

研究报告

屎肠球菌 F11.1G 比较基因组、代谢组学分析及代谢产物挖掘

白天天^{1,3}, 万颖^{2,4}, 张延龙^{2,4}, 黄丹^{2,4}, 顾皓斐^{2,4}, 普宣宣^{2,4}, 张萌^{1,3}, 郭雪峰^{*2,4}

1 塔里木大学 生命科学与技术学院, 新疆 阿拉尔 843300

2 塔里木大学 动物科学与技术学院, 新疆 阿拉尔 843300

3 塔里木大学 塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300

4 塔里木大学 农业农村部环塔里木畜草资源利用重点实验室(部省共建), 新疆 阿拉尔 843300

白天天, 万颖, 张延龙, 黄丹, 顾皓斐, 普宣宣, 张萌, 郭雪峰. 屎肠球菌 F11.1G 比较基因组、代谢组学分析及代谢产物挖掘[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2769-2788.

BAI Tiantian, WAN Ying, ZHANG Yanlong, HUANG Dan, GU Haoifei, PU Xuanxuan, ZHANG Meng, GUO Xuefeng. Comparative genomics analysis, metabolomics analysis, and metabolite mining of *Enterococcus faecium* F11.1G[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2769-2788.

摘要: 【背景】屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)具有抑制常见致病菌的作用, 在禁抗的大环境下, 逐渐成为常规抗生素生长促进剂的有效替代品。但随着屎肠球菌应用范围的扩大, 其安全性问题日益受到关注。【目的】从基因水平阐明其细菌素编码基因簇, 评估其安全性并探究屎肠球菌 F11.1G 基因功能和潜在代谢产物, 代谢组学分析菌株胞内外的代谢物差异, 并对其活性代谢产物进行挖掘。【方法】全基因组测序对其基因信息进行注释和功能预测, 采用功能基因组和比较基因组方法, 分析菌株 F11.1G 的益生性和安全性特征, 揭示其与益生屎肠球菌 T110 之间的差异, 代谢组学对菌株中的代谢物进行鉴定, 随后通过结构鉴定挖掘出活性代谢产物。【结果】菌株 F11.1G 注释到 4 个毒力相关基因和 3 个耐药基因, antiSMASH 数据库预测到了 3 种次级代谢产物基因簇; 比较基因组分析结果表明, 菌株 F11.1G 与菌株 T110 具有较高相似性, 菌株 T110 未预测到毒力基因、耐药基因和病原菌基因。非靶向代谢组学结果表明, 胞内外差异代谢产物主要集中在萜类和聚酮类、氨基酸、有机杂环化合物等, 可能与菌株 F11.1G 的抑菌作用相关。从菌株 F11.1G 的活性代谢产物分离鉴定出 α -D-型葡萄糖、4-氧化戊酸、毛蕊花糖、水苏糖、二聚体白屈菜默碱、1-羟基萘醌和极少量酮类活性物质。【结论】菌株 F11.1G 具有合成抗生素或新型次级代谢产物的潜力, 但

资助项目: 塔里木大学研究生科研创新项目(TDBSCX202309)

This work was supported by the Graduate Student Research Innovation Program of Tarim University (TDBSCX202309).

*Corresponding author. E-mail: gxfdky@126.com

Received: 2024-09-09; Accepted: 2025-03-05; Published online: 2025-04-01

还携带毒力因子和毒力基因, 后期可通过分离纯化肠球菌素发挥其益生菌特性。

关键词: 屎肠球菌 F11.1G; 基因组学; 代谢组学; 生物信息学; 功能注释; 细菌素; 代谢产物挖掘

Comparative genomics analysis, metabolomics analysis, and metabolite mining of *Enterococcus faecium* F11.1G

BAI Tiantian^{1,3}, WAN Ying^{2,4}, ZHANG Yanlong^{2,4}, HUANG Dan^{2,4}, GU Haofei^{2,4}, PU Xuanxuan^{2,4}, ZHANG Meng^{1,3}, GUO Xuefeng^{*2,4}

1 College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

2 College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

3 Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

4 Key Laboratory of Livestock and Grass Resources Utilization around Tarim, Ministry of Agriculture and Rural Areas (Co-construction by Ministries and Provinces), Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: [Background] *Enterococcus faecium* with the ability to inhibit common pathogenic bacteria has gradually become an alternative to conventional antibiotic growth promoters in the context of the antibiotic ban. However, the safety of *E. faecium* has aroused growing concern with the expansion of its application. **[Objective]** To elucidate the bacteriocin-encoding gene clusters, evaluate the safety, investigate the gene functions and potential metabolites, compare the intracellular and extracellular metabolites by metabolomics, and mine the active metabolites of *E. faecium* F11.1G. **[Methods]** Whole genome sequencing was performed to annotate the gene information and predict gene functions of *E. faecium* F11.1G. The functional genomic and comparative genomic approaches were used to analyze the probiotic and safety characteristics of strain F11.1G and reveal the differences between this strain and the probiotic *Enterococcus faecium* T110. Metabolomics was employed to identify the metabolites in the strain, and then active metabolites were mined out through structural identification. **[Results]** Four virulence genes and three antibiotic resistance genes were annotated for strain F11.1G. Three secondary metabolite gene clusters were predicted by antiSMASH. The comparative genomic analysis showed high similarity between F11.1G and T110, and no virulence genes, resistance genes or pathogenicity genes were predicted for T110. The results of non-targeted metabolomics showed that the differential metabolites were mainly terpenoids, polyketides, amino acids, and organic heterocyclic compounds, which might be associated with the antibacterial effect of F11.1G. Among the active metabolites of F11.1G, α -D-glucose, 4-oxopentanoic acid, verbascose, stachyose, dimeric chelidonine, 1-hydroxy anthraquinone, and a very small amount of active ketones were identified. **[Conclusion]** Strain F11.1G has the potential to synthesize antibiotics or novel secondary metabolites and carries virulence factors and virulence genes. Its probiotic properties can be exploited later by separation and purification of enterocin.

Keywords: *Enterococcus faecium* F11.1G; genomics; metabolomics; bioinformatics; functional annotation; bacteriocin; metabolite mining

乳酸菌是一个系统发育多样化的类群, 因其在食品发酵中的主要属性而得名, 即乳酸的产生。屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)属于革兰氏阳性乳酸菌, 是家畜肠道常见优势菌群^[1], 具有生长速度快、耐受性强等特性, 可以更好地在畜禽肠道中存活繁殖并发挥效果。屎肠球菌的广泛应用使其潜在风险逐渐引起人们重视, 因其可能诱发重症感染、耐药性传播等临床隐患^[2]。屎肠球菌具有广泛的抗生素耐药性, 现已成为重要的院内病原体^[3]。屎肠球菌携带多种毒力基因, 毒力基因编码的毒力因子会帮助病原性屎肠球菌定殖宿主组织, 从而逃避宿主免疫防御并引起宿主感染^[4]。当前, 体外检测技术仍是评估乳酸菌特性的主要手段。但随着食品安全理念的持续更新, 传统检测方式在高通量菌株风险筛查中存在一定局限, 而全基因组测序技术能够全面解析目标菌株的安全性。

本课题组前期分离了 1 株能抑制常见病原菌[黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)]生长的屎肠球菌 F11.1G^[5], 将其接种至高丹草、芦苇和玉米秸秆青贮中可改善其发酵品质^[6], 直接饲喂有助于提高断奶羔羊生长性能, 改善瘤胃发酵并提高瘤胃菌门相对丰度^[7]。本研究拟基于全基因组信息对潜在有害决定因素进行预测, 以提供对潜在益生菌菌株的全面预警, 为益生菌菌株的筛选和开发提供了系统的安全性评估, 并与益生菌菌株屎肠球菌 T110 比较基因组, 以获得对菌株 F11.1G 的安全性评价, 以期菌株 F11.1G 的应用做准备。

非靶向代谢组学分析是一种高效的技术手段, 它不仅能够全面识别和精确量化样品中的各种代谢物, 而且为揭示生物体代谢状态的全面图景提供了重要支撑^[8]。本研究综合运用非靶向代谢组学分析鉴定菌株 F11.1G 中具有统计学意义的差异代谢物, 对差异代谢物进行注释及分析; 高分辨液相-质谱联用对菌株 F11.1G 中

的活性代谢产物进行分离、萃取及鉴定, 深入探究赋予菌株抑菌能力的活性代谢产物, 以期菌株 F11.1G 下一步的分离纯化及开发应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

屎肠球菌 F11.1G 为塔里木大学畜牧科技重点实验室筛选菌株^[5], 保藏于中国典型培养物中心(保藏号: M 2020793)。大肠杆菌和沙门氏菌(*Salmonella*)由新疆兵团塔里木动物疾病诊断与防控实验室李莲瑞团队提供。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基、de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 培养基和麦康凯培养基, 青岛海博生物技术有限公司。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 乙酸乙酯、甲醇和乙腈, 天津致远化学试剂有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。超净工作台, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 高压灭菌锅, 上海源之启医疗科技有限公司; 气浴恒温振荡器, 江苏金怡仪器科技有限公司; Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪, 沃特世科技(上海)有限公司; 超高效液相色谱-离子淌度-四级杆飞行时间质谱联用仪(ultra high performance liquid chromatography-ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometer, UPLC-IMS-QTOF-MS), 安捷伦科技有限公司; 旋转蒸发仪, 海道尔夫公司。

1.3 菌株活化与 DNA 提取

参照施琳波等^[9]进行菌株活化, 按 2% (体积分数)接种于 8 mL 液体 MRS 培养基中, 于 37 °C、180 r/min 厌氧培养 36 h, 活菌数达到 1×10^8 CFU/mL 时 14 000 r/min 离心 1 min, 利用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌体总 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度和纯度。

1.4 基因组测序、组装及基因组分分析

将 1.3 所提总 DNA 样品送至北京百迈客生

物科技有限公司进行全基因组测序分析。使用 BluePippin 进行目标片段的筛选,完成文库的构建。通过 PacBio 平台获得基因组序列,筛去质量低和短片段的 reads 后组装并校正,之后使用 HiFiASM^[10]进行基因组组装,采用软件 Prodigal v2.6.3^[11]、tRNAscan-SE v2.0^[12]、Infernal v1.1.3^[13]、Island Path-DIMOB v0.2^[14] 和 RepeatMasker v4.0.5^[15]对菌株的编码基因、非编码 RNA (tRNA 和 rRNA)、基因岛、重复序列进行预测。并应用软件 Circos v0.66^[16]绘制基因组圈图。

1.4.1 基因功能注释

采用 GO (<http://geneontology.org/>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/>)、eggNOG (<http://eggnogdb.embl.de/>)、CAZy (<http://www.cazy.org/>)、转运蛋白分类数据库(transporter classification database, TCDB) (<http://www.tcdb.org/>)通过 Diamond 进行比对($E\text{-value} \leq 1E-5$),选取比对得分最高的结果(默认 identify $\geq 40\%$, coverage $\geq 40\%$)进行功能注释。

