

研究报告

一株绵羊源粪肠球菌的分离鉴定、生理特性及全基因组分析

田黎明^{1,2}, 章焕^{2,3}, 张淑红², 张成^{2,3}, 邸腾刚^{2,3}, 常盟涵^{2,3}, 王冠², 高丰衣², 李少斌^{*1}, 杨广礼^{*1,2}

1 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2 商丘师范学院 生物与食品学院, 河南 商丘 476000

3 河南农业大学 动物科技学院, 河南 郑州 450046

田黎明, 章焕, 张淑红, 张成, 邸腾刚, 常盟涵, 王冠, 高丰衣, 李少斌, 杨广礼. 一株绵羊源粪肠球菌的分离鉴定、生理特性及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3202-3221.

TIAN Liming, ZHANG Huan, ZHANG Shuhong, ZHANG Cheng, DI Tenggong, CHANG Menghan, WANG Guan, GAO Fengyi, LI Shaobin, YANG Guangli. Isolation, identification, physiological characterization, and complete genome analysis of a sheep-derived *Enterococcus faecalis* strain[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3202-3221.

摘要: 【背景】粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的益生性和致病性均具有菌株特异性, 深入研究其生理特性和基因组特征对于评估其应用价值具有重要意义。【目的】探究大尾寒羊肠道内分离的1株粪肠球菌的生理特性及全基因组特征。【方法】采用改良 GAM 厌氧培养, 结合 16S rRNA 基因鉴定技术, 成功分离并鉴定目标菌株; 通过生长和产酸曲线分析其生理特性; 利用 Illumina 和 PacBio 高通量测序获取其全基因组序列, 并借助生物信息学工具进行基因组组装与注释; 此外, 对菌株的耐药性特征进行了系统分析。【结果】分离出1株无芽孢的革兰氏阳性球菌, 经 16S rRNA 基因鉴定为粪肠球菌; 该菌株在 2 h 内进入对数生长期, 6 h 达到生长高峰, 并且在实验初期就表现出产酸活性。全基因组分析显示, 该菌株由 1 条环状染色体和 2 条圆形质粒组成, 总长度 2 992 873 bp, G+C 含量 37.26%, 共编码 2 810 个基因。功能分析揭示其主要参与碳水化合物运输与代谢、翻译、核

资助项目: 国家自然科学基金(32202620); 河南省基础与前沿项目(102300410143, 132300410398); 河南省科技攻关项目(09210211088, 212102110001, 222102110422, 252102110076); 河南省科技厅产学研合作项目(18210700004); 河南省教育厅重点研发计划(25A230006); 甘肃省科技计划(23JDKA0010)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32202620), the Basic and Frontier Program of Henan Province (102300410143, 132300410398), the Key Scientific and Technological Project of Henan Province (09210211088, 212102110001, 222102110422, 252102110076), the Industry-Academia-Research Cooperation Program of Henan Provincial Department of Science and Technology (18210700004), the Key Research and Development Program of Henan Provincial Department of Education (25A230006), and the Science and Technology Program of Gansu Province (23JDKA0010).

*Corresponding authors. E-mail: LI Shaobin, lisb@gsau.edu.cn; YANG Guangli, guangliyang@163.com

Received: 2024-11-07; Accepted: 2025-02-07; Published online: 2025-03-12

糖体结构和生物发生、转录等关键生物过程；基因组还由 5 个基因组岛、3 个前噬菌体和 6 个 CRISPR/Cas 系统组成，这些可移动元件对其适应性进化具有重要作用；此外，还发现该菌株携带次级代谢产物的基因簇，与抑菌物质的产生密切相关。同时，菌株携带 413 个基因，可能通过干扰耐药基因和致病基因的表达，降低其毒力，从而抑制其致病性。药敏试验结果显示，该菌株对氨苄西林、哌拉西林、青霉素等抗生素高度敏感，对链霉素和红霉素呈中介敏感性，而对头孢氨苄、头孢呋辛钠等表现出耐受性。【结论】本研究分离获得 1 株绵羊源粪肠球菌(*E. faecalis*) LTSH1，其基因组富含代谢相关基因，有助于动物肠道内营养物质的消化吸收，还可通过次级代谢产物发挥抑菌作用；该研究结果为该菌株在微生物学、医学和畜牧业等领域的进一步研究与应用提供了重要的理论基础。

关键词：绵羊；粪肠球菌；分离鉴定；生理特性；基因组特征

Isolation, identification, physiological characterization, and complete genome analysis of a sheep-derived *Enterococcus faecalis* strain

TIAN Liming^{1,2}, ZHANG Huan^{2,3}, ZHANG Shuhong², ZHANG Cheng^{2,3}, DI Tenggeng^{2,3},
CHANG Menghan^{2,3}, WANG Guan², GAO Fengyi², LI Shaobin^{*1}, YANG Guangli^{*1,2}

1 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 College of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan, China

3 College of Animal Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

Abstract: [Background] The probiotic and pathogenic properties of *Enterococcus faecalis* are strain-specific, and probing into the physiological characteristics and genomic features is of great significance for evaluating the application value of *E. faecalis*. **[Objective]** To investigate the physiological characteristics and genomic features of a strain of *E. faecalis* isolated from the intestine of Large-Tailed Han sheep. **[Methods]** The strain was isolated by anaerobic culture in the modified GAM medium and identified by 16S rRNA gene sequencing. Its physiological characteristics were analyzed through growth and acid production curves. The genomic sequence of this strain was obtained by Illumina and PacBio high-throughput sequencing, which was followed by sequence assembly and analysis by bioinformatics tools. Additionally, the antibiotic resistance of this strain was examined. **[Results]** A non-spore-forming, gram-positive coccus was successfully isolated and identified as *E. faecalis* based on 16S rRNA gene sequencing results. The strain entered the logarithmic phase at the time point of 2 h, reached its growth peak at the time point of 6 h, and exhibited acid production from the early stage of the experiment. The genome of the strain consisted of one circular chromosome and two circular plasmids, with a total length of 2 992 873 bp, G+C content of 37.26%, and 2 810 genes. Functional analysis indicated that the genes were primarily involved in key biological processes, such as carbohydrate transport and metabolism, translation, ribosome structure and biogenesis, and transcription. The genome contained five genomic islands, three prophages, and six

CRISPR/Cas systems, which played significant roles in the adaptive evolution of the strain. Additionally, gene clusters related to the synthesis of secondary metabolites were identified, closely associated with the production of antimicrobial substances. The strain carried 413 genes, which can reduce its virulence by interfering with the expression of resistance and pathogenic genes, thereby inhibiting its pathogenicity. Antimicrobial susceptibility test results showed that the strain was highly sensitive to ampicillin, piperacillin, and penicillin, moderately sensitive to streptomycin and erythromycin, and resistant to cefalexin and cefuroxime sodium. **[Conclusion]** We successfully isolated a sheep-derived strain *E. faecalis* LTHS1, whose genome was rich in metabolism-related genes. This strain can aid in the digestion and absorption of nutrients in the animal gut and exert antimicrobial effects through secondary metabolites. These findings provide a theoretical basis for the research and application of this strain in microbiology, medicine, and animal husbandry.

Keywords: sheep; *Enterococcus faecalis*; isolation and identification; physiological characteristics; genome characteristics

肠道微生物群是寄居在动物肠道内的一类复杂微生物生态系统。这些微生物群与宿主存在密切互动关系,对宿主的健康和疾病状态有着深远的影响^[1]。肠道菌群不仅参与营养物质的吸收代谢^[2]、免疫系统的发育和调节^[3],还与多种疾病的发生密切相关,如肥胖、糖尿病、心血管疾病以及神经退行性疾病等^[2]。

肠球菌属(*Enterococcus*)是一类典型的革兰氏阳性、兼性厌氧球菌,在人类和动物肠道内普遍存在。肠球菌在临床上主要表现为致病菌,是宿主感染的主要病原体之一^[4],可引起尿路感染、菌血症、腹腔感染、口腔疾病、心内膜炎以及导管相关感染等^[5]。然而,肠球菌也具有一定的益生潜力^[6]。有研究表明,它们能够耐受胃酸和胆盐,并能抑制致病菌,增强免疫反应。此外,肠球菌还能调节脂质代谢,降低胆固醇,预防心血管疾病;还可以通过改善肠道屏障来增强对有害物质的防御^[7-10]。

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)作为肠球菌属的重要一员,其益生性和致病性均具有菌株特异性^[6]。不同菌株的益生特性可能存在差异,而其致病性也与其生物膜形成、毒力因子表达等因素密切相关。因此,对特定粪肠球菌菌株的生理特性和基因组信息了解,有助于全面评估

其益生性和安全性。通过体外试验和基因组学分析相结合,可以准确地评估粪肠球菌的潜在益生性和安全性^[11],为食品、医药、添加剂等领域的应用提供科学依据。本研究基于前期研究基础,通过传统培养方法分离粪肠球菌,并进行生理特性和全基因组分析,深入探讨其在肠道中的作用机制,以期粪肠球菌的合理应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 样品

采自河南省郑县 24 月龄健康雄性大尾寒羊回肠内容物。所有操作均符合实验伦理学要求,动物实验经商丘师范大学伦理委员会批准(批准号:商[2022]24 号)。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

改良 GAM 培养基,青岛海博生物技术有限公司;PBS 溶液,北京智迈星生物科技有限公司;革兰氏染液与药敏纸片,常德比克曼生物科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。冷冻离心机和医用离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;荧光倒置显微镜,尼康精机(上海)有限公司;扫描电镜,日立高新技术公司。

1.3 菌株的分离、纯化及形态学鉴定

将-80 °C冻存内容物,解冻后按1%接种量接种至1 mL改良GAM培养基中,37 °C静置培养24 h;随后将其进行10倍系列稀释至 10^{-6} 梯度,分别取10 μ L各梯度菌悬液,均匀涂布于固体改良GAM平板,37 °C恒温培养24–48 h后观察菌落生长;最后挑取目标单菌落,使用同种固体培养基进行划线纯化,获得纯化菌株并编号(S1)保存。

将纯化所得菌株经革兰氏染色后,利用荧光倒置光学显微镜(100 $\times$)观察形态特征,并且通过扫描电镜来进一步观测其外部形态。

1.4 菌株 S1 生长特性的测定

1.4.1 生长曲线的测定

以1%接种量将菌株S1接种于改良GAM培养基,接种相同体积的无菌生理盐水为空白对照,每组3个重复。37 °C培养,以时间(h)为横坐标,OD₆₀₀值为纵坐标,绘制36 h生长曲线。

1.4.2 产酸曲线的测定

以0.4%接种量将菌株S1接种于改良GAM培养基,接种相同体积的无菌生理盐水为空白对照,每组3个重复。37 °C培养,以时间(h)为横坐标,pH值为纵坐标,绘制36 h产酸曲线。

