82(1/2/3/4): 187-216.

[26] 蒋雪薇，高兴彪，张旭旭，等. 盐胁迫下微生物在发酵食品中耐盐及促发酵机制研究进展[J]. 食品与机械，2024，40(6)：1-10.
JIANG X W, GAO X B, ZHANG X X, et al. Advances in salt tolerance and fermentation promotion mechanism of microorganisms in fermented foods under salt stress [J]. Food & Machinery, 2024, 40(6): 1-10. (in Chinese)

[27] LIANG M H, JIANG J G, WANG L, et al. Transcriptomic insights into the heat stress response of *Dunaliella bardawil* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 132: 109436.

（责任编辑：刘冬梅）