1.4.2 毒力或致病性分析

采用病原宿主互作数据库(pathogen host interactions database, PHI-base) (<http://phi-blast.phi-base.org/>)、毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)、综合的抗生素抗性基因数据库(comprehensive antibiotic research database, CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>)通过 Diamond 进行比对,将该菌株基因和对应功能注释信息结合从而得到注释结果,对 F11.1G 基因组中含有的致病菌感染宿主过程中的相关蛋白、潜在毒力因子和抗生素抗性相关基因进行预测。

1.4.3 生物合成基因簇和次级代谢基因簇预测

通过 antiSMASH v7.0.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>)对细菌基因组序列中的生物合成基因簇进行预测。

1.4.4 比较基因组分析

将菌株 F11.1G 与已知益生菌菌株屎肠球菌 T110 (GenBank 登录号为 CP006030)进行比较基

因组分析。通过 Workbench 12.0.3 估算菌株间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)值,采用 MUMmer 软件(v3.23)比对解析目标与参考基因组之间的共线性关系。采用 LASTZ v1.03.54 识别基因组之间易位、倒置及易位+倒置的区域。

1.5 代谢组学检测

根据 1.3 方法将菌株 37 °C、180 r/min 厌氧振荡培养 36 h 至对数生长期,胞外代谢物样品和胞内代谢物样品的制备参照张泉^[17]方法进行。送至北京百迈客生物科技有限公司进行非靶向代谢组学(non-targeted metabolomics, LC-MS/MS)检测。

色谱条件:检测平台为 Waters Acquity I-Class PLUS 超高效液相色谱串联 Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪,色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm)。色谱分析参数参照张泉^[17]方法。

质谱条件:检测平台为 Waters Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪,电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)离子源参数参照刘思美等^[18]方法。

1.6 代谢产物挖掘

1.6.1 活性代谢产物样品的分离和萃取

取 10 g 菌株 F11.1G 冻干粉分别与 200 mL 乙酸乙酯、甲醇和蒸馏水混合均匀,将混合样品标记为 A、B、C 这 3 组,采用频率为 40 kHz 的超声波水浴振荡处理 30 min,静置 1 h 后用 0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液并去除沉淀,再将 3 组滤液分别置于旋转蒸发器中,于 50 °C 恒温条件下旋转蒸干至样品呈粉末状,收集 3 组粉末,密封保存待用。

1.6.2 代谢产物抑菌活性试验

将经 1.6.1 萃取并旋干的粉末用 DMSO 溶解制为 10 mg/mL 的溶液,以 DMSO 为对照组(D),大肠杆菌和沙门氏菌分别采用 LB 培养基和麦康凯培养基进行活化后,使用无菌生理盐水稀释菌液为 1×10^8 CFU/mL,取 100 μL 指示菌液均匀涂布 LB 平板,轻轻放置无菌空白滤纸

片(直径 6 mm), 分别标记 A、B、C 组并滴加 10 μ L 待测样品; 对照组为滴加 10 μ L DMSO 溶液的滤纸片, 标为 D 组。待干燥后, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 进行抑菌圈直径的测量。

1.6.3 高分辨液相-质谱联用鉴定活性物质结构与分子量

将 1.6.1 中收集的 3 组浓缩冻干粉溶解于 1 mL 乙腈(质谱级)中, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 5 μ L 上清液加入 1 mL 乙腈溶剂, 再次 10 000 r/min 离心 10 min 后经 0.22 μ m 滤膜过滤, 放入带预切口瓶盖的进样瓶, 利用 UPLC-IMS-QTOF-MS 进行质谱分析。

2 结果与分析

2.1 基因组基本特征

鉴定到菌株 F11.1G 具有 37 449 个高质量 reads, 平均长度为 8 646 bp。基因组序列 reads 被组装成 3 个 contigs 和 3 个 scaffold, 菌株 F11.1G 基因组全长为 2 495 379 bp, 由 1 个染色体(2 706 618 bp)和 2 个质粒(181 929 bp 和 21 325 bp)组成, G+C 含量为 38.2%, 获得菌株基因组环状图如图 1A 所示, 菌株 F11.1G 有 2 790 个编码基因, 平均基因长度为 894 bp, 包含 6 个 rRNA 和 69 个 tRNA, 共预测出 11 个基因岛, 总长度 152 356 bp, 散在重复序列 4 个, 前噬菌体 2 个和 CRISPR 序列 4 个。

2.2 菌株 F11.1G 基因功能注释

2.2.1 GO 数据库功能注释

由图 1B 可知, 菌株 F11.1G 共有 2 181 个基因获得 GO 功能注释, 占所有基因的 78.17%。GO 注释结果主要分为三大亚类, 在细胞组分(cellular component)中基因数量最多的为膜结构部分(membrane); 在分子功能(molecular function)中基因数量最多的为催化活性(catalytic activity)功能; 在生物学过程(biological process)中基因数量最多的为代谢过程(metabolic process)。

2.2.2 KEGG 数据库功能注释

由图 1C 可知, 菌株 F11.1G 获得 KEGG 功能注释基因共有 1 440 个, 主要包括三大代谢途径, 环境信息处理(environmental information processing)有 214 个基因、遗传信息处理(genetic information processing)有 186 个基因、新陈代谢(metabolism)有 748 个基因。

2.2.3 eggNOG 数据库功能注释

由图 1D 可知, 菌株 F11.1G 共有 2 279 个基因获得 eggNOG 基因注释, 占所有基因比例为 81.69%, 共分为 20 个类型, 其中占比较大的有: 碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism), 249 个基因, 占总比例 10.79%; 转录(transcription), 191 个基因, 占总比例 8.28%; 复制、重组和修复(replication, recombination and repair), 178 个基因, 占总比例 7.71%; 一般功能预测基因(general function prediction only), 206 个基因, 占总比例 8.93%。

2.2.4 CAZy 数据库功能注释

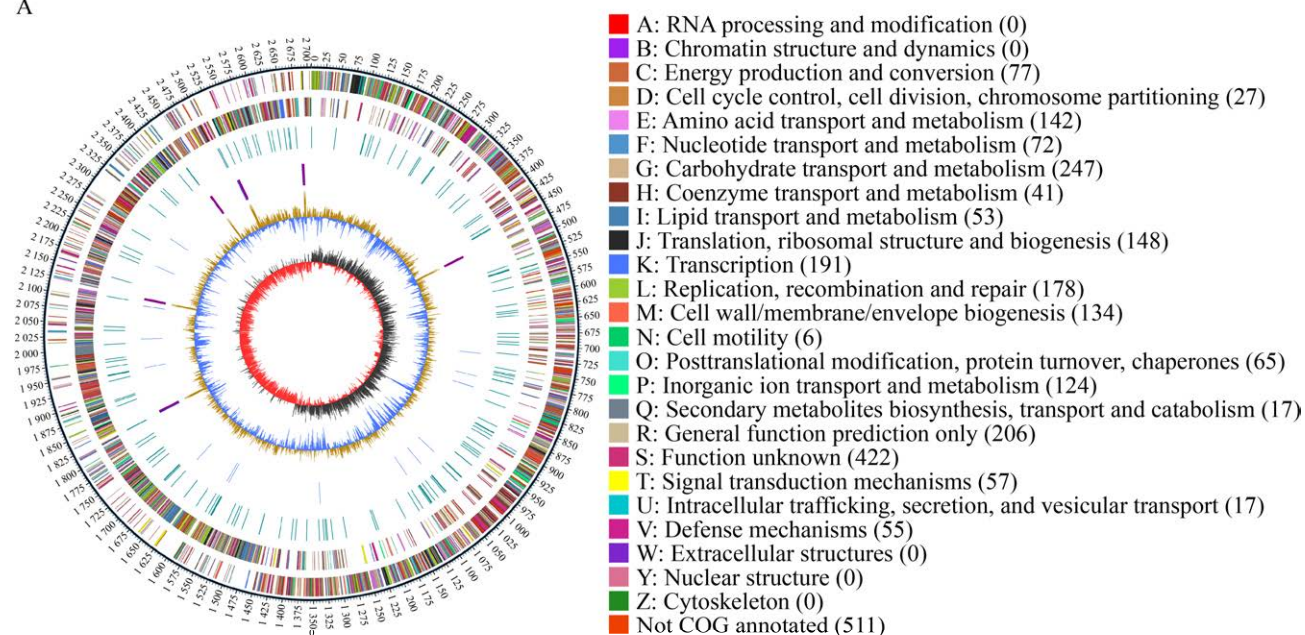
由图 1E 可知, 菌株 F11.1G 基因组中属于 CAZy 家族的共有 117 个基因编码的蛋白质结构域, 其中糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH) 49 个、糖基转移酶(glycosyl transferases, GT) 26 个、碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBM) 19 个、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CE) 14 个、多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PL) 5 个和辅助活性(auxiliary activities, AA) 4 个。