1.5 16S rRNA 基因鉴定

按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取菌株S1的DNA。采用16S rRNA基因的通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应体系(50 μ L):上游引物(10 μ mol/L) 2 μ L,下游引物(10 μ mol/L) 2 μ L,模板DNA 1 μ L, 2 $\times$ Hieff™ PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56.1 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 10 min; 4 °C保存。样本通过琼脂糖凝胶电泳技术进行分析,确认合格后委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行DNA序列测定。测序结果用BioEdit拼接,并在NCBI进行比对分析。

1.6 菌株 S1 基因组的测序、组装和质控分析

研究采用de novo测序技术对Illumina和PacBio生成的数据进行处理,筛选平均Q-score>20的reads用于后续分析。利用Unicycler v0.4.8对reads进行组装,并通过pilon v1.22软件进行序列校正,判断环状基因组的起始位点;基因组圈图用Circos^[12]软件绘制。

1.7 生物信息学分析

1.7.1 菌株 S1 基因预测和功能注释

采用多组生物信息学工具对菌株S1基因组进行系统解析。基因结构预测中,原核编码序列由Prodigal v2.6.3^[13]识别,质粒基因通过GeneMarkS^[14]预测,tRNA-Scan-SE v2.0和Barrnap分别完成tRNA^[15]和rRNA^[16]注释。功能注释整合DIAMOND、HMMER和BLASTp工具^[17],联合利用非冗余蛋白质序列数据库(non-redundant protein sequence database, NR)、Swiss-Prot、蛋白质家族(protein families, Pfam)、同源蛋白簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)、基因本体论(gene ontology, GO)、碳水化合物活性酶数据库(carbohydrate-active enZymes database, CAZy)及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库,系统开展蛋白质功能分类与代谢通路解析。次级代谢产物合成基因簇通过antiSMASH^[18]平台深度挖掘,结合保守结构域分析和同源基因簇比对,推测潜在抗菌活性物质的生物合成途径,为阐明菌株遗传特征与代谢潜能提供基础。

1.7.2 菌株 S1 的系统发育关系分析

基于菌株S1的16S rRNA基因和31个看家基因序列,筛选出与其亲缘关系最近的20个基因序列。利用MEGA 6.0^[19]软件选择邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树,其他参数采用系统默认设置。

1.7.3 菌株 S1 的可移动元件预测和分析

菌株S1的基因组岛、前噬菌体和CRISPR/Cas分别用IslandViewer^[20]、Phage_Finder^[21]和Minced

进行预测。

1.7.4 菌株 S1 的安全性分析

通过综合的抗生素抗性综合数据库 (comprehensive antibiotic resistance database, CARD)^[22]和 ResFinder 数据库^[23]进行抗生素耐药基因分析。利用病原菌毒力因子数据库 (virulence factors of pathogenic bacteria database, VFDB) 和病原-宿主相互作用 (pathogen-host interactions, PHI) 数据库进行毒力基因分析。在基因序列比对过程中, 参数设定如下: 覆盖阈值不低于 80% 或 60%, 匹配率需达 80% 以上, 同时 E 值在 1×10^{-5} 范围内。

1.8 药敏试验

采用药敏纸片琼脂扩散法评估菌株 S1 对 20 种抗生素的敏感性, 包括青霉素、头孢类(氨苄、呋辛钠、哌酮、曲松、他啉、唑啉)、万古霉素(抑制细胞壁合成); 阿米卡星、庆大霉素、四环素类(四环素、强力霉素)、红霉素、林可霉素(抑制蛋白质合成); 米诺环素(抑制核酸合成); 多粘菌素 B (干扰细胞质膜功能)。药敏结果判定依据参考文献[24]。

1.9 统计分析

所有数据使用 Excel 2021 进行整理、筛选。使用 SPSS 27.0 进行数据统计分析。使用 GraphPad 9.0 和 Origin 2024 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定结果

经分离培养, 菌株 S1 菌落呈圆形, 表面凸起, 色泽微白且均匀一致, 整体呈不透明特性(图 1A)。革兰氏染色镜检, 可见蓝紫色球菌(图 1B), 扫描电镜观察显示, 该菌体呈短链状或成对排列, 无运动能力, 无芽孢(图 1C)。这些特征与粪肠球菌高度一致^[25]。

2.2 菌株 S1 的生长特性测定结果

2.2.1 生长曲线测定结果

如图 2 所示, 菌株 S1 的生长曲线揭示了其在不同时间阶段的生长动态。在培养初期(0–2 h), 菌株 S1 主要处于适应期, 此阶段菌株的生长速

率相对较缓。随后, 在 2–6 h, 菌株 S1 进入对数生长期, 表现为指数增长模式, 这一阶段菌株的生长速率显著加快。在 6–12 h, 菌株 S1 的生长进入稳定期, 其相对生长速率变化较为缓慢。从 12 h 起菌株的 OD_{600} 值显著下降, 表明菌株 S1 已进入衰退期。

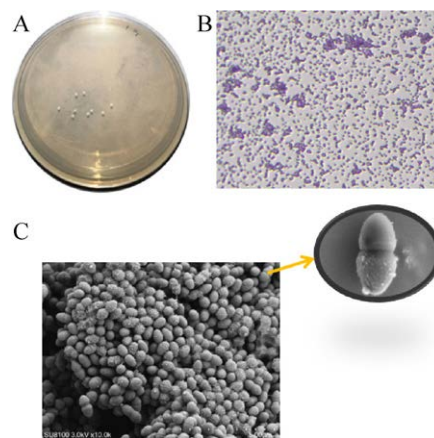


图 1 分离菌株的形态与超微结构 A: 平板上菌落形态; B: 革兰氏染色结果; C: 扫描电镜结果。
Figure 1 Morphological and ultrastructure of the isolated strain. A: Colony morphology on the tablet; B: Gram staining results; C: Scanning electron microscopy results.

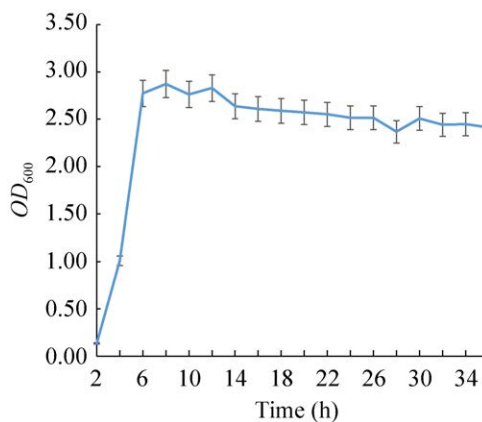


图 2 菌株 S1 的生长曲线图
Figure 2 Growth curve of strain S1.

2.2.2 产酸曲线测定结果

根据图 3 所示, 实验初期(0–8 h), pH 值从 7.31 迅速下降至 5.87, 这一变化暗示了在此时间段内菌株 S1 的产酸活性达到峰值。随后, 从 8 h

至实验结束(36 h), pH 值维持在 5.87–5.96, 这表明菌株 S1 的产酸活性进入稳定阶段, 其产酸速率已达到动态平衡。

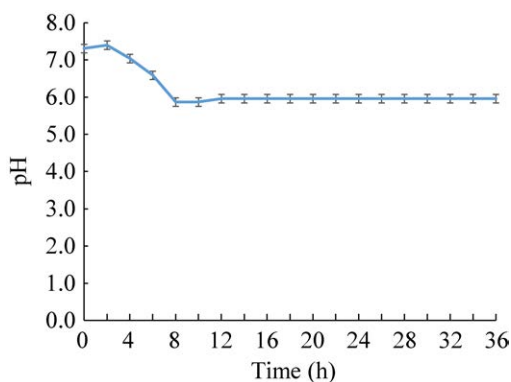


图3 菌株 S1 的产酸曲线图

Figure 3 Acid production profile of strain S1.

2.3 16S rRNA 基因鉴定结果

将拼接后的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库进行比对分析。比对结果显示, 所测序列与数据库中 *Enterococcus faecalis* 基因序列具有高度同源性; 基于此, 我们进一步对其全基因组进行测序, 以深入探究该菌株的遗传特征。

2.4 菌株 S1 的基因组信息

菌株 S1 全基因组大小为 2 992 873 bp, 平均 G+C 含量 37.26%, 由 1 条环形染色体与 2 条圆形质粒组成(图 4)。ChrI (图 4A、4B) 大小为 2 828 172 bp, G+C 含量为 37.56%; 质粒 I (图 4C) 大小为 90 581 bp, 质粒 II (图 4D) 大小为 74 120 bp, G+C 含量分别为 32.17% 和 32.18%。该菌株包含编码基因 2 810 个, 其中 ChrI 由 2 631 个编码基因、60 个 tRNA 基因和 12 个 rRNA 基因组成; 质粒 I 含有 98 个编码基因, 质粒 II 含有 81 个编码基因。

2.5 菌株 S1 的系统分类

为明确菌株 S1 在粪肠球菌属中的系统发育位置, 本研究对 16S rRNA 基因和 31 个保守基因序列进行分析, 构建了菌株 S1 的系统发育树, 由图 5A 与图 5B 可知, 菌株 S1 与 *Enterococcus faecalis* GCA 000392875.1 具有密切的亲缘关系,

并显示出最短的遗传距离。基于这些分析结果, 我们确认菌株 S1 属于 *Enterococcus faecalis* 物种, 并依据其与参考序列的高相似性, 将其命名为 *Enterococcus faecalis* LTHS1。绵羊来源的 *E. faecalis* 的全基因组序列已存入 NCBI 的序列读取档案数据库项目 ID: PRJNA1227748。

2.6 菌株 S1 的功能注释结果

我们运用 NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO、CAZy、KEGG 等数据库对预测出的 2 810 个编码基因执行了功能注释工作。结果显示(表 1), NR 数据库注释覆盖率最高, 达 99.79%; COG、GO、KEGG 数据库分别注释了 2 225、1 744、1 995 个基因, 覆盖率分别为 79.18%、62.06%、71.00%。CAZy 数据库注释比例最低, 仅 3.24%。

2.6.1 COG 功能注释和分类

菌株 S1 的 COG 注释结果显示(图 6), 该菌株中共有 2 225 个基因被注释, 占总基因数的 79.18%, 这些基因归为四大类, 23 个亚类。其中, 一般功能预测基因(186, 8.36%)和未知功能基因(138, 6.20%)占注释基因的 14.56%。注释基因中丰度较高的三类基因分别是: 碳水化合物运输与代谢(264, 11.87%), 翻译、核糖体结构和生物发生基因(226, 10.16%), 参与转录过程基因(215, 9.66%)。