2.3 毒力或致病性分析

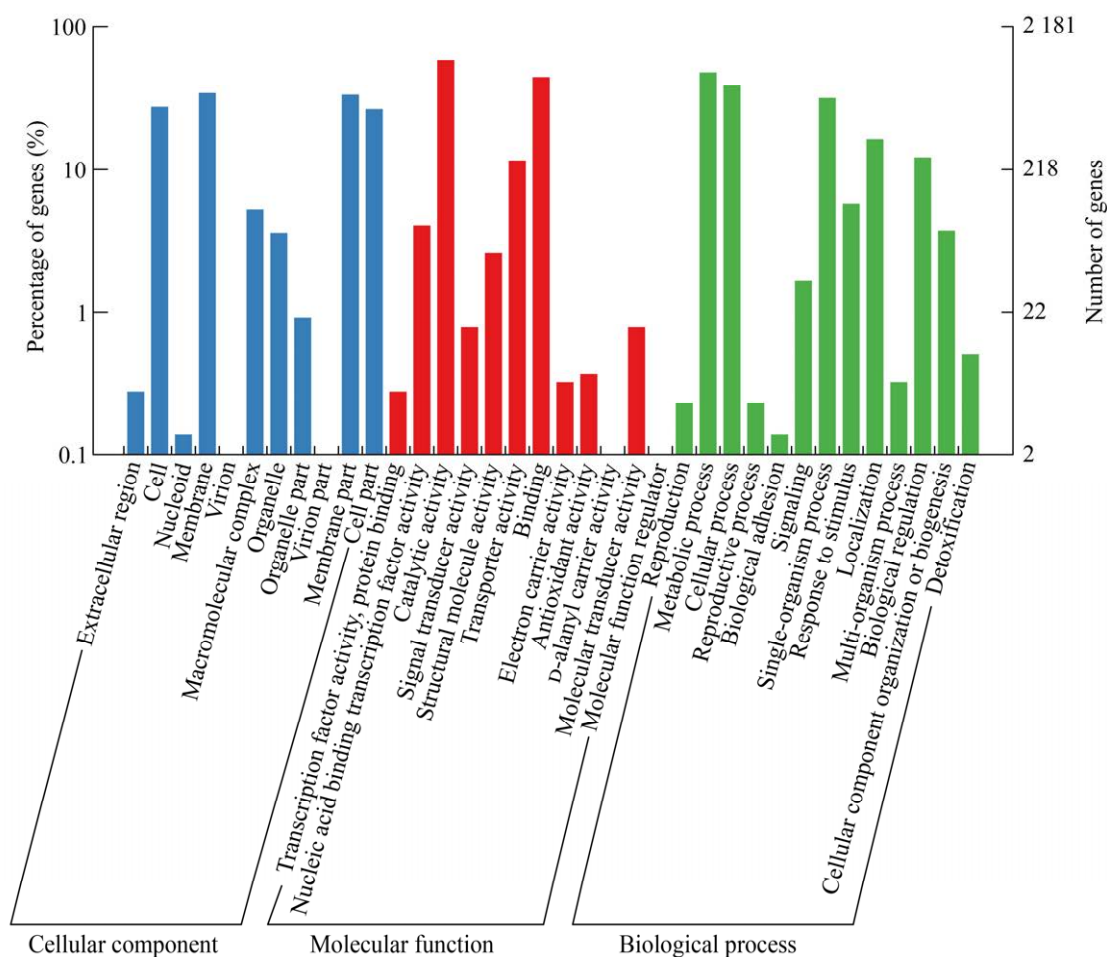
2.3.1 PHI-base 数据库注释

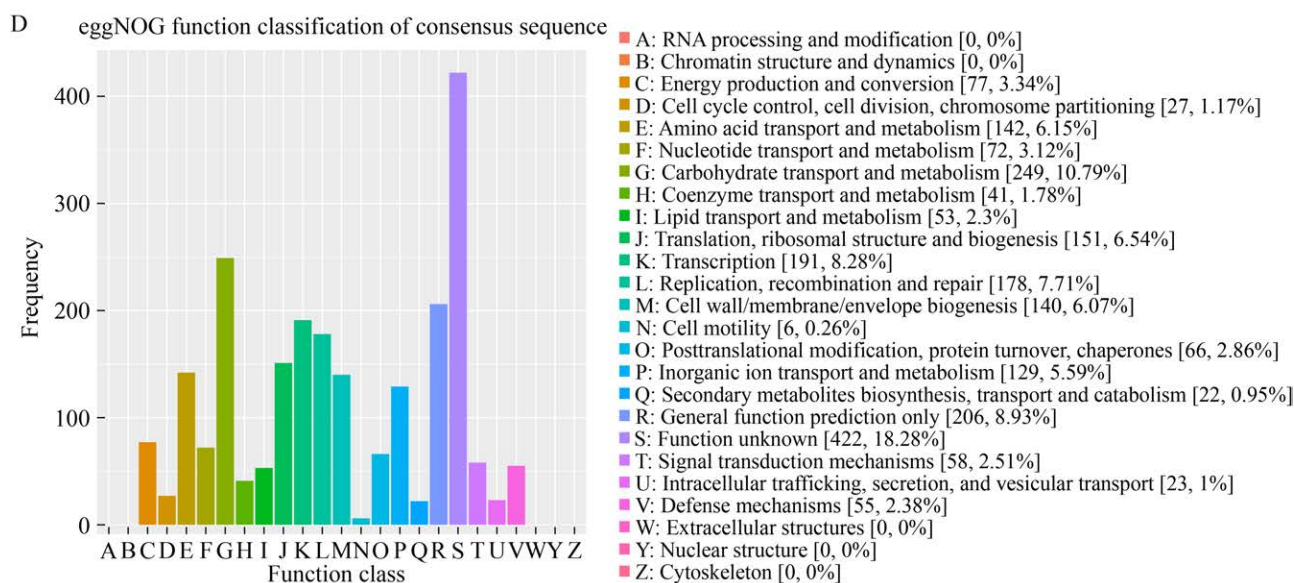
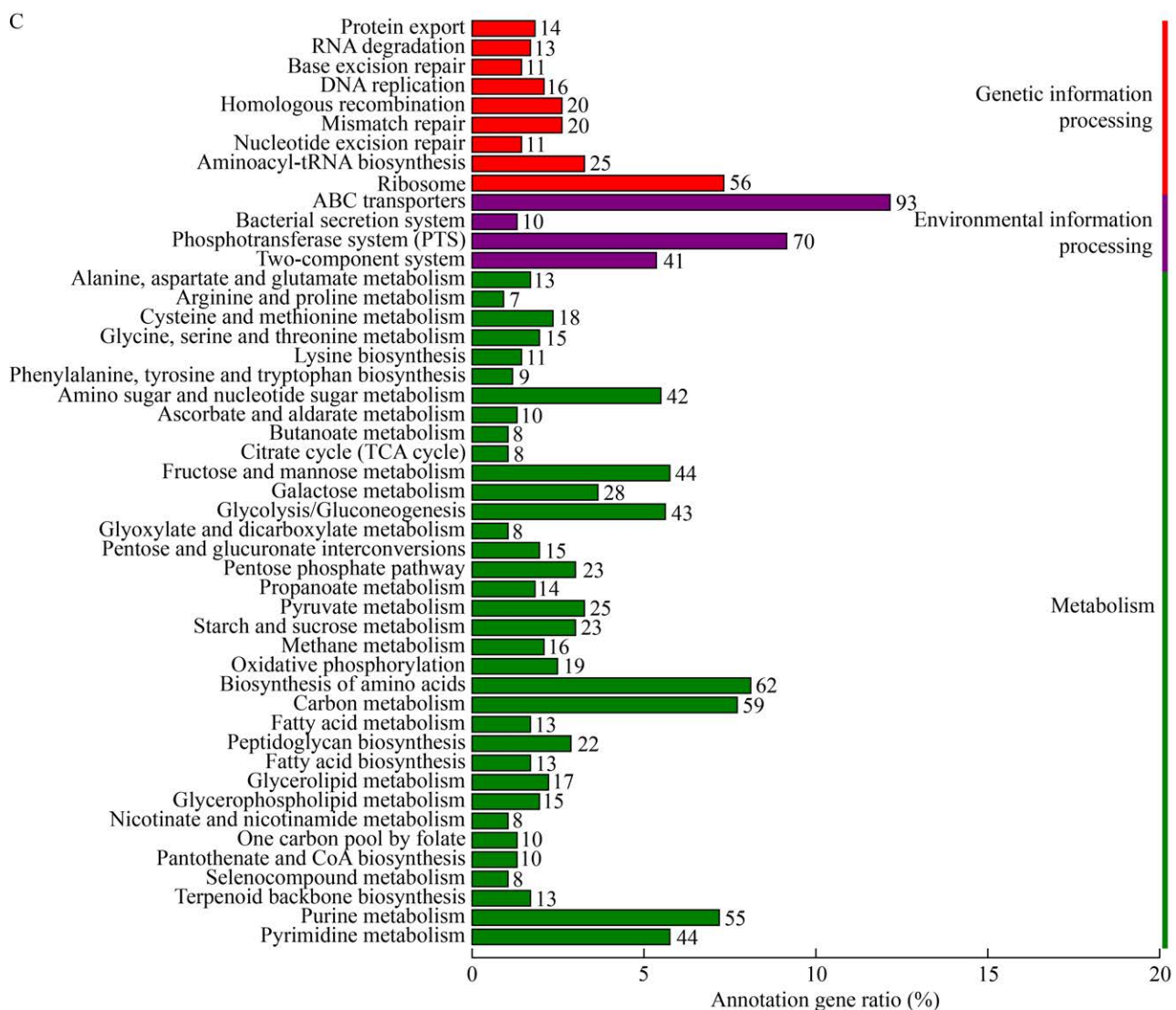
由图 2 可知, 菌株 F11.1G 中共有 863 个基因得到 PHI-base 数据库注释, 其中, 突变导致毒力增强(高毒力) [increased virulence (hypervirulence)] 基因 54 个, 突变导致毒力降低(reduced virulence)基因 577 个, 突变导致致病力丧失(loss of pathogenicity)基因 33 个, 突变导致致死(lethal)基因 28 个, 突变导致不影响致病力(unaffected pathogenicity)基因 148 个, 突变导致化

A



B





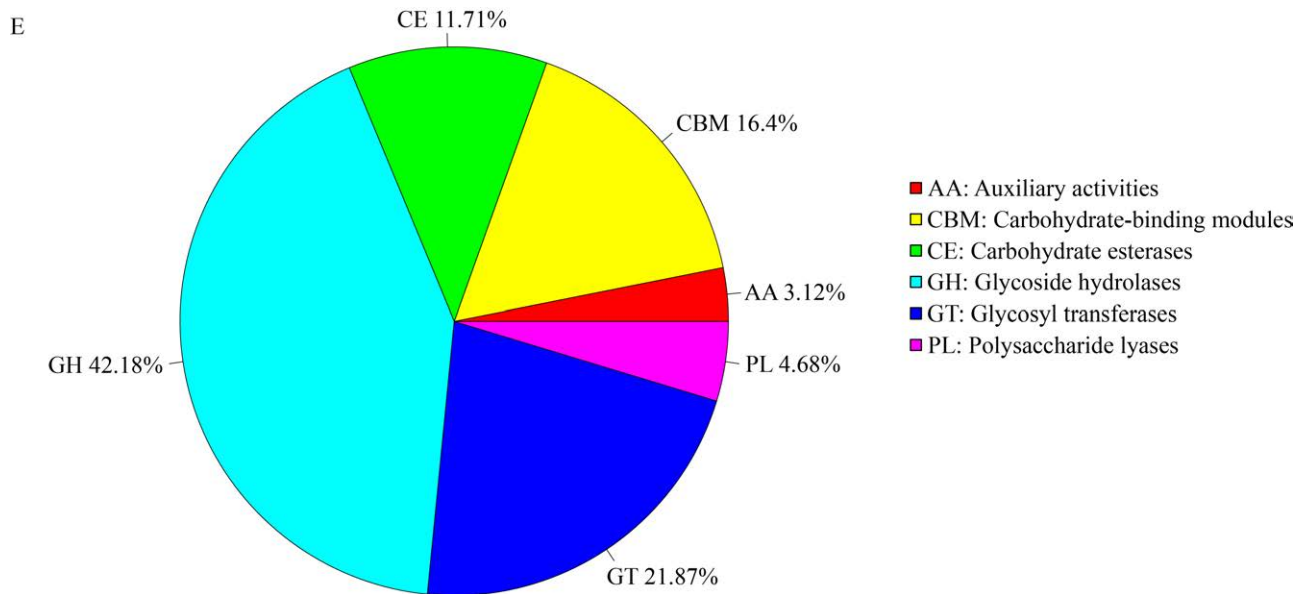


图 1 F11.1G 基因组功能预测图 A: 菌株 F11.1G 基因组圈图。外圈表示基因组大小(5 kb); 第 2 和第 3 圈代表预测的编码序列, 不同颜色代表不同的同源蛋白质群; 第 4 圈代表重复序列; 第 5 圈代表 tRNA 和 rRNA; 第 6 圈表示 G+C 含量, 最内圈为 G+C-Skew 值。B: 菌株 F11.1G 基因组 GO 功能注释。C: 菌株 F11.1G 基因组 KEGG 功能注释。D: 菌株 F11.1G 基因组 eggNOG 功能注释。E: 菌株 F11.1G 基因组 CAZy 功能注释。

Figure 1 F11.1G genomic function prediction map. A: Map of the F11.1G chromosome. The outer circle represents the genome size in 5 kb; The second and third circles represents the predicted coding sequences (CDSs), and the different colors indicates the different clusters of orthologous groups of proteins; The fourth circle represents the repetitive sequence; the fifth circle represents the tRNA and rRNA clusters, blue is tRNA, and purple is rRNA; The sixth circle represents the G+C content with light yellow and blue color, and the most inner circle represents G+C-skew values with dark gray and red color. B: GO functional annotation diagram of strain F11.1G. C: KEGG functional annotation diagram of strain F11.1G. D: eggNOG functional annotation diagram of strain F11.1G. E: CAZy functional annotation diagram of strain F11.1G.