2.6.2 GO 功能注释和分类

GO 数据库功能注释显示, 菌株 S1 的 1 744 个基因被注释, 占基因组总数的 62.06%。涵盖细胞成分、分子功能和生物过程三大类。其中: 生物过程共有 923 个基因(图 7A), 磷酸化过程基因数量最高(84, 2.99%), 其次是磷酸烯醇式丙酮酸依赖性糖磷酸转移酶系统(78, 2.78%)、翻译(62, 2.21%)、碳水化合物代谢过程(43, 1.53%)和蛋白质水解(41, 1.46%)也较为显著; 细胞成分共有 945 个基因(图 7B), 膜结构基因数量最多(354, 12.6%), 其次是细胞质(254, 9.04%)、质膜(216, 7.69%)、核糖体(48, 1.71%)和核糖核蛋白复合物(42, 1.49%); 分子功能共有 1 385 个基因(图 7C),

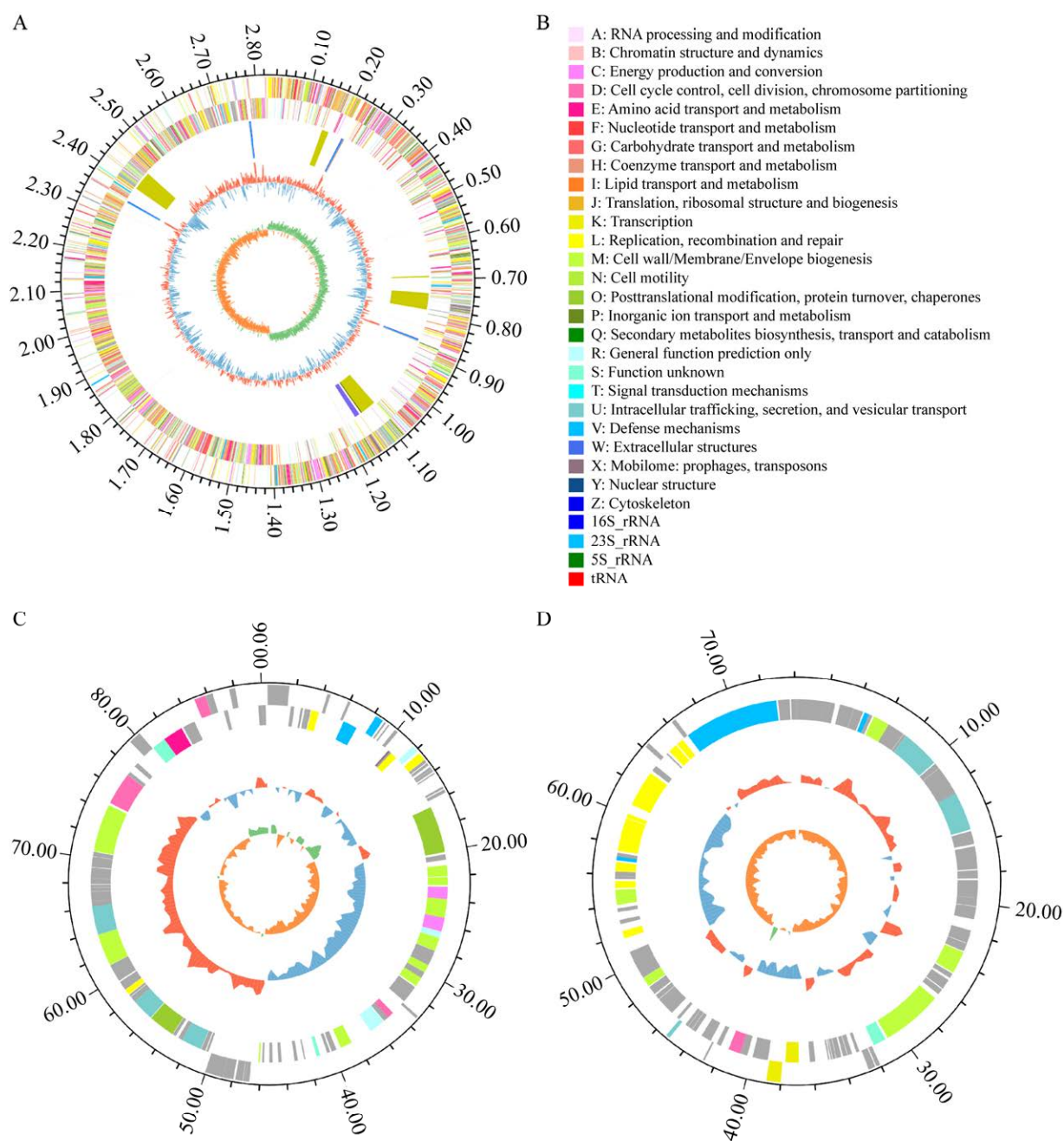


图 4 菌株 S1 的基因组环形结构图 A: 染色体; B: 对应 COG 的不同功能类别; C 和 D: 质粒。该圆形图的最外侧圆环展示了基因组的规模; 其后的第 2 个和第 3 个圆环分别描绘了正链和负链上的编码基因, 不同的颜色标识了 COG 的不同功能类别; 第 4 个圆环标注了 rRNA 和 tRNA 的位置; 第 5 个圆环反映了 G+C 含量; 而最内侧的圆环则显示了 G+C-Skew 值。

Figure 4 Genomic circular map of strain S1. A: Chromosome; B: Various functional categories of COGs; C and D: Plasmids. The outermost ring of the circular diagram illustrates the size of the genome, while the second and third rings depict the coding gene on the positive and negative strands, respectively, using different colors to denote different functional categories of COGs. The fourth ring marks the locations of rRNA and tRNA, the fifth ring shows the G+C content, and the innermost ring displays the G+C-skew value.

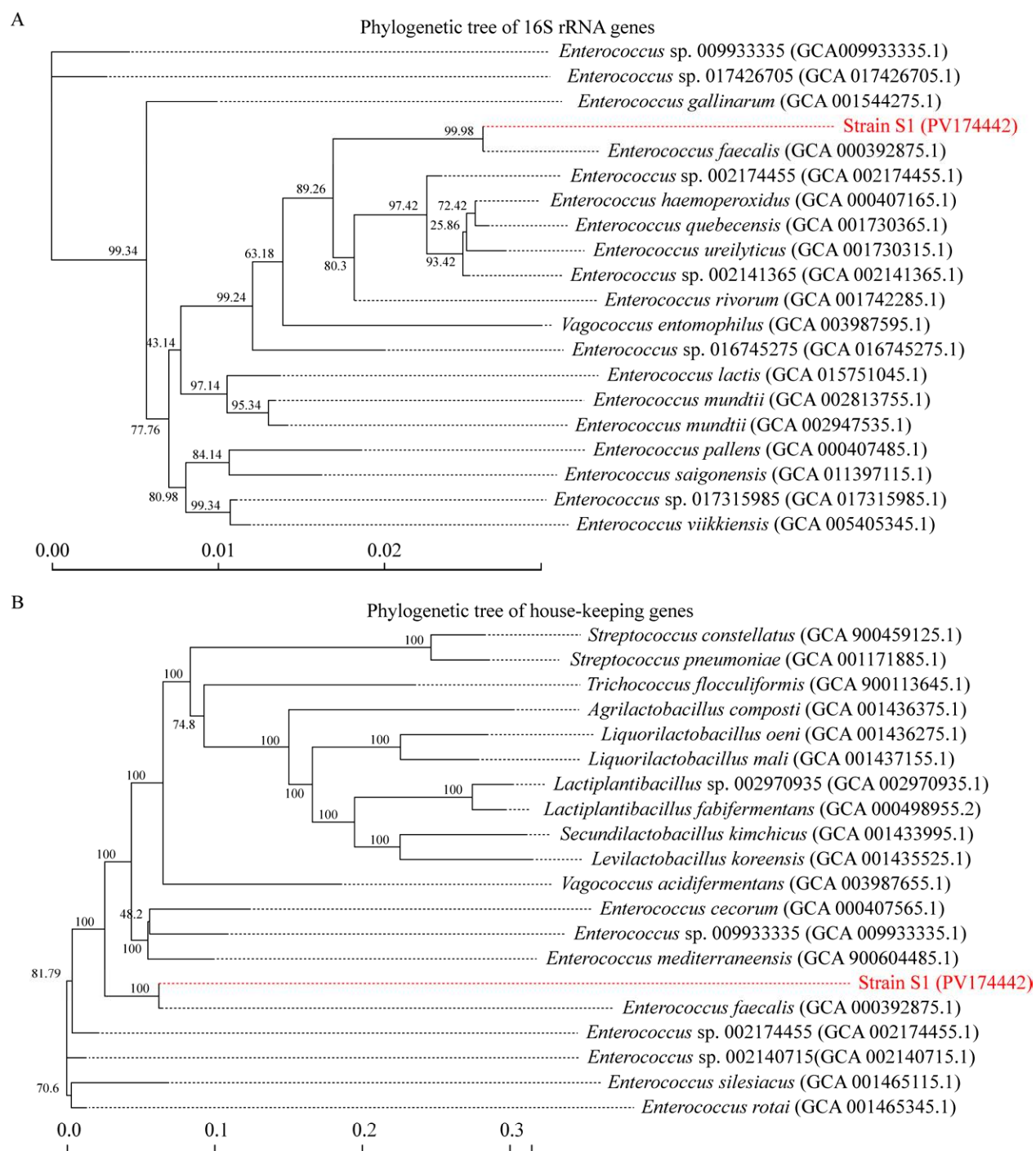


图5 基于16S rRNA基因(A)和核心基因组(B)构建的菌株S1的系统发育树 比例尺表示遗传距离度量单位；各分支节点处的数值源自1 000次重复抽样检测所得到的自举分析置信度值；括号内数字代表各菌株的GenBank登录号。

Figure 5 Phylogenetic tree of strain S1 constructed based on 16S rRNA gene (A) and core genome (B). The scale bars represent the units of genetic distance, while the numbers on branches indicate bootstrap confidence values derived from 1 000 repeated sampling tests, the numbers in parentheses represent the GenBank accession numbers of each strain.

表 1 菌株 S1 基因组在不同数据库中的注释量
Table 1 Annotation counts of the strain S1 genome in various databases

数据库类型	基因数量	比例
Types of database	Gene number	Percentage (%)
NR	2 804	99.79
Swiss-Prot	2 072	73.74
Pfam	2 385	84.88
COG	2 225	79.18
GO	1 744	62.06
CAZy	91	3.24
KEGG	1 995	71.00

ATP 结合功能基因最为丰富(253, 9%), 其次是 DNA 结合(177, 6.3%)、金属离子结合(121, 4.31%)、水解酶活性(89, 3.17%)、ATP 水解活性(89, 3.17%)、跨膜转运蛋白活性(82, 2.92%)、转移酶活性(68, 2.42%)和 DNA 结合转录因子活性(68, 2.42%)。

2.6.3 CAZy 功能注释和分类

通过 CAZy 数据库分析发现, 菌株 S1 共有 91 个基因注释于碳水化合物活性酶(图 8)。这些基因编码的蛋白质涵盖了多种酶类, 包括 6 个辅助氧化还原酶基因、17 个碳水化合物酯酶基因、46 个糖苷水解酶基因、21 个糖苷转移酶基因, 以及 1 个多糖裂解酶基因。这些基因家族中, 糖苷水解酶家族和糖苷转移酶家族比例最高, 分别为 50.55% 和 23.08%。

深入分析这些基因家族后, 我们发现菌株 S1 基因组中包含了一系列重要酶编码基因(表 2), 它们在生物分解过程中发挥着不可或缺的作用。其中, 菌株 S1 携带了能够合成几丁质酶基因, 这些酶属于 GH18 和 GH23 家族, 对生物体内的几丁质分解具有重要作用。进一步分析发现, 与木聚糖分解密切关联的酶基因主要来自 GH18 家族。此外, 菌株还有一系列能够分解肽

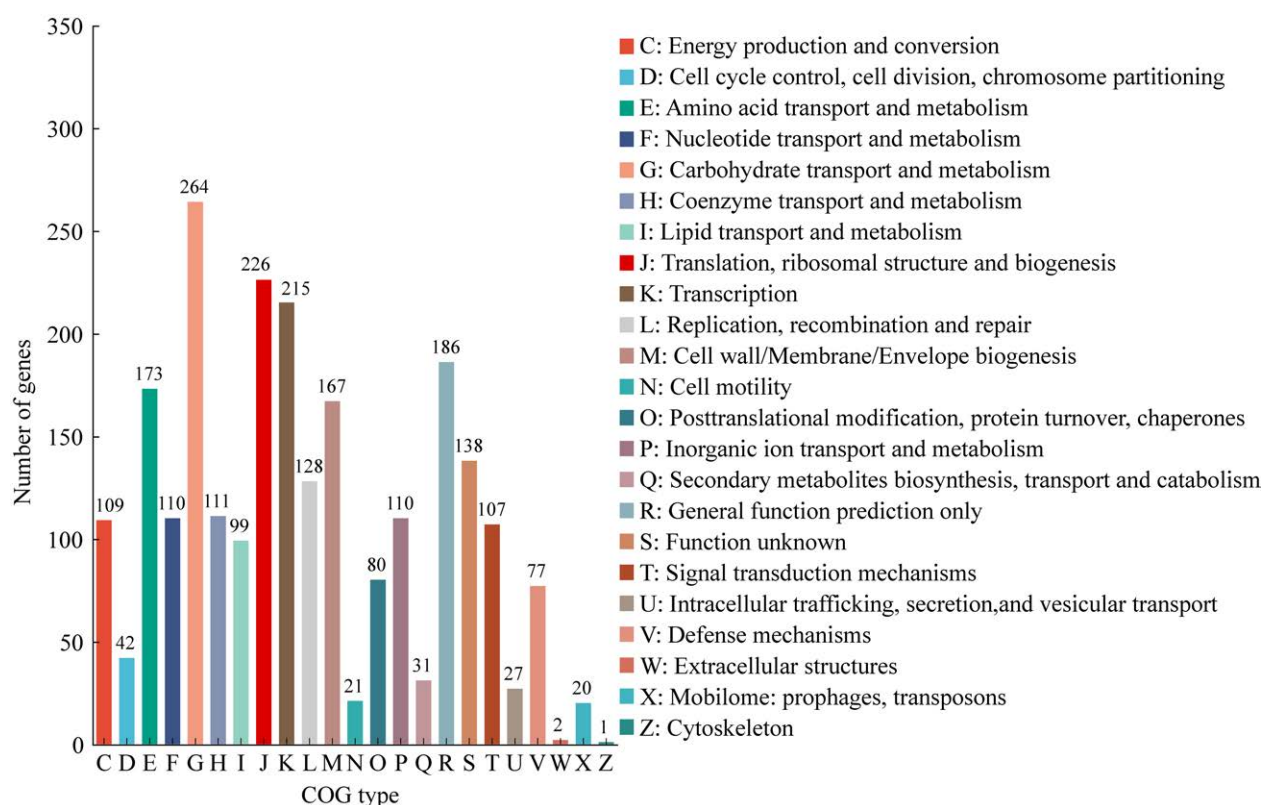


图 6 菌株 S1 基因组的 COG 功能注释结果

Figure 6 COG functional annotation results of the strain S1 genome.

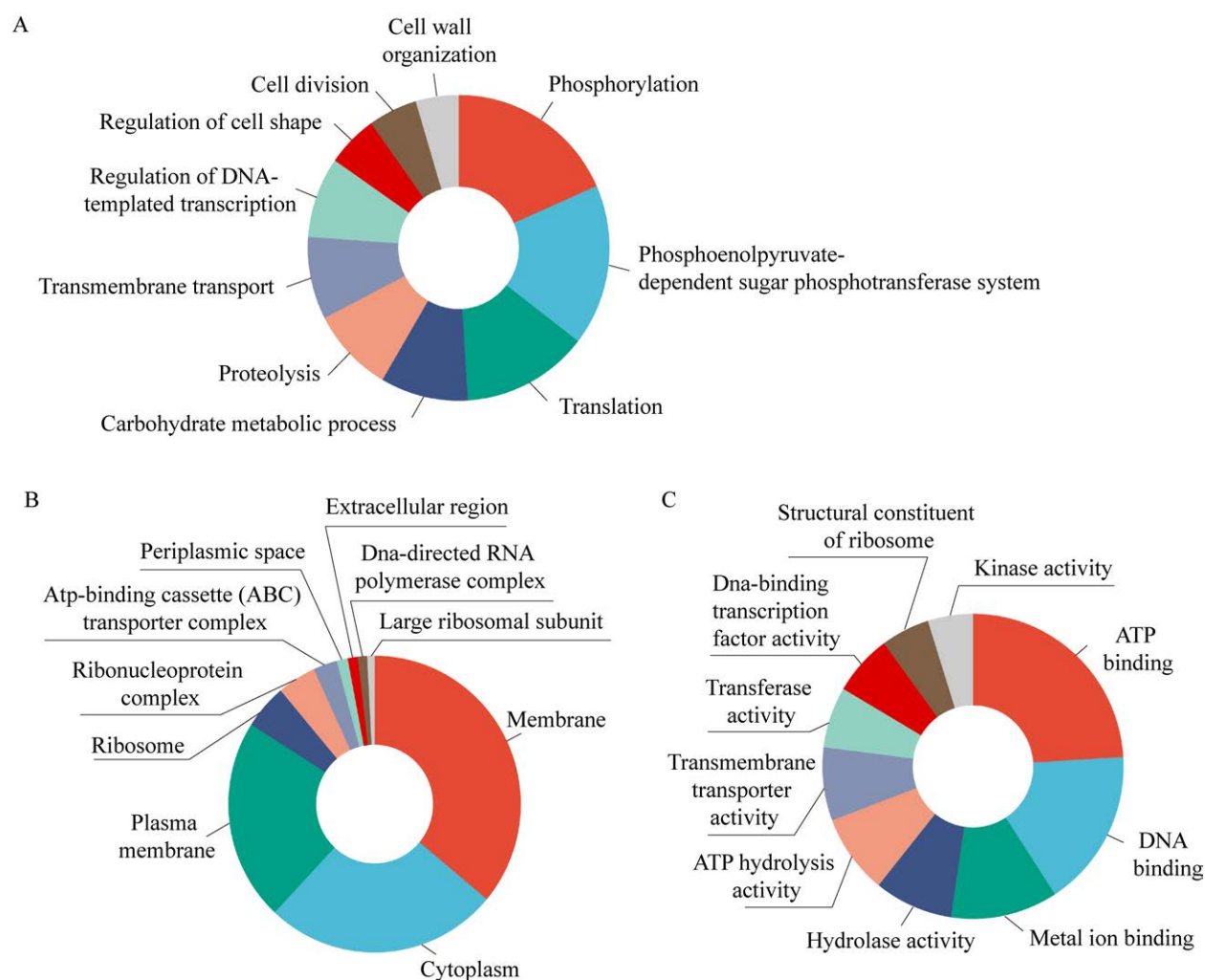


图 7 GO 注释分类统计图 A: 生物过程; B: 细胞成分; C: 分子功能。每个饼图显示每个主要类别中的前 10 个 GO 条目。

Figure 7 GO annotation category statistics chart. A: Biological processes; B: Cellular components; C: Molecular functions. Each pie chart displays the TOP 10 GO terms in each main category.

聚糖的酶基因, 如 GH18、GH23、GH73 和 CE4 家族, 这表明菌株具有处理多种复杂生物大分子的能力。葡聚糖分解方面, 菌株同样显示出了强大的潜力, 具有 GH1 和 GH3 家族的酶基因。尤其是菌株编码了溶菌酶, 其相关酶基因分布在 GH18、GH23、GH25 和 GH73 等多个家族, 这不仅体现出菌株在微生物界多样性的适应性, 也预示着其在生物制药等领域的应用前景。在植物细胞壁分解方面, 菌株同样具备关键的酶基因, 例如果胶乙酰酯酶的 CE12 家族和乙酰木

聚糖酯酶的 CE1、CE3、CE4 和 CE7 家族, 这些都是植物细胞壁分解过程中不可或缺的酶类。此外, 菌株还包含 α -淀粉酶 GH126 家族和 β -葡萄糖苷酶的 GH1、GH3 和 GH4 家族基因, 这些酶在淀粉和糖类物质分解中发挥着关键作用。通过整合这些基因信息, 我们可以推断出菌株在基因组组成上展现出了分解几丁质、葡聚糖、木聚糖及利用肽聚糖等多种生物大分子的潜能, 体现出该菌株在绵羊肠道中具有重要的作用。这种潜能不仅凸显了菌株在处理复杂

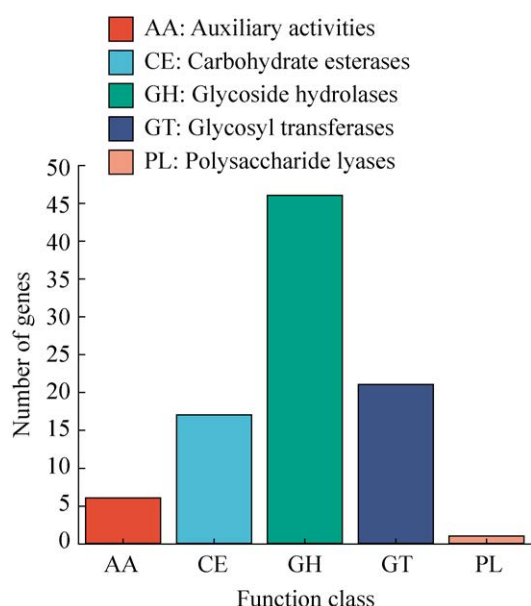


图8 CAZy 数据库比对分析结果

Figure 8 CAZy database alignment analysis results.