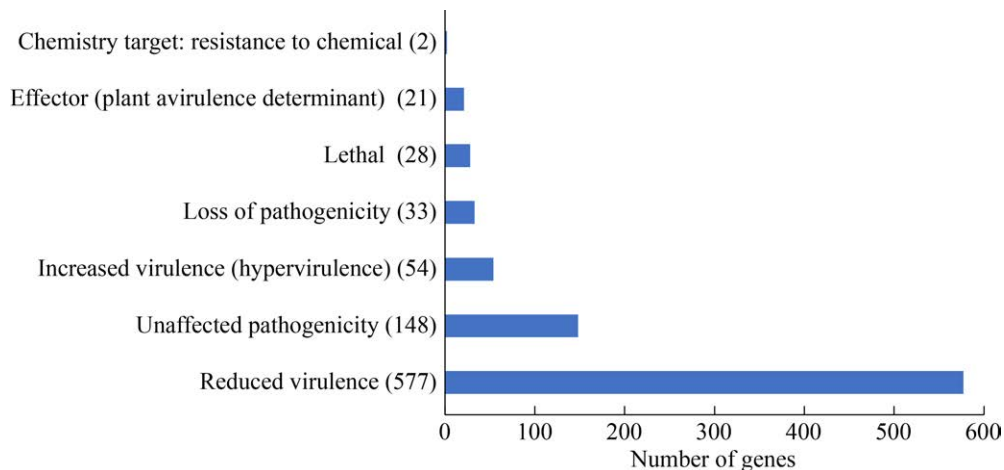


图 2 菌株 F11.1G 基因组 PHI-base 功能注释

Figure 2 PHI-base functional annotation diagram of strain F11.1G.

学目标:耐化学性(chemistry target: resistance to chemical)基因 2 个,突变导致效应器(植物无毒决定因子) [effector (plant avirulence determinant)] 基因 21 个。

2.3.2 VFDB 数据库功能注释

由表 1 可知,以 identity>80%作为筛选条件,菌株 F11.1G 共预测到 4 个毒力基因。毒力基因与黏附、生物膜形成、识别黏附基质分子 (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule, MSCRAMM)和应激蛋白相关。

2.3.3 CARD 数据库功能注释

由表 2 可知,菌株基因组通过 CARD 数据库注释到了 3 个耐药基因,其中 *eatAv* 是分离自屎肠球菌野生型 ABC-F 亚家族蛋白编码基因的一种突变形式,对林可酰胺类、链阳菌素 A 和截短侧耳素类抗生素具有抗性(LSaP 表型); *msrC* 在屎肠球菌中表达,是染色体编码的 ABC-F 亚家族蛋白,对红霉素等大环内酯类和链阳菌素 B 类抗生素耐药; *AAC(6')-Ii* 是肠球菌中染色体编码的氨基糖苷类乙酰转移酶。

2.4 生物合成基因簇和次级代谢基因簇预测

由图 3 可知,在菌株 F11.1G 的第 1 条染色

体上预测到了 3 种次级代谢产物基因簇,分别为类环内酯自诱导肽(cyclic-lactone-autoinducer)、非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS/NRPS-like)、III 型聚酮合酶 (type III polyketide synthase, T3PKS),均未对比到与之相似的已知基因簇,功能未知。

2.5 比较基因组

2.5.1 基因共线性分析

将菌株 F11.1G 与益生菌株 T110 全基因组序列进行比对分析,通过共线性分析识别了 2 个基因组的一致性及变异性。菌株 F11.1G 和 T110 的共线性分析结果见图 4,菌株 ANI 为 97.73,表明反映的菌株间亲缘关系较近,全基因组共线性分析表明,2 株菌的基因组高度相似,但存在翻转、易位等基因组重排。

2.5.2 基因组组分比较分析

屎肠球菌 T110 的完整环状染色体大小为 2 693 877 bp,与菌株 F11.1G 基因组大小相当。菌株 T110 是一种非致病性益生菌,其质粒 (pEFT-110)长度为 44 086 bp。菌株 T110 全基因组注释 2 626 个编码基因,66 个 tRNA,18 个 rRNA,4 个基因岛。菌株 T110 未预测到毒力基因、耐药基因和病原菌基因。antiSMASH 预测到

表 1 F11.1G 基因组毒力基因注释结果

Table 1 Annotation results of virulence genes of strain F11.1G

Gene ID	Gene	Description	Predicted function	E-value	Identity (%)
GE001301	<i>sgrA</i>	Cell wall anchored protein <i>SgrA</i>	Adherence; Biofilm formation	1.04E-101	99.30
GE002118	<i>Acm</i>	Collagen adhesin precursor <i>Acm</i>	Adherence; MSCRAMM	0	96.50
GE000404	<i>bopD</i>	Sugar-binding transcriptional regulator, <i>Lac I</i> family	Biofilm formation	0	86.30
GE002005	<i>clpP</i>	ATP-dependent <i>Clp</i> protease proteolytic subunit	Stress protein	7.37E-119	81.10

表 2 F11.1G 耐药基因注释结果

Table 2 Resistance gene annotation results of strain F11.1G

Gene ID	Gene	Resistance	Product	Identity (%)
GE000628	<i>eatAv</i>	Pleuromutilin; streptogramin; lincosamide	Mutated form of the wildtype <i>eatA</i> ABC-F subfamily protein	98.80
GE002487	<i>msrC</i>	Streptogramin; macrolide	ABC-F subfamily protein	97.15
GE002109	<i>AAC(6')-Ii</i>	Aminoglycoside	Aminoglycoside acetyltransferase	98.90

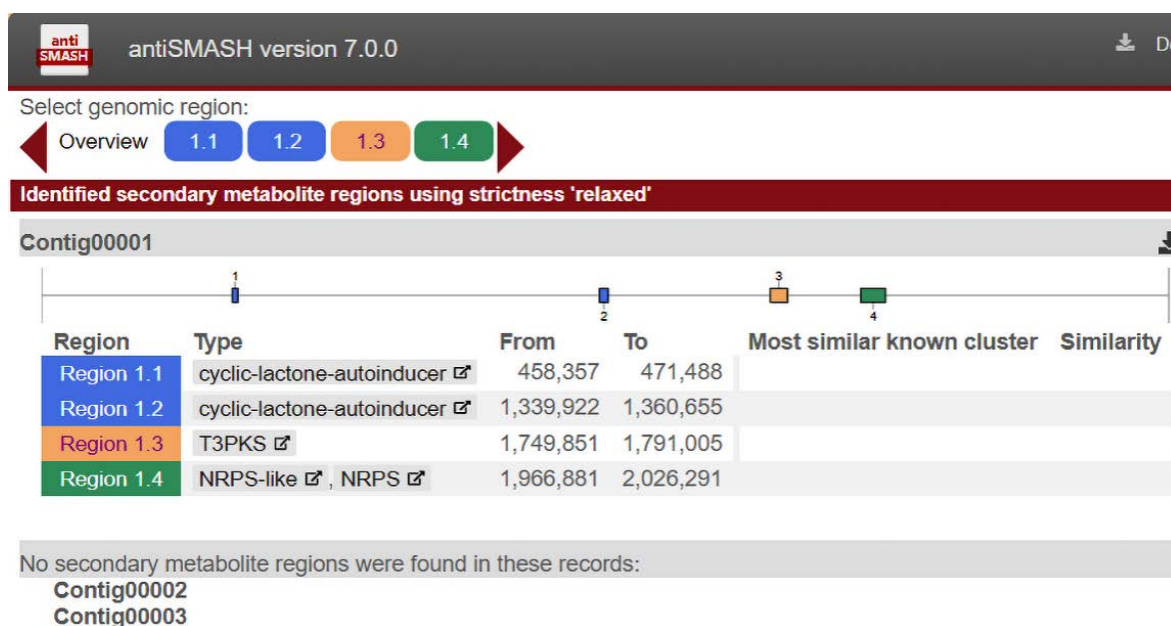


图3 菌株 F11.1G 基因组的 antiSMASH 比对结果

Figure 3 antiSMASH functional annotation diagram of strain F11.1G.

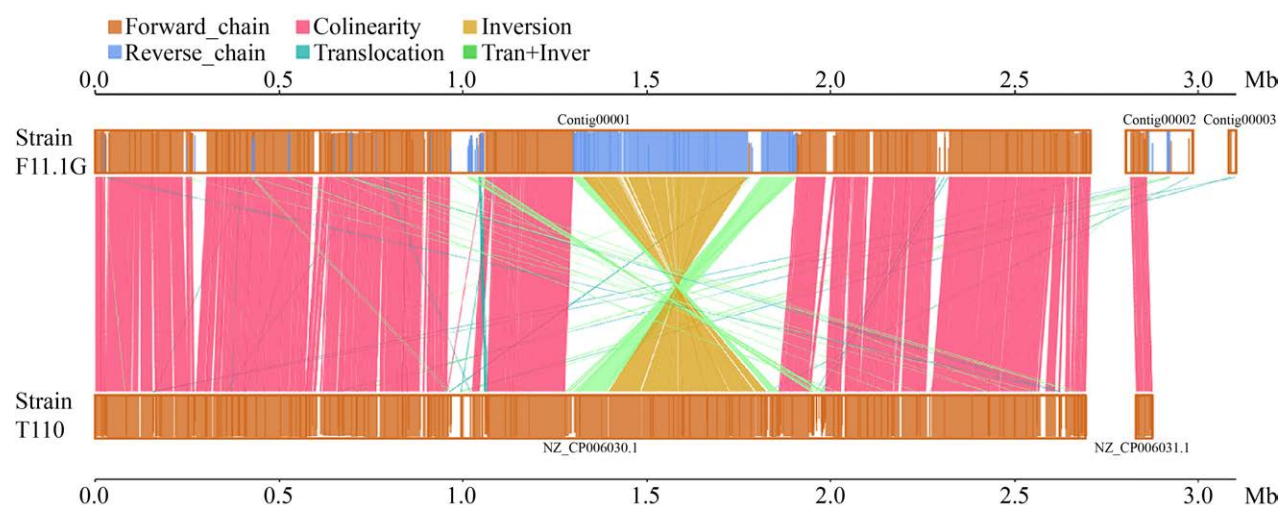


图4 菌株 F11.1G 与菌株 T110 的共线性分析

Figure 4 Synteny analysis of strain F11.1G and strain T110.