有机物质方面的能力,也预示着其在未来生物技术应用方面,尤其是在促进植物细胞壁分解、释放植物营养物质及提高动物营养吸收效率方面的广阔应用前景。

2.6.4 KEGG 功能注释和分类

KEGG 通路分析显示,1 995 个基因活跃在 40 个关键代谢通路中(图 9),这些基因在生物代

谢中发挥着多重作用。通路分为细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢和有机体系统等六大类别。细胞过程涉及 97 个基因,主要关联原核生物的细胞群落(71)和细胞生长死亡(16)。环境信息处理包括膜运输(217)、信号转导(83)和信号分子相互作用(1)。遗传信息处理涵盖 195 个基因,以翻译过程为主(90)。人类疾病类别中的 109 个基因涉及 10 个亚类,其中抗微生物药物耐药性尤为突出(43)。新陈代谢类别基因最多,达 1 582 个,覆盖代谢途径广泛。有机体系统类别中的基因主要与内分泌(14)、衰老(6)和消化系统(4)相关,这些系统对生物体稳态和环境适应至关重要。

2.6.5 次级代谢产物合成分析

菌株 S1 在染色体上有 3 个次级代谢产物基因簇,分别是芳香多烯、RiPP 识别元件和环内酯自诱导物。其中,芳香多烯包含基因数量最多(38 个),主要有生成氨基酸腺苷化域蛋白、醛/酮还原酶、ATP 结合蛋白、3-羟基酰基-ACP 脱水酶 FabZ、氨基酸腺苷化域蛋白和乙酰辅酶 A 羧化酶 β 亚基域蛋白等基因。

2.7 菌株 S1 可移动元件

在细菌持续演化的历程中,为适应环境变化并增强自身生存竞争力,它们常常吸收外来的

表2 菌株 S1 的 CAZy 统计结果

Table 2 CAZy annotation statistics for strain S1

碳水化合物活性酶家族 Carbohydrate-active enzyme family	基因数 Number of genes	基因亚家族(基因数) Gene subfamily (number of genes)
辅助氧化还原酶 Auxiliary activities, AA	6	AA3 (2), AA6 (1), AA7 (1), AA10 (2)
碳水化合物酯酶 Carbohydrate esterases, CE	17	CE1 (7), CE3 (1), CE4 (1), CE7 (2), CE9 (2), CE10 (3), CE12 (1)
糖苷水解酶 Glycoside hydrolases, GH	46	GH1 (8), GH2 (1), GH3 (1), GH4 (1), GH13_20 (1), GH13_31 (3), GH18 (2), GH20 (1), GH23 (3), GH25 (1), GH32 (1), GH35 (2), GH38 (1), GH63 (1), GH65 (2), GH73 (2), GH88 (2), GH92 (1), GH94 (1), GH101 (1), GH105 (1), GH109 (4), GH125 (1), GH126 (1), GH136 (1), GH154 (2)
糖苷转移酶 Glycosyl transferases, GT	21	GT2 (8), GT4 (3), GT8 (2), GT19 (1), GT21 (1), GT26 (2), GT27 (2), GT28 (1), GT41 (1)
多糖裂解酶 Polysaccharide lyases, PL	1	PL30 (1)

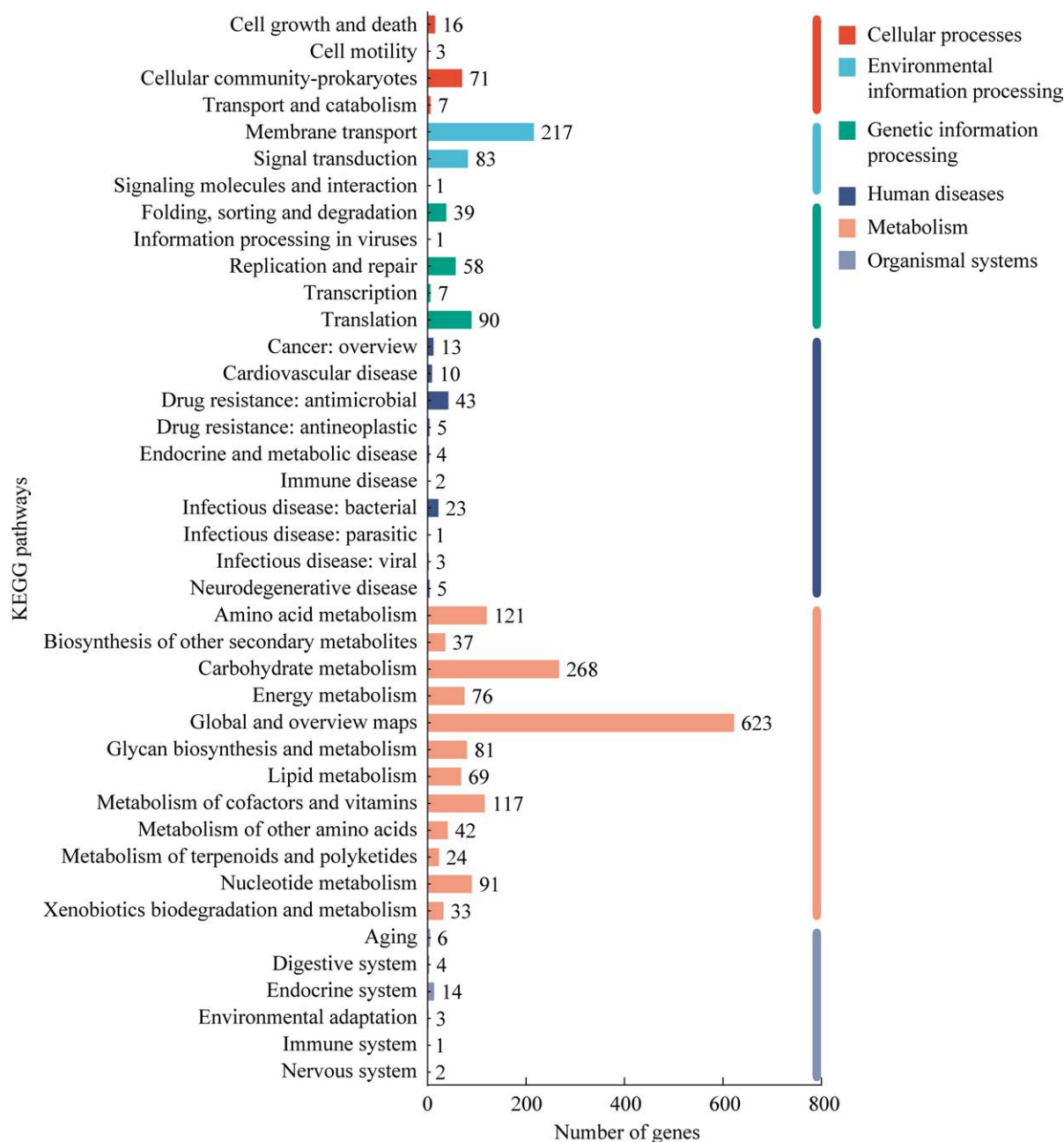


图9 KEGG 数据库注释结果

Figure 9 KEGG database annotation results.

DNA 片段, 这些片段携带着特定的功能, 如耐药性、致病性及碳水化合物代谢等。借助这种途径, 细菌得以抵御环境压力或抢占更佳生态位。这一过程中, 能够在不同细菌细胞间传递遗传信息的 DNA 片段统称为可移动遗传元件, 这种现象称为水平基因转移^[26]。

2.7.1 基因组岛

通过对菌株 S1 的基因组预测分析, 共鉴定出 5 个基因组岛(表 3), 它们的大小范围在 4.14–53.38 kb 之间, 总共编码 224 个功能基因, 其中有 27 个基因与碳水化合物密切相关, 它们包括糖基转移酶(gene1103)、细胞壁锚定蛋白

表 3 菌株 S1 的可移动元件统计表

Table 3 Statistics of mobile elements in strain S1

	编号 ID	起始 位置 Start position	终止 位置 End position	序列 长度 Sequence length (bp)	编码基 因数量 Coding gene number	重复 序列数 Number of repeat sequence	重复序列 长度 Length of repeat sequence (bp)	间隔序列 长度 Length of spacer sequence (bp)
基因组岛	GI01	1 089 725	1 136 791	47 066	53	—	—	—
Genomic island (GI)	GI02	154 578	173 666	19 088	30	—	—	—
	GI03	2 397 847	2 451 230	53 383	66	—	—	—
	GI04	691 636	695 776	4 140	7	—	—	—
	GI05	738 694	785 583	46 889	68	—	—	—
前噬菌体	Ph01	750 790	751 543	754	3	—	—	—
Prophage	Ph02	751 739	778 825	27 087	35	—	—	—
	Ph03	1 142 336	1 156 444	14 109	17	—	—	—
成簇规律间隔短回文重复	CRISPR1	49 822	50 305	483	—	7	25	51
及其相关蛋白系统	CRISPR2	97 308	97 702	394	—	5	35	55
Clustered regularly	CRISPR3	1 767 271	1 767 496	225	—	4	28	38
interspaced short	CRISPR4	1 787 097	1 787 209	112	—	2	31	51
palindromic	CRISPR5	2 784 722	2 784 799	77	—	2	26	26
repeats/CRISPR-associated	CRISPR6	83 801	83 936	135	—	3	28	26
proteins (CRISPR/Cas)								

—: 无数据。

—: No data.

(gene1093, gene2345)、溶菌酶(gene2342)和羧酸
 羧化酶(gene2351), 这些酶主要在碳水化合物的
 合成、修饰或代谢过程中发挥作用。此结果揭示
 了菌株 S1 在演化过程中可能经历了复杂的基因
 重组事件, 获得了多个基因组岛和大量外源基
 因。特别是 gene1103、gene2342、gene2351、
 gene2352、gene2354 等 5 个与碳水化合物代谢相
 关基因的存在, 可能通过调控底物代谢效率及表
 型特征的动态变化, 显著提升其对复杂环境条件
 的适应性。

2.7.2 前噬菌体

预测分析结果(表 3)显示, 菌株 S1 具有 3 个
 前噬菌体, 全长 41 950 bp, G+C 含量均为
 37.56%, 包含 55 个编码基因, 其中与碳水化合物
 代谢功能相关的基因包括 gene1103、gene1093、
 gene2342、gene2345 及 gene2351 (共 5 个)。

2.7.3 CRISPR/Cas 系统

CRISPR/Cas 系统是一种原核生物的免疫系
 统, 该系统能够识别外源 DNA 并沉默其基因表
 达, 可以用于抵御外源 DNA^[27]。利用 Mincel
 软件对 CRISPR/Cas 进行鉴定, 由表 3 可知, 菌
 株 S1 基因组内存在 6 个 CRISPR/Cas 序列, 其
 长度在 77–483 bp 之间, 涵盖 23 个重复序列,
 这些重复序列的长度在 25–35 bp 之间, 间隔序
 列长度在 26–55 bp 之间。由此推断, 菌株 S1
 曾遭受外源 DNA、质粒以及噬菌体的侵袭,
 进而促使自身发展出一套相对完善的先天免
 疫防御体系。

2.8 菌株 S1 的安全性

2.8.1 抗生素耐药基因

为评估菌株 S1 携带抗生素耐药基因的传播
 风险并确认其生物安全性, 我们借助 CARD 和

ResFinder 数据库对该菌株的全部预测基因进行了同源序列检测。经分析发现,在 ResFinder 数据库比对结果中,菌株 S1 含有 1 个耐药基因, *Isa(A)* 对林可酰胺类抗生素和 A 组链球菌具有潜在的抗性作用。而在 CARD 数据库中,我们鉴定出 203 个耐药基因,这些基因与多种抗生素类别相关,包括大环内酯类(*macB*)、肽类(*YybT*, *CdsA*, *liaF*, *liar*, *liaS*, *gshF*)、氟喹诺酮类(*gyrA*, *efrA*)、四环素类抗生素[*rpsJ*, *tetA* (46)], 以及消毒剂 and 防腐剂(*emeA*)。这些耐药基因的发现,暗示了菌株 S1 可能对相关抗生素类别具有抗性。这些分析结果为我们提供了菌株 S1 的耐药性信息,但具体的抗性程度和机制还需进一步研究来阐明。

2.8.2 毒力基因

为系统考察菌株 S1 的潜在致病风险,我们借助 VFDB 和 PHI 数据库对 S1 基因组实施了深入分析。VFDB 数据库揭示了菌株 S1 含有 307 个潜在的致病性基因,这些基因涵盖了免疫调节(83 个)、营养/代谢因子(69 个)以及黏附相关(27 个)基因。而 PHI 数据库分析发现,在其鉴定的 575 个基因中,有 413 个基因与毒力减弱显著相关。这些数据表明,尽管菌株 S1 携带了一些可能具有致病性的基因,但同时它也具备了大量能够降低其毒力的基因,这些基因可能在其致病过程中发挥关键的制衡作用。

2.9 药敏试验结果

药敏试验结果揭示了菌株 S1 对一系列抗生素的敏感性特征(表 4)。具体而言,菌株 S1 对氨苄西林(AMP)、哌拉西林(PIP)、青霉素(PEN)、头孢哌酮(CPZ)、头孢唑啉(CZ)、卡那霉素(KAN)、庆大霉素(GEN)、多粘菌素 B(PB)、强力霉素(DO)、四环素(TET)、米诺环素(MI)以及万古霉素(VAN)表现出高度敏感性。此外,该菌株对链霉素(S)和红霉素(E)呈现中介敏感性。相比之下,菌株 S1 对头孢氨苄(CN)、头孢呋辛钠(CXM)、头孢曲松(CTR)、头孢他啶(CAZ)、阿米卡星(AMK)和林可霉素(MY)表现出耐受性。

3 讨论

随着国家对抗生素使用的严格限制,开发高效的抗生素替代品已成为当务之急^[28]。益生菌凭借促进动物生长与抑制病原菌的双重优势^[29],被视为理想的抗生素替代品^[30]。肠球菌在临床上主要表现为致病菌,是医院感染的主要病原体之一^[4],可引发多种感染^[5]。但粪肠球菌在特定条件下也具有一定的益生潜力^[31],已在水产^[32]、禽类^[33]以及猪^[34]生产中得到应用。其益生性和致病性均具有菌株特异性,与其生物膜形成、毒力因子表达等因素密切相关。因此,深入了解特定粪肠球菌菌株的生理特性和基因组信息,有助于全面评估其益生性和安全性。本研究通过传统培养方法和 Illumina、PacBio 测序技术,对粪肠球菌 S1 形态特征和基因组结构进行全面分析,揭示了其潜在功能和碳水化合物代谢潜力,同时进行了安全性评估。本研究不仅提供了 *Enterococcus faecalis* LTSH1 的详尽基因组数据,而且为其在不同宿主中的适应性和潜在致病机制了解提供了新的视角,这些发现对于开发新的益生菌和动物疾病治疗策略具有重要的科学意义。

本研究成功分离获得粪肠球菌 S1。其形态学特征与徐淑琴等^[35]的描述高度吻合,16S rRNA 基因和核心基因组发育树分析结果进一步证实其为粪肠球菌。其基因组全长 2 992 873 bp, G+C 含量 37.26%, 含 2 810 个编码基因,与相关研究结果一致^[36-38],为后续分析奠定了基础。粪肠球菌的益生特性与其次级代谢产物和碳水化合物活性酶系统密切相关^[39-40]。菌株 S1 的次级代谢产物中,芳香多烯基因簇编码的氨基酸腺苷化域蛋白,可间接维护肠道细胞健康^[41]。醛/酮还原酶家族成员(如 AKR1C1 和 AKR1C3),可减轻氧化应激^[42-43]。脂肪酸合成关键酶[如 FabZ (图 10A)和乙酰辅酶 A 羧化酶 β 亚基域蛋白(图 10B)]可调控能量代谢和营养吸收^[44,46-47]。基于此,推测粪肠球菌可能通过调控脂肪酸代谢、增强抗氧化应激能力、维护肠道健康及产生

表 4 菌株 S1 抗生素敏感性结果

Table 4 Antibiotic susceptibility results for strain S1

抗微生物类别 Antimicrobial classification	抗微生物药 Antibiotic	纸片含药量 Disk content of antimicrobials ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	抑菌圈直径判断标准 Inhibition zone diameter criteria (mm)			菌株 S1 的易感性 Strain S1 susceptibility	
			耐药 Resistance (R)	中介 Intermediate (M)	敏感 Sensitivity (S)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	菌株敏 感性 Strain sensitivity
β -内酰胺类 Beta-lactams	氨苄西林 Ampicillin (AMP)	10	≤ 13	14–17	≥ 18	31	S
	哌拉西林 Piperacillin (PIP)	100	≤ 17	18–20	≥ 21	40	S
	青霉素 Penicillin (PEN)	10	≤ 14	–	≥ 15	30	S
	头孢氨苄 Cefalexin (CN)	30	≤ 14	15–17	≥ 18	13	R
	头孢呋辛钠 Cefuroxime sodium (CXM)	30	≤ 14	15–17	≥ 18	0	R
	头孢哌酮 Cefoperazone (CPZ)	75	≤ 15	16–20	≥ 21	25	S
	头孢曲松 Ceftriaxone (CTR)	30	≤ 13	14–20	≥ 21	0	R
	头孢他啶 Ceftazidime (CAZ)	30	≤ 14	15–17	≥ 18	0	R
	头孢唑啉 Cefazolin (CZ)	30	≤ 14	15–17	≥ 18	20	S
	氨基糖苷类 Aminoglycosides	阿米卡星 Amikacin (AMK)	30	≤ 14	15–16	12	R
		卡那霉素 Kanamycin (KAN)	30	≤ 13	14–17	20	S
		链霉素 Streptomycin (S)	10	≤ 11	12–14	14	M
		庆大霉素 Gentamicin (GEN)	10	≤ 12	13–14	15	S
	大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin (E)	15	≤ 13	14–22	22	M
	多粘菌素类 Polymyxins	多粘菌素 B Polymyxin B (PB)	300 IU	≤ 8	9–11	12	S
林可霉素类 Lincomycins	林可霉素 Lincomycin (MY)	2	≤ 14	15–20	≥ 21	0	R
四环素类 Tetracycline	强力霉素 Doxycycline (DO)	30	≤ 12	13–15	≥ 16	35	S
	四环素 Tetracycline (TET)	30	≤ 14	15–18	≥ 19	34	S
四环素类/喹诺酮类 Tetracycline/ Quinolones	米诺环素 Minocycline (MI)	30	≤ 14	15–18	≥ 19	33	S
糖肽类 Glycopeptides	万古霉素 Vancomycin (VAN)	30	≤ 14	15–16	≥ 17	18	S

–: 无数据。

–: No data.

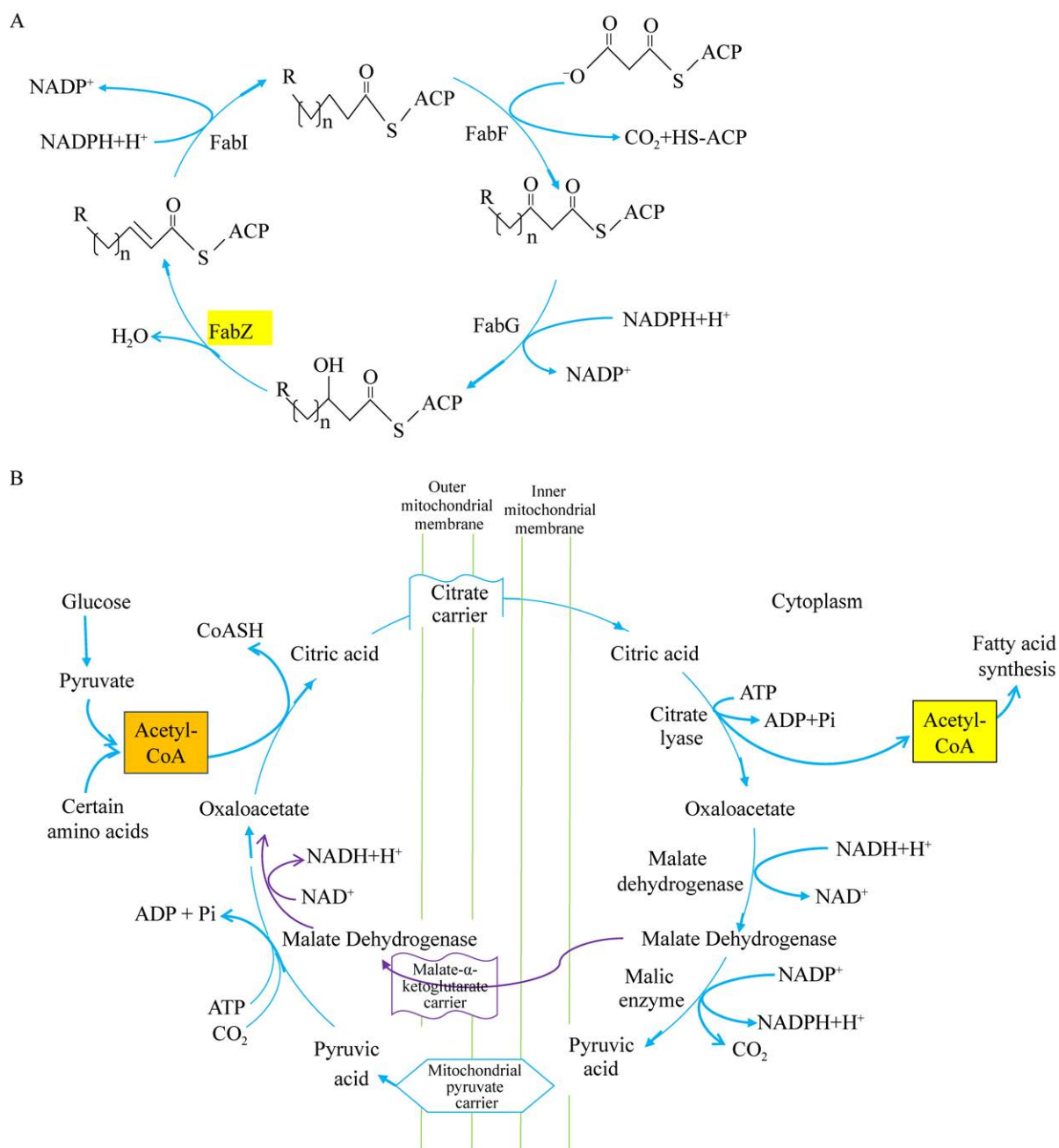


图 10 脂肪酸生物合成简化图^[44] (A)和脂肪酸循环图^[45] (B)

Figure 10 Simplified diagram of fatty acid biosynthesis^[44] (A) and fatty acid cycle diagram^[45] (B).