了4种次级代谢产物基因簇(图5),共7条,包括类环内酯自诱导肽(cyclic-lactone-autoinducer)、包含集群的 RRE 元素(RRE-containing)、核糖体合成翻译后修饰多肽(RiPP-like)和 T3PKS, RiPP-like 对比到与之相似的已知基因簇 RiPP, 相似度 33%。

2.6 代谢组学检测结果

2.6.1 代谢物主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)

由图 6A 的 PCA 得分图可以看出,3 个质控(quality control, QC)样本紧密聚类,表明数据

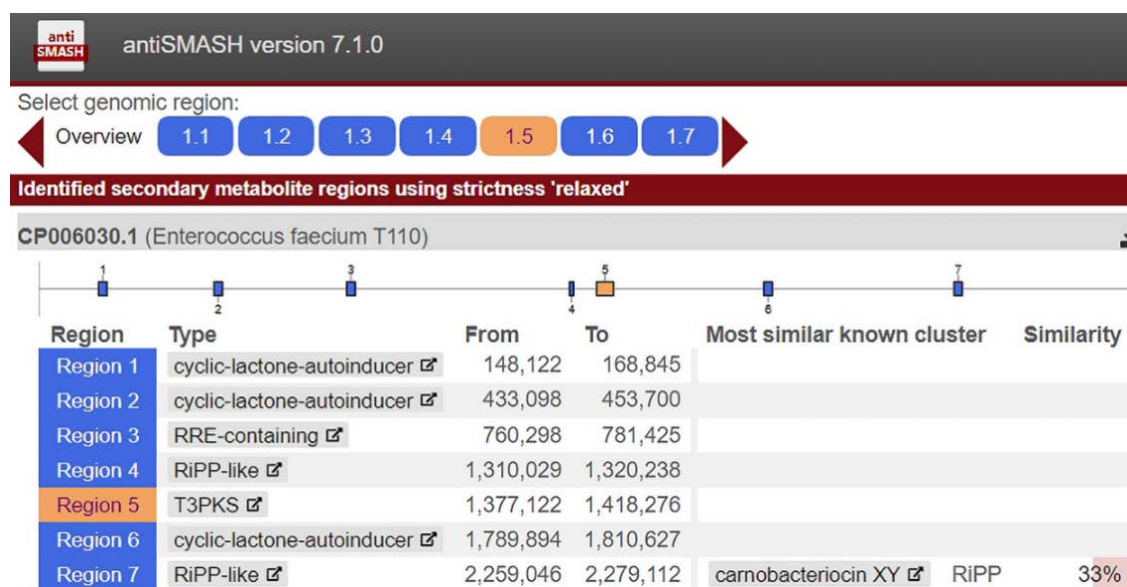


图 5 菌株 T110 基因组 antiSMASH 比对结果

Figure 5 antiSMASH functional annotation diagram of strain T110.

可靠可以用于进一步分析。正、负离子 OPLS-DA 得分图见图 6B、6C: OPLS-DA 模型在 ESI⁺模式和 ESI⁻模式下 R^2Y 和 Q^2Y 值均接近 1, 表明 2 个模型的解释率和预测能力具有可行性。代谢数据样本量的模型的置换检验结果见图 6D, 生成的模型具有良好的拟合和预测能力, 所建模型可靠, 可用于差异代谢物筛选。

2.6.2 代谢物数据库注释

KEGG 数据库注释到菌株 F11.1G 胞内代谢物 766 种, 将差异代谢物进行 KEGG 富集分析, 如图 7A 所示, 主要注释到 12-、14-和 16-元大环内酯生物合成(biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides)、II型聚酮类产物生物合成(biosynthesis of type II polyketide products)、泛醌和其他萜类-醌生物合成(ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis)、星形孢菌素的生物合成(staurosporine biosynthesis)、脂肪酸延长(fatty acid elongation)等差异代谢物。由图 7B 可见, 共富集到 8 类通路(top 20), 主要为其他次级代谢产物生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites)、萜类和聚酮类代谢(metabolism of terpenoids and polyketides)和氨

基酸代谢(amino acid metabolism)等。

2.6.3 差异代谢物分析

由图 8 可见, 菌株 F11.1G 胞内的样本共有 2 354 种差异显著代谢物, 使得 1 263 种代谢物发生显著上调, 1 091 种发生显著下调[$P < 0.05$, 差异倍数(fold change, FC) ≥ 1 , VIP ≥ 1], 胞内中上调的差异代谢物是 dGDP、CDP-核糖醇、dTDP-5-二甲基-L-赖氨酸、UDP-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸等; 胞内中下调的差异代谢物是 L-赖氨酸、葫芦巴碱、L-鼠李糖、短杆菌肽 S、甲萘醌等。结果表明胞内外代谢物存在显著差异, 并且差异代谢物主要集中在萜类和聚酮类、氨基酸、生物碱、有机酸、有机杂环化合物等, 这些化合物可能与菌株 F11.1G 的抑菌作用相关。

2.7 代谢产物挖掘

2.7.1 代谢产物的抑菌活性试验

抑菌圈直径如表 3 所示, B、C 组对大肠杆菌、沙门氏菌有较强的抑菌作用, A 组抑菌圈直径虽相对较小, 但仍有一定的抑菌作用。而 D 组无抑菌圈产生, 排除溶剂对前 3 组活性代谢产物的抑菌作用影响。

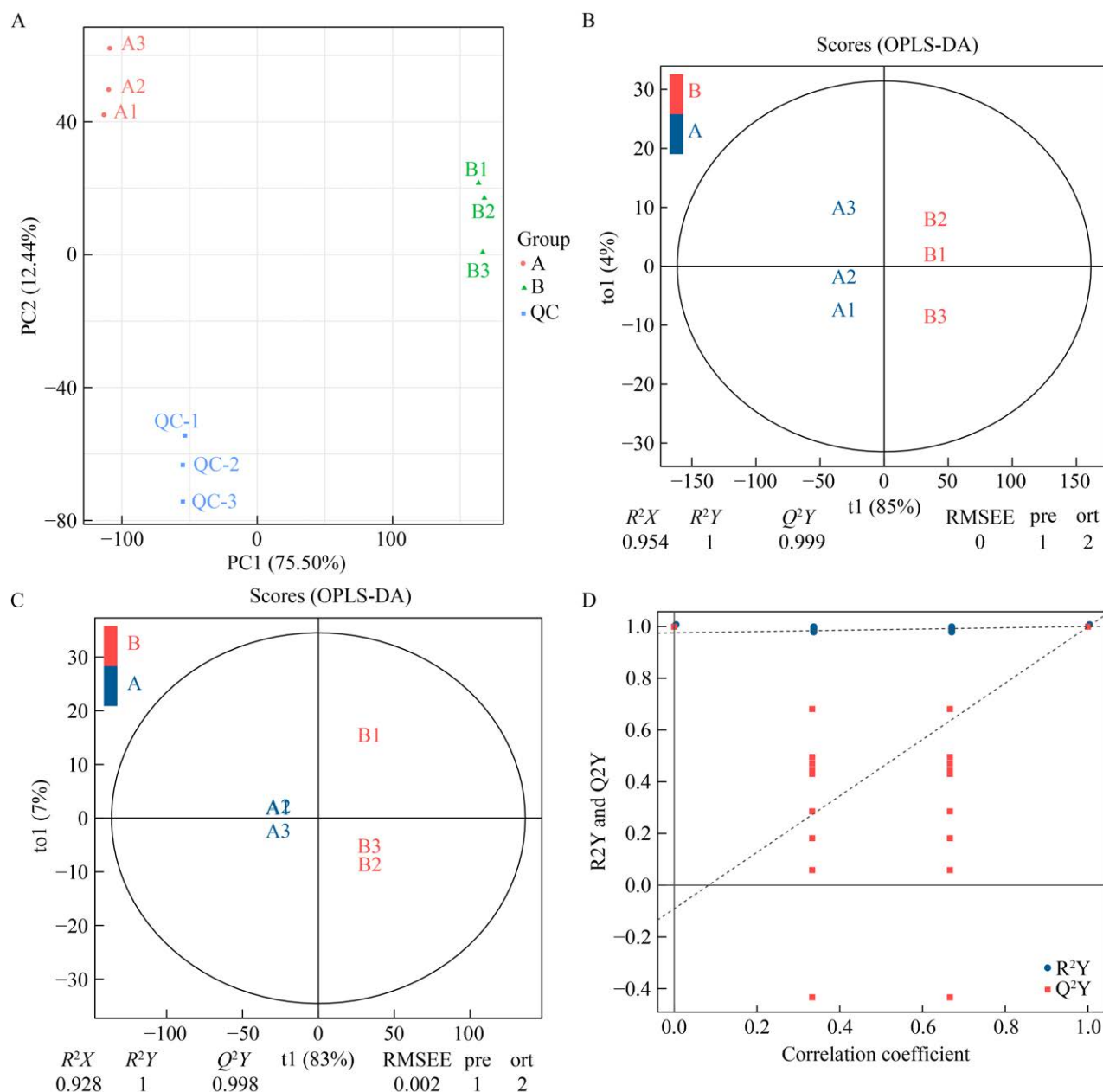


图6 A组对B组代谢物数据分析 A: A组对B组代谢物主成分分析得分图; B: A组对B组代谢物正离子模式正交偏最小二乘法判别分析图(ESI⁺模式: $R^2Y=1$, $Q^2Y=0.999$); C: A组对B组代谢物负离子模式正交偏最小二乘法判别分析得分图(ESI⁻模式: $R^2Y=1$, $Q^2Y=0.998$); D: A组对B组正交偏最小二乘法判别分析模型的置换检验。A1-A3: 菌株 F11.1G 胞外代谢物; B1-B3: 菌株 F11.1G 胞内代谢物; QC-1-QC-3: 质控样本。

Figure 6 Metabolite data analysis for group A vs. B. A: Metabolite principal component analysis score plot for group A vs. B; B: Metabolite positive ion mode orthogonal partial least squares discriminant analysis plot for Group A vs. B (ESI⁺ mode: $R^2Y=1$, $Q^2Y=0.999$); C: Metabolite orthogonal partial least squares discriminant analysis scores plot in negative ion mode for Group A vs. B (ESI⁻ mode: $R^2Y=1$, $Q^2Y=0.998$); D: Permutation test of orthogonal partial least squares discriminant analysis model for group A vs. B. A1-A3: F11.1G extracellular metabolites; B1-B3: F11.1G intracellular metabolites; QC-1-QC-3: Quality control sample.

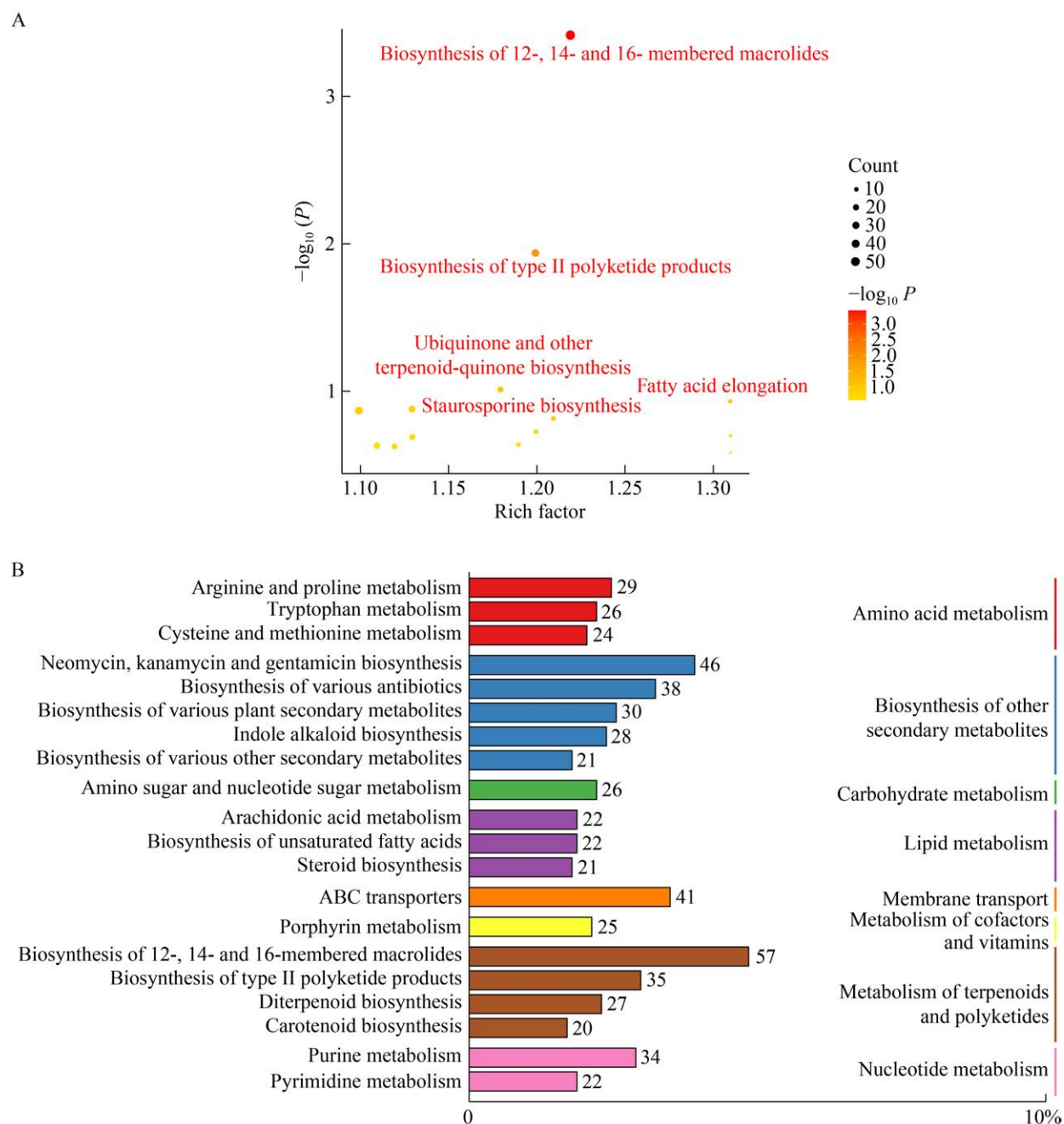


图 7 菌株 F11.1G 胞内代谢物的数据库注释 A: 菌株 F11.1G 胞内差异代谢物 KEGG 富集因子气泡图。横坐标为该通路中富集到的差异代谢物的富集因子, 纵坐标为通路 P -value, 点代表富集到的差异代谢物的个数。B: 菌株 F11.1G 胞内代谢物 KEGG 注释。

Figure 7 Database annotation of intracellular metabolites of strain F11.1G. A: Bubble plot of KEGG enrichment factors for intracellular differential metabolites of strain F11.1G. The horizontal coordinate is the enrichment factor of the differential metabolite enriched in the pathway, the vertical coordinate is the pathway P -value, and the size of the point represents the number of differential metabolites enriched. B: F11.1G intracellular metabolite KEGG annotations.

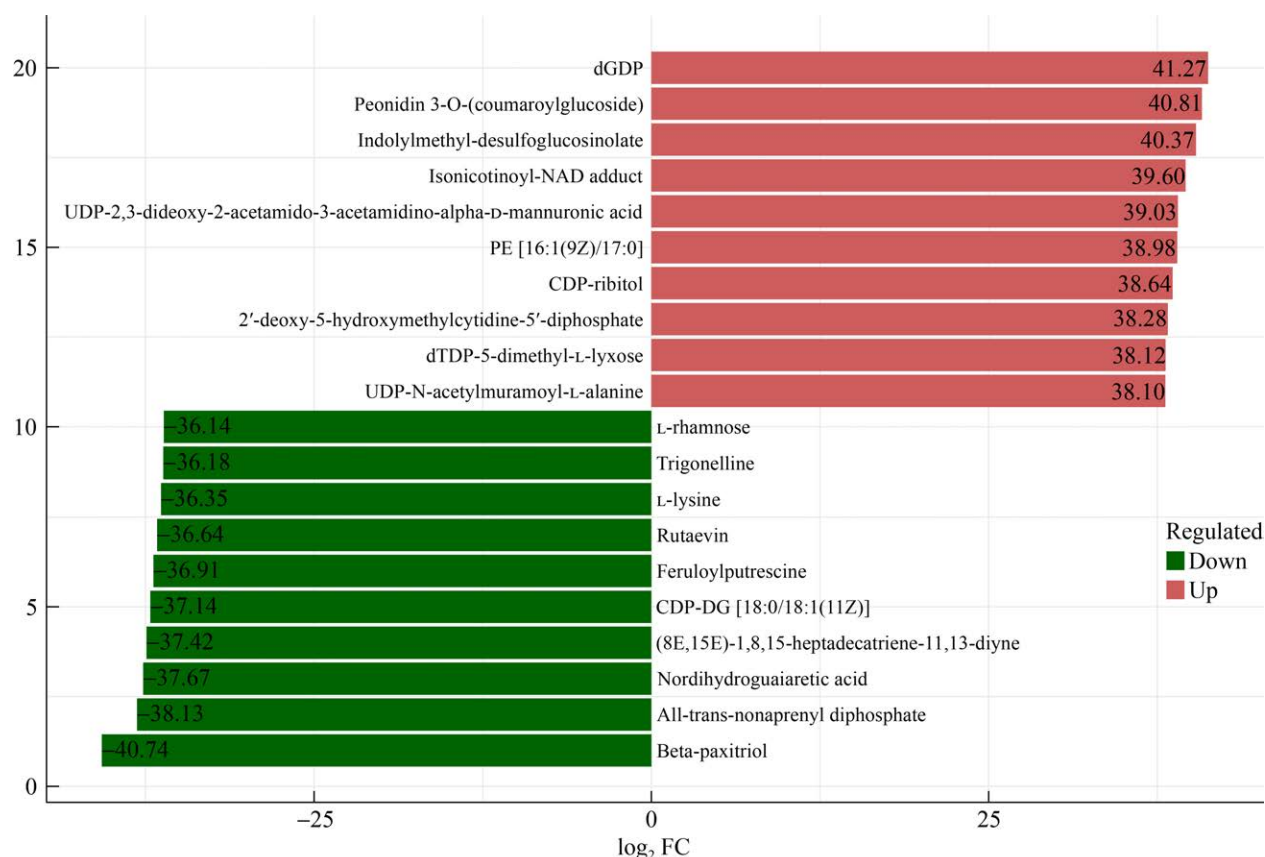


图8 A组对B组差异代谢物差异倍数条形图

Figure 8 Differential metabolite differential multiplicity bar graph for group A vs. B.

表3 不同萃取方式的代谢产物的平均抑菌圈直径
Table 3 Metabolites with different extraction methods and the mean inhibitory (mm)

Group	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
A	5–8	6–9
B	10–12	12–13
C	11–12	12–18
D	0	0