次级代谢产物等机制,影响大尾寒羊的能量代谢状态和营养吸收,进而间接作用于脂肪沉积和尾脂形成,但需进一步试验验证。

菌株 S1 能够分泌溶菌酶、肽聚糖酶、几丁质酶、葡聚糖酶等,可有效遏制病原微生物的生长发育^[48-49]。其基因组中富含 91 个 CAZy

家族基因,预示着其能够通过复杂的碳水化合物酶系协同作用,降解病原真菌、细菌细胞壁,优化植物营养的吸收,展现了多维度的应用前景^[50-55]。

本研究中的菌株虽源自健康大尾寒羊的肠道内容物,却携带潜在的毒力因子,这与吕会会

等^[56]的研究相一致。通过 CARD 分析发现菌株 S1 含有多种耐药基因,但在实际药敏试验中,其对部分抗生素呈现敏感或中介敏感,表明这些抗药基因尚未表达,可能与基因表达调控机制有关^[57]。此外,菌株 S1 虽保留一些毒力基因^[58] (如 *efaA*、*Agg*、*Ace* 等),但超过 71.83% 的基因与毒力减弱有直接联系,这些基因在调控细菌毒力方面起到关键作用,限制了菌株 S1 的毒力表达。推测这些基因的协同作用对菌株 S1 在宿主体内的存活及其潜在的益生功能具有积极影响,但其在宿主-细菌互作中的具体机制尚不完全清楚,有待进一步研究。

4 结论

本研究通过传统厌氧分离培养法和 16S rRNA 基因鉴定技术,成功分离出 1 株粪肠球菌;随后用 Illumina 和 PacBio 高通量基因组测序技术以及生物信息学分析,了解了该菌株基因组特性。功能分析结果揭示该菌株具有多种功能基因和可移动原件,对菌株适应性进化过程发挥着重要作用。本研究鉴定出粪肠球菌次级代谢产物合成的基因簇与抑菌物密切相关,发现毒力减弱基因对耐药基因和致病性基因的表达具有干扰和抑制作用。药敏试验也证实了菌株 S1 虽含有一定的耐药基因,但未表达。本研究结果为该菌株在微生物学、医学和畜牧业等领域的研究与应用提供了理论基础。

作者贡献声明

田黎明:完成大部分试验及全基因组测序分析、文章初稿撰写;章焕:协助完成分离菌株试验及部分数据处理;张淑红:提供技术支持;张成:协助完成图片制作;邸腾刚:协助完成药敏试验;常盟涵:协助完成生长特性试验;王冠:指导数据分析;高丰衣:指导试验安排;李少斌:项目资助、文章初稿修改;杨广礼:指导实验设计、论文写作修改以及项目资助。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

REFERENCES

- [1] LI N, ZUO B, HUANG SM, ZENG BH, HAN DD, LI TT, LIU T, WU ZH, WEI H, ZHAO JC, WANG JJ. Spatial heterogeneity of bacterial colonization across different gut segments following inter-species microbiota transplantation[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 161.
- [2] FAN Y, PEDERSEN O. Gut microbiota in human metabolic health and disease[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 19(1): 55-71.
- [3] 张贺, 王玉娥, 陈洪岩. 肠道菌群参与宿主免疫应答的作用及机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2020, 60(4): 629-640.
ZHANG H, WANG YE, CHEN HY. Role and mechanism of gut microbiota involved in host immune response[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(4): 629-640 (in Chinese).
- [4] 高晶晶, 王亚南, 张晓倩, 黄蓝, 徐卫东, 付婷. 临床分离 α 和 β 溶血性粪肠球菌质谱特征和毒力基因及耐药性[J]. *中华医院感染学杂志*, 2025, 35(2): 188-192.
GAO JJ, WANG YN, ZHANG XQ, HUANG L, XU WD, FU T. Mass spectrometry characteristics, virulence genes and drug resistance of clinical *Enterococcus faecalis* isolates with α and β hemolytic phenotypes[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2025, 35(2): 188-192 (in Chinese).
- [5] 渠素敏, 陈钰璇, 朱翔宇, 王钺博, 管冬兴, 张坚超, 滕辉. 粪肠球菌 HHT-1 拮抗铜和苯胺单一及复合胁迫的转录调控[J]. *微生物学报*, 2025, 65(3): 1089-1107.
QU SM, CHEN YX, ZHU XY, WANG YB, GUAN DX, ZHANG JC, TENG H. Transcriptional regulation of *Enterococcus faecalis* HHT-1 against single and combined stress of cadmium and aniline[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1089-1107 (in Chinese).
- [6] BOEDER AM, SPILLER F, CARLSTROM M, IZÍDIO GS. *Enterococcus faecalis*: implications for host health[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2024, 40(6): 190.
- [7] 侯璐. 猪源粪肠球菌的特性及对仔猪生长性能和免疫力影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
HOU L. The study of characteristics of *Enterococcus faecalis* from pigs and its effects on growth performance and immunity of piglets[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [8] 鲍延娥. 粪肠球菌益生特性的评价研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.

- BAO YE. Study on evaluation of probiotic characteristics of *Enterococcus faecalis*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013 (in Chinese).
- [9] GU YH, CHOI H, YAMASHITA T, KANG KM, IWASA M, LEE MJ, LEE KH, KIM CH. Pharmaceutical production of anti-tumor and immune-potentiating *Enterococcus faecalis*-2001 β -glucans: enhanced activity of macrophage and lymphocytes in tumor-implanted mice[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2017, 18(8): 653-661.
- [10] FAN MQ, CHOI YJ, WEDAMULLA NE, TANG YJ, HAN KI, HWANG JY, KIM EK. Heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 attenuate lipid accumulation in diet-induced obese (DIO) mice by activating AMPK signaling in liver[J]. Foods, 2022, 11(4): 575.
- [11] HAN KI, SHIN HD, LEE Y, BAEK S, MOON E, PARK YB, CHO J, LEE JH, KIM TJ, MANOHARAN RK. Probiotic and postbiotic potentials of *Enterococcus faecalis* EF-2001: a safety assessment[J]. Pharmaceuticals, 2024, 17(10): 1383.
- [12] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL I, CONNORS J, GASCOYNE R, HORSMAN D, JONES SJ, MARRA MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. Genome Research, 2009, 19(9): 1639-1645.
- [13] HYATT D, CHEN GL, LOCASCIO PF, LAND ML, LARIMER FW, HAUSER LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 119.
- [14] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Web Server issue): W451-W454.
- [15] BENSON G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573-580.
- [16] GARAGNANI P, MARQUIS J, DELLEDONNE M, PIRAZZINI C, MARASCO E, KWIATKOWSKA KM, IANNUZZI V, BACALINI MG, VALSESIA A, CARAYOL J, RAYMOND F, FERRARINI A, XUMERLE L, COLLINO S, MARI D, AROSIO B, CASATI M, FERRI E, MONTI D, NACMIAS B, et al. Whole-genome sequencing analysis of semi-supercentenarians[J]. eLife, 2021, 10: e57849.
- [17] POTTER SC, LUCIANI A, EDDY SR, PARK Y, LOPEZ R, FINN RD. HMMER web server: 2018 update[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W200-W204.
- [18] BLIN K, WOLF T, CHEVRETTE MG, LU XW, SCHWALEN CJ, KAUTSAR SA, SUAREZ DURAN HG, de LOS SANTOS ELC, KIM HU, NAVE M, DICKSCHAT JS, MITCHELL DA, SHELEST E, BREITLING R, TAKANO E, LEE SY, WEBER T, MEDEMA MH. antiSMASH 4.0: improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W36-W41.
- [19] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [20] BERTELLI C, LAIRD MR, WILLIAMS KP, Simon Fraser University Research Computing Group, LAU BY, HOAD G, WINSOR GL, BRINKMAN FS. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W30-W35.
- [21] FOUTS DE. Phage_Finder: Automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(20): 5839-5851.
- [22] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, TSANG KK, BOUCHARD M, EDALATMAND A, HUYNH W, NGUYEN AV, CHENG AA, LIU SH, MIN SY, MIROSHNICHENKO A, TRAN HK, WERFALLI RE, NASIR JA, OLONI M, SPEICHER DJ, FLORESCU A, SINGH B, FALTYN M, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [23] BORTOLAIA V, KAAS RS, RUPPE E, ROBERTS MC, SCHWARZ S, CATTOIR V, PHILIPPON A, ALLESOE RL, REBELO AR, FLORENSA AF, FAGELHAUER L, CHAKRABORTY T, NEUMANN B, WERNER G, BENDER JK, STINGL K, NGUYEN M, COPPENS J, XAVIER BB, MALHOTRA-KUMAR S, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020, 75(12): 3491-3500.
- [24] LEWIS LI JS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[M]. 34th ed. Berwyn: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024: 44-54.
- [25] 蒋伟. 粪肠球菌可移动元件介导的耐药性与 CRISPR 的关系探索[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- JIANG W. Relationship exploration of mobile element mediated drug-resistance and CRISPR loci[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [26] 孙华润. 副猪嗜血杆菌携带耐药基因的可移动遗传元件分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- SUN HR. Analysis of mobile genetic elements carrying antibiotic resistance genes in *Glaesserella parasuis*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [27] SINGH K, EVENS H, NAIR N, RINCÓN MY, SARCAR S, SAMARA-KUKO E, CHUAH MK, VandenDRIESSCHE T. Efficient *in vivo* liver-directed gene editing using CRISPR/Cas9[J]. Molecular Therapy, 2018, 26(5): 1241-1254.
- [28] 马新燕, 李大刚, 余苗, 周荣柱. 饲用抗生素替代品在畜禽生产中应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2024, 36(12): 7502-7512.
- MA XY, LI DG, YU M, ZHOU RZ. Research progress