2.7.2 代谢产物的高分辨质谱结构鉴定

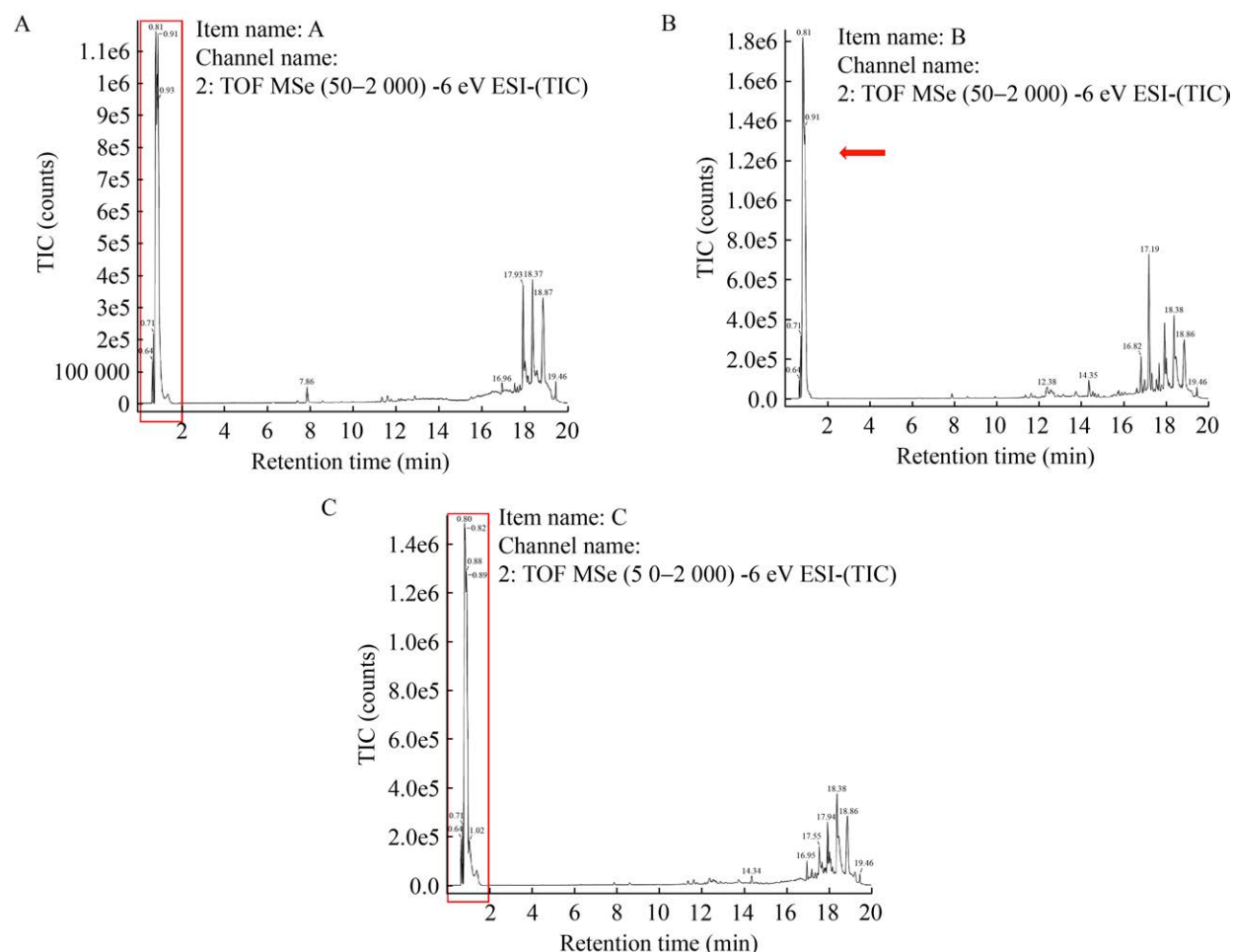
图9A–9C分别为A组乙酸乙酯相分离代谢产物质谱图、B组甲醇相分离代谢产物质谱图和C组水相分离代谢产物质谱图，由其一级、二级质谱图可知，产物的纯度已经较高，杂质离子峰干扰较少。A组分离鉴定出毛蕊花糖、黑种草三糖、水苏糖、蔗糖、二聚体白屈菜默碱等多种活性寡糖成分及生物碱；B组分离鉴

定出蔗糖、4-氧化戊酸、 α -D-型葡萄糖、二聚体白屈菜默碱、1-羟基蒽醌等代谢产物；C组分鉴定出水苏糖、黑种草三糖、耐斯糖、蔗糖、极少量醌类和酮类活性物质。

3 讨论

3.1 全基因组测序、比较基因组和代谢组学分析

肠球菌可以带来健康益处，如改变宿主的微生物群，增强肠道屏障及调节免疫力^[19]。但是，有多株屎肠球菌菌株被确定为医院感染的病原体，这使其作为益生菌的使用存在争议^[3]。抗生素耐药和毒力基因与细菌致病性相关^[20]，内在耐药性是细菌在微生物形成过程中产生的，一般不会转移；细菌获得耐药性则是通过噬菌体、转座子、质粒和其他可转移元件上耐



原因^[26]。因此, F11.1G 存在耐药基因以及质粒等可转移元件, 具有将抗药性传播给其他物种和菌属的风险。

毒力因子在细菌感染的定殖、侵袭和病理变化产生中起着重要作用, 其与黏附、生物膜形成、MSCRAMM 和应激蛋白相关。肠球菌的毒力因子包括表面蛋白(*Enterococcus* surface protein, esp)、溶血素(cytolysin, cyl)、心内膜炎抗原(endocarditis antigen, efaA)、聚集物质(aggregation substance, AS)、明胶酶(gelatinase, gelE)等^[17]。研究证实毒力决定因素为 cyl、AS 和 gelE^[27], 菌株 F11.1G 中并未发现上述因子。但是, 菌株 F11.1G 携带潜在毒力因子基因 *Acm*, 该基因编码胶原结合蛋白 *Acm*, 参与了与宿主蛋白质及其他生物和非生物表面的黏附以及生物膜的形成, 黏附是感染过程中的一个关键过程, 也是选择潜在益生菌的主要标准之一^[28]。有研究认为, *IS16* 可作为医院多重耐药性菌株的预测标志物, 但菌株 F11.1G 不含 *IS16*, 可将菌株 F11.1G 与临床菌株区分开来^[29]。根据欧洲食品安全局的指南, 当菌株对氨苄青霉素敏感且缺乏 *IS16*、*esp* 和 *hyl* 毒力基因时, 可评定为安全, 并可用作饲料添加剂^[30], 因此菌株 F11.1G 用于饲料中是安全的。

屎肠球菌 T110 是从健康人肠道中分离出的市售益生菌菌株, 广泛用于人类、动物和水产养殖^[31]。屎肠球菌 T110 未预测到致病相关基因。比较基因组发现菌株 F11.1G 与 T110 基因组大小相当, 菌株间亲缘关系较近, 基因组高度相似。在抗菌物质合成方面, 菌株 F11.1G 与 T110 都预测到了 cyclic-lactone-autoinducer 和 T3PKS。Cyclic-lactone-autoinducer 合成基因簇为其独特的合成基因簇, 可以产生抗菌肽或通过群体感应调节来抑制致病菌生物膜的形成^[32]; 聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)和非核糖体肽合成酶(non-nucleic acid peptide synthetase, NRPS)是细菌生物合成的主要代谢物簇, 可以合成如抗生素、抗真菌药物和免疫抑制剂等在医学和

研究中有益的产品; T3PKS 是一种从酰基辅酶 A 底物合成具有生物活性、结构多样的多酮化合物的酶^[33], 是两类细菌素的生物合成基因簇^[34]。在乳酸乳球菌乳亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) LL16 基因组中的 T3PKS 区域可产生具有食品安全的细菌素^[35]。菌株 T110 预测到的 RiPP-like 是一种核糖体合成翻译后修饰的具有生物活性的多肽类天然产物, 具有多重的抗菌机制, 可以作用于细胞壁的形成, 达到抑菌作用^[36]。尽管 2 种菌株合成抗菌物质的基因簇具有相似性, 但菌株 F11.1G 相对菌株 T110 的抑菌能力强弱还需进一步研究。在 F11.1G 的蛋白质编码区(coding sequence, CDS)找到了 NRPS:CDS complement (23521..39411), NRPS 参与抗菌肽的合成, 其基因功能域与腺苷酸结合、缩合、磷酸化蛋白结合、生物合成-附加及平面细胞极性蛋白等有关^[37], 后期通过合成 NRPS 基因, 验证其抑菌作用, 从而说明 F11.1G 中起到抗菌作用的物质。

益生菌的代谢物质中除了产生抗菌肽, 还可能产生如有机酸、生物碱、聚酮等具有抑菌活性的物质^[38]。菌株 F11.1G 中多种差异代谢物参与 II 型聚酮产物生物合成通路和非核糖体肽生物合成通路, 与 antiSMASH 预测结果一致, 可能与抗菌相关。非靶向代谢组学结果表明菌株 F11.1G 胞内存在着 D-乳酸、短杆菌肽 S、氟喹啉、异喹啉、罗利吡咯、3-吡啶乙酸、雄黄酮 A、4-羟基香豆素、胆碱、麻黄碱、茄碱等可能是菌株 F11.1G 中具有抑菌作用的物质。有机酸(乳酸和苯乳酸)通过干扰病原体细胞膜功能来发挥抑菌作用, 导致膜通透性增加、细胞内容物丢失、裂解和死亡^[39]。益生菌产生的吡啶类^[40]、喹啉类、吡咯类、吡啶类、哌啶类等生物碱也具有良好的抑菌活性, 吡咯类的生物碱由非核糖体多肽酶和聚酮合酶进行生物合成, 吡咯里西啶类生物碱生物合成前体是 L-脯氨酸、L-苏氨酸和短链脂肪酸^[41]。植物次生代谢过程中产生的萜类化合物(单萜和倍半萜)是

精油具有抗菌活性的主要成分^[42]。在 F11.1G 中存在多种萜烯代谢物参与吲哚二萜生物碱生物合成通路和各种生物碱生物合成通路, L-脯氨酸可能通过合成吡咯里西啶类生物碱使菌株获得抑菌作用。研究证实, 许多氨基酸的存在可能表明抗菌活性中可能有多肽或蛋白质的参与^[43]。环状二肽(L-亮氨酸-L-脯氨酸)是生物活性组分中的主要化合物, 链霉菌 V16R3Y1 产生 L-亮氨酸-L-脯氨酸从而表现出广泛的抗菌活性^[44]。菌株 F11.1G 胞内的差异代谢物中鉴定出多种二肽(丝氨酸-赖氨酸、L-亮氨酸-L-脯氨酸、丝氨酸-谷氨酸、丝氨酸-甘氨酸等), 可能是使菌株 F11.1G 具有抑菌活性的代谢物质。除此以外, 菌株 F11.1G 胞内还有多种抗生素, 如利福霉素、链霉素、两性霉素 B、新霉素等, 以及四环素、青霉素、头孢菌素、链霉素、万古霉素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素等多种抗生素生物合成通路, 可能赋予了菌株抑菌能力。

3.2 代谢产物挖掘

屎肠球菌是环境中的优势益生菌, 是微生态制剂的重要来源, 所产生的次生代谢产物十分丰富, 在数量和种类上占据优势地位, 具有很重要的研究价值, 屎肠球菌 F11.1G 中分离鉴定出的活性代谢产物包括: 毛蕊花糖($C_{30}H_{52}O_{26}$)是五糖类低聚半乳糖, 具有抗氧化、抗炎、神经保护、抗肿瘤和抗衰老和神经保护作用^[45]。四糖结构的水苏糖由 2 个 α -半乳糖分子、1 个 α -葡萄糖分子和 1 个 β -果糖分子组成, 具有低甜度、低热量和强大的稳定性^[46], 能够靶向调节改善胃肠道中有益微生物和调节免疫^[47]等功效, 已被用于提高食品质量和开发功能性食品。耐斯糖为四聚糖, 是巴戟天中抗抑郁的主要活性成分^[48]。源自黑种草种子的天然寡糖黑种草三糖(黑种草籽糖), 结合黑种草本身具有的利尿、镇痛、缓解失眠、治疗头晕与耳鸣、缓解肠道和消化不良以及控制糖尿病、降糖和降血压的功效^[49], 其在植物源功能性成分研究中占据重要地位。目前对乳酸菌的次生代谢物研究主

要集中于抗菌活性物质, 如文献表明, 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) PJP10 可产 iturin 等几种枯草菌素^[50], 屎肠球菌 TRS5 所产细菌素是肠球菌素 enterocin P 等^[51], 通过代谢组学在菌株 F11.1G 胞内鉴定出链霉素、两性霉素 B、新霉素等抗生素类产物, 以及链霉素、新霉素、卡那霉素和庆大霉素等多种抗生素生物合成通路, 但未分离出抗生素等物质, 可能与代谢物所用的仪器、溶剂以及数据库范围而有所不同。乳酸菌次生代谢物分离得到寡糖类的相关研究鲜有报道。在代谢组学中, 菌株 F11.1G 鉴定到多种糖类差异代谢物, 如阿卡波糖、壳寡糖、异麦芽三糖、L-1-磷酸岩藻糖、 α -1,5-L-阿拉伯双糖、棉籽糖、dTDP-D-葡萄糖、D-氨基葡萄糖等。因此, 菌株 F11.1G 中蕴含着丰富的寡糖类活性代谢资源和抗生素资源, 通过使用不同的分离手段和鉴定方法得到活性好的单体化合物, 对于丰富次生代谢产物资源具有一定的贡献。

4 结论

本研究通过对菌株 F11.1G 进行全基因组测序和功能预测, 从基因水平全面评估了菌株安全性。菌株含有 4 个毒力相关基因、3 个耐药基因和 3 种次级代谢产物基因簇, 非靶向代谢组学分析表明菌株 F11.1G 中差异代谢物主要集中在萜类和聚酮类、生物碱、有机酸等, 可能赋予了菌株抑菌效果。通过高分辨质谱鉴定出菌株 F11.1G 中存在黑种草三糖、毛蕊花糖、水苏糖、耐斯糖、二聚体白屈菜默碱、4-氧化戊酸、1-羟基蒽醌和极少量酮类物质等代谢产物。本研究对开发绿色、高效、性质稳定的天然抗菌剂具有重要的意义, 为屎肠球菌 F11.1G 作为微生态制剂商品化开发利用提供了科学依据。

作者贡献声明

白天天: 全基因组、比较基因组、代谢组学测序及分析、撰写、修改论文; 万颖: 参与代谢产物挖掘相关试验及分析、撰写相关部分

论文；张延龙：参与全基因组分析并修改论文；黄丹：参与代谢组分析并修改论文；顾皓斐：参与代谢产物挖掘相关试验；普宣宣：参与试验设计并修改论文；张萌：参与代谢物相关基因分析；郭雪峰：论文选题、实验指导、资金支持。

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] XU Q, YANG Z, CHEN SY, ZHU WJ, XIAO SY, LIU J, WANG HQ, LAN SL. Effects of replacing dietary fish meal by soybean meal co-fermented using *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* on serum antioxidant indices and gut microbiota of crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Fishes*, 2022, 7(2): 54.
- [2] SON Y, JIN YB, CHO EJ, PARK AR, FLORES RA, NGUYEN BT, LEE SY, ALTANZUL B, PARK KI, MIN W, KIM WH. Comparative analysis of antibiotic resistance and biofilm characteristics of two major *Enterococcus* species from poultry slaughterhouses in Korea[J]. *Veterinary Sciences*, 2024, 11(4): 180.
- [3] ZHOU XW, WILLEMS RJL, FRIEDRICH AW, ROSSEN JWA, BATHOORN E. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics[J]. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2020, 9(1): 130.
- [4] LIU ZL, CHEN YJ, MENG QL, ZHANG X, WANG XL. Progress in the application of *Enterococcus faecium* in animal husbandry[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1168189.
- [5] 帕提古丽·毛拉红, 郭雪峰, 尹雪, 刘俊峰. 抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和黄曲霉菌的乳酸菌作用对比[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2019, 40(1): 55-59.
Patiguli-Maolahong, GUO XF, YIN X, LIU JF. Comparison of inhibitory effects of lactic acid bacteria on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus flavus*[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2019, 40(1): 55-59 (in Chinese).
- [6] 朱振宇, 杨成, 王明根, 卢冬, 郭雪峰. 添加屎肠球菌对4种饲料原料发酵效果的影响[J]. 塔里木大学学报, 2023, 35(2): 67-73.
ZHU ZY, YANG C, WANG MG, LU D, GUO XF. Effect of *Enterococcus faecium* on the fermentation effect of four feed materials[J]. *Journal of Tarim University*, 2023, 35(2): 67-73 (in Chinese).
- [7] 朱振宇, 杨成, 王明根, 俄广旭, 刘俊峰, 卢冬, 郭雪峰. 屎肠球菌 F11.1G 菌剂对断奶羔羊生长性能、营养物质表观消化率、屠宰性能、瘤胃发酵和瘤胃微生物区系的影响[J]. 动物营养学报, 2024, 36(5): 3143-3155.
- [8] PARKER EJ, BILLANE KC, AUSTEN N, COTTON A, GEORGE RM, HOPKINS D, LAKE JA, PITMAN JK, PROUT JN, WALKER HJ, WILLIAMS A, CAMERON DD. Untangling the complexities of processing and analysis for untargeted LC-MS data using open-source tools[J]. *Metabolites*, 2023, 13(4): 463.
- [9] 施琳波, 彭晴, 徐小轻, 张宇微, 杨硕, 田丹丹, 何孟欣, 石波, 乔宇. 共培养干酪乳杆菌 NA-2 和鼠李糖乳杆菌 LGG 对抑菌活性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(6): 63-71.
SHI LB, PENG Q, XU XQ, ZHANG YW, YANG S, TIAN DD, HE MX, SHI B, QIAO Y. Effects of co-culture of *Lactobacillus casei* NA-2 and *Lactobacillus rhamnosus* LGG on antibacterial activity[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2024, 26(6): 63-71 (in Chinese).
- [10] CHENG HY, CONCEPCION GT, FENG XW, ZHANG HW, LI H. Haplotype-resolved *de novo* assembly using phased assembly graphs with HiFiASM[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(2): 170-175.
- [11] 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.
- [12] CHAN PP, LOWE TM. tRNAscan-SE searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1962: 1-14.
- [13] NAWROCKI EP, EDDY SR. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(22): 2933-2935.
- [14] BERTELLI C, BRINKMAN FSL. Improved genomic island predictions with Island Path-DIMOB[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(13): 2161-2167.
- [15] TARAIOLO-GRAOVAC M, CHEN NS. Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2009, 25(1): 4.10.1-4.10.14.
- [16] 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.
- [17] 张泉. 饲用乳酸菌的筛选及其微胶囊制备的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2023.
ZHANG X. Screening of lactic acid bacteria for feeding and their microencapsulation preparation[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [18] 刘思美, 强喆, 吴思澜, 涂如霞, 李恒华, 黄崇刚. 痰湿阻肺型 COPD 大鼠模型的构建及代谢组学分析[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 51-63.
LIU SM, QIANG Z, WU SL, TU RX, LI HH, HUANG CG. Establishment and metabolomics analysis of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease with phlegm-dampness syndrome[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2023, 31(1): 51-63 (in Chinese).
- [19] WANG XM, YANG YH, HUYCKE MM. Risks associated with enterococci as probiotics[J]. *Food*

- Research International, 2020, 129: 108788.
- [20] BEN BRAÏEK O, SMAOUI S. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics[J]. BioMed Research International, 2019, 2019(1): 5938210.
- [21] NOEL HR, PETREY JR, PALMER LD. Mobile genetic elements in *Acinetobacter* antibiotic-resistance acquisition and dissemination[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2022, 1518(1): 166-182.
- [22] KIM YB, SEO KW, SON SH, NOH EB, LEE YJ. Genetic characterization of high-level aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from retail chicken meat[J]. Poultry Science, 2019, 98(11): 5981-5988.
- [23] 万颖, 王明根, 朱振宇, 白天天, 杨成, 郭雪峰. 产细菌素屎肠球菌 F11.1G 的生物学特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3119-3132.
- WAN Y, WANG MG, ZHU ZY, BAI TT, YANG C, GUO XF. Biological characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* F11.1G[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3119-3132 (in Chinese).
- [24] MESSELE YE, HASOON MF, TROTT DJ, VELTMAN T, McMENIMAN JP, KIDD SP, LOW WY, PETROVSKI KR. Longitudinal analysis of antimicrobial resistance among *Enterococcus* species isolated from Australian beef cattle faeces at feedlot entry and exit[J]. Animals, 2022, 12(19): 2690.
- [25] DEC M, STEPIEN-PYŚNIAK D, GNAT S, FRATINI F, URBAN-CHMIEL R, CERRI D, WINIARCZYK S, TURCHI B. Antibiotic susceptibility and virulence genes in *Enterococcus* isolates from wild mammals living in Tuscany, Italy[J]. Microbial Drug Resistance, 2020, 26(5): 505-519.
- [26] TERENTJEVA M, ĶIBILDS J, AVSEJENKO J, CĪRULIS A, LABECKA L, BĒRZIŅŠ A. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolates from red foxes (*Vulpes vulpes*) in Latvia[J]. Antibiotics, 2024, 13(2): 114.
- [27] FU XM, LYU L, WANG Y, ZHANG Y, GUO XK, CHEN Q, LIU C. Safety assessment and probiotic characteristics of *Enterococcus lactis* JDM1[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 163: 105380.
- [28] SHRIDHAR PB, AMACHAWADI RG, TOKACH M, PATEL I, GANGIREDLA J, MAMMEL M, NAGARAJA TG. Whole genome sequence analyses-based assessment of virulence potential and antimicrobial susceptibilities and resistance of *Enterococcus faecium* strains isolated from commercial swine and cattle probiotic products[J]. Journal of Animal Science, 2022, 100(3): skac030.
- [29] ZAGHLOUL HAH, EL HALFAWY NM. Genomic insights into antibiotic-resistance and virulence genes of *Enterococcus faecium* strains from the gut of *Apis mellifera*[J]. Microbial Genomics, 2022, 8(11): mgen000896.
- [30] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition[J]. EFSA Journal, 2012, 10(5): 2682.
- [31] NATARAJAN P, PARANI M. First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2015, 42(1): 43-46.
- [32] 李佳珣. 植物乳杆菌 CCFM8724 抑制双菌生物膜的物质基础和作用机制探究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- LI JX. Study of the mechanism and active substances of *Lactiplantibacillus plantarum* CCFM8724 on the inhibition of dual species biofilm[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [33] RUPPITSCH W, NISIC A, STÖGER A, ALLERBERGER F, MARTINOVIC A. Draft genome sequences of five *Enterococcus faecium* isolates from traditional Montenegrin brine cheese[J]. Microbiology Resource Announcements, 2020, 9(19): e00353-20.
- [34] 陈志娜, 尹琳琳, 刘锦, 邵孟元, 叶韬, 黄晓辰. 1 株抑 MRSA