- on application of feed antibiotic substitutes in livestock and poultry production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(12): 7502-7512 (in Chinese).
- [29] de MARCO G, CAPPELLO T, MAISANO M. Histomorphological changes in fish gut in response to prebiotics and probiotics treatment to improve their health status: a review[J]. Animals, 2023, 13(18): 2860.
- [30] 伍楚妍, 黄晓冰, 刘少君, 李洋, 谢为天, 徐春厚. 海洋芽孢杆菌的分离鉴定及其消化酶代谢产物的测定[J]. 广东农业科学, 2021, 48(7): 137-144.
- WU CY, HUANG XB, LIU SJ, LI Y, XIE WT, XU CH. Isolation and identification of marine *Bacillus* and determination of its digestive enzyme metabolites[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(7): 137-144 (in Chinese).
- [31] LI CQ, ZHANG BL, LIU CD, ZHOU HH, WANG X, MAI KS, HE G. Effects of dietary raw or *Enterococcus faecium* fermented soybean meal on growth, antioxidant status, intestinal microbiota, morphology, and inflammatory responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 100: 261-271.
- [32] TIAN YN, WANG F, SU XL, ZHANG LL, MA ZH, GAO LK, YAN HS, XUE YY, LV CH, ZHANG X, LI MZ, HOU YP, WANG K. Supplementation with *Enterococcus faecium* enhances growth performance, intestinal health and immunity of big-belly seahorses (*Hippocampus abdominalis*) during diet conversion[J]. Aquaculture Reports, 2023, 28: 101466.
- [33] 王淑敏, 付竹贤, 陈偲, 熊依凡, 罗璠. 耐久肠球菌 D22 及其发酵液对肉鸡生长性能、血清生化指标、肠道形态和盲肠菌群的影响[J]. 饲料工业, 2023, 44(14): 48-55.
- WANG SM, FU ZX, CHEN C, XIONG YF, LUO F. Effects of *Enterococcus durans* D22 and its fermentation broth on growth performance, serum biochemical indexes, intestinal morphology and cecal flora in broilers[J]. Feed Industry, 2023, 44(14): 48-55 (in Chinese).
- [34] 魏清甜, 李平华, 汪涵, 石磊, 牛清, 林明新, 吴望军, 周波, 黄瑞华. 粪肠球菌替代抗生素对保育仔猪生长性能、腹泻率、体液免疫指标和肠道微生物数量的影响[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 143-148.
- WEI QT, LI PH, WANG H, SHI L, NIU Q, LIN MX, WU WJ, ZHOU B, HUANG RH. Effect of dietary *Enterococcus faecalis* replacing of antibiotic on growth performance, diarrhea rate, humoral immunity and intestinal microflora of nursery pigs[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(6): 143-148 (in Chinese).
- [35] 徐淑琴, 马祥兆, 陈晓慧, 贺曦, 贺晓龙, 冶贵生. 藏羊源屎肠球菌的分离、鉴定及体外益生特性[J]. 安徽农业大学学报, 2022, 49(2): 272-278.
- XU SQ, MA XZ, CHEN XH, HE X, HE XL, YE GS. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from Tibetan sheep and its probiotic characteristics in vitro[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2022, 49(2): 272-278 (in Chinese).
- [36] TADESSE BT, SVETLICIC E, ZHAO SQ, BERHANE N, JERS C, SOLEM C, MIJAKOVIC I. Bad to the bone? Genomic analysis of *Enterococcus* isolates from diverse environments reveals that most are safe and display potential as food fermentation microorganisms[J]. Microbiological Research, 2024, 283: 127702.
- [37] ULLAH MA, ISLAM MS, RANA ML, FERDOUS FB, NELOY FH, PUNOM SA, HASSAN J, RAHMAN MT. Draft genome sequence of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* BAU_Ef01 strain isolated from shrimp (*Penaeus indicus*) in Bangladesh[J]. Microbiology Resource Announcements, 2023, 12(9): e0055123.
- [38] 邢家辉, 锡林高娃, 吴金花, 王赞嘉, 代杜兰, 布日额, 石竞楠. 内蒙古地区牛乳腺炎粪肠球菌临床分离株全基因组测序与生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(12): 1409-1413.
- XING JH, XI Lingaowa, WU JH, WANG ZJ, DAI ML, BU Rie, SHI JN. Genomic sequencing and bioinformatic analysis of *Enterococcus faecalis* clinically isolated from bovine mastitis in Inner Mongolia[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(12): 1409-1413 (in Chinese).
- [39] 周晓莉. 粪肠球菌 EF-ZA1107-06 的益生性及高密度培养的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- ZHOU XL. Study on probiotic properties of *Enterococcus faecalis* EF-ZA1107-06 and its high density culture[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [40] WARDMAN JF, BAINS RK, RAHFELD P, WITHERS SG. Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in the gut microbiome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(9): 542-556.
- [41] ZHONG L, DIAO XT, ZHANG N, LI FW, ZHOU HB, CHEN HN, BAI XP, REN XT, ZHANG YM, WU DL, BIAN XY. Engineering and elucidation of the lipoinitiation process in nonribosomal peptide biosynthesis[J]. Nature Communications, 2021, 12: 296.
- [42] ZENG CM, CHANG LL, YING MD, CAO J, HE QJ, ZHU H, YANG B. Aldo-keto reductase AKR1C1-AKR1C4: functions, regulation, and intervention for anti-cancer therapy[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 119.
- [43] RIŽNER TL, PENNING TM. Aldo-keto reductase 1C3: assessment as a new target for the treatment of endometriosis[J]. Pharmacological Research, 2020, 152: 104446.
- [44] DIETL A, WELLACH K, MAHADEVAN P, MERTES N, WINTER SL, KUTSCH T, WALZ C, SCHLICHTING I, FABRITZ S, BARENDSEN TRM. Structures of an unusual 3-hydroxyacyl dehydratase (FabZ) from a ladderane-producing organism with an unexpected substrate preference[J]. Journal of

- Biological Chemistry, 2023, 299(5): 104602.
- [45] 刘国琴, 杨海莲. 生物化学[M]. 3 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2017: 280.
LIU GQ, YANG HL. Biochemistry[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural University Press, 2017: 280 (in Chinese).
- [46] 马金成, 罗彪, 胡喆, 王海洪. 乳酸乳球菌 fabZ1 和 fabZ2 基因功能的鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(8): 777-786.
MA JC, LUO B, HU Z, WANG HH. Identification and Function Research of fabZ1 and fabZ2 of *Lactococcus lactis*[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, 41(8): 777-786 (in Chinese).
- [47] WEI J, ZHANG YX, YU TY, SADRE-BAZZAZ K, RUDOLPH MJ, AMODEO GA, SYMINGTON LS, WALZ T, TONG L. A unified molecular mechanism for the regulation of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation[J]. Cell Discovery, 2016, 2: 16044.
- [48] 张新帅, 阮瑶, 刘武康, 陈倩, 顾丽红, 郭爱玲. 致病菌抵抗溶菌酶机制的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 298-306.
ZHANG XS, RUAN Y, LIU WK, CHEN Q, GU LH, GUO AL. Mechanism of pathogen resistance to lysozyme: a review[J]. Food Science, 2020, 41(17): 298-306 (in Chinese).
- [49] 张博阳, 朱天辉, 韩珊, 王莹, 李姝江, 譙天敏. 桑氏链霉菌几丁质酶 *ChiKJ40* 基因的克隆表达及其抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1016-1026.
ZHANG BY, ZHU TH, HAN S, WANG Y, LI SJ, QIAO TM. Cloning, expression and antibacterial functions of *ChiKJ40*, a chitinase gene from *Streptomyces sampsonii*[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1016-1026 (in Chinese).
- [50] 刘伟, 于凤民, 马千鹏, 特古斯巴雅尔, 张晓华, 张兴军, 谭艺沅, 贾玉山. 木聚糖酶在青贮及反刍动物日粮中的应用[J]. 草地学报, 2024, 32(1): 331-339.
LIU W, YU FM, MA QP, TE Gusibayaer, ZHANG XH, ZAHNG XJ, TAN YY, JIA YS. Application of xylanase in silage and ruminant diet[J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(1): 331-339 (in Chinese).
- [51] JIN XY, WANG JK, WANG Q. Microbial β -glucanases: production, properties, and engineering[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 39(4): 106.
- [52] 何玮璇, 张永亮. β -葡聚糖酶的特性、功能及应用研究[J]. 广东饲料, 2010, 19(8): 19-21.
HE WX, ZHANG YL. Research on characteristics, functions and applications of β -glucanase[J]. Guangdong Feed, 2010, 19(8): 19-21 (in Chinese).
- [53] GUAN LZ, ZHAO S, SHU G, JIANG QY, CAI GY, WU ZF, XI QY, ZHANG YL. β -Glucanase specific expression in the intestine of transgenic pigs[J]. Transgenic Research, 2019, 28(2): 237-246.
- [54] PHILIPPE F, PELLOUX J, RAYON C. Plant pectin acetyltransferase structure and function: new insights from bioinformatic analysis[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 456.
- [55] RAZEQ FM, JURAK E, STOGIOS PJ, YAN RY, TENKANEN M, KABEL MA, WANG WJ, MASTER ER. A novel acetyl xylan esterase enabling complete deacetylation of substituted xylans[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 74.
- [56] 芮会会, 白文妹, 李翔, 杨敬元, 姚辉, 肖运才. 神农架川金丝猴肠道粪肠球菌的分离与鉴定[J]. 兽类学报, 2017, 37(4): 389-398.
GUO HH, BAI WM, LI X, YANG JY, YAO H, XIAO YC. Isolation and identification of intestinal *Enterococcus faecalis* from golden snub-nosed monkeys in Shennongjia National Natural Reserve[J]. Acta Theriologica Sinica, 2017, 37(4): 389-398 (in Chinese).
- [57] 甘富斌, 洛桑旦达, 琼达, 德吉卓嘎, 扎西卓玛, 卓拉, 次仁. 林芝市某养殖场牦牛源粪肠球菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 中南农业科技, 2024(10): 47-50.
GAN FB, Luosangtanda, QIONG D, Dejizhuoga, Zhaxizhuoma, ZHUO L, CI R. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Enterococcus faecalis* from yak in a farm in Linzhi city[J]. South-Central Agricultural Science and Technology, 2024, 45(10): 47-50 (in Chinese).
- [58] AIKALBANI NS, TURNER MS, AYYASH MM. Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and *in vitro* investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 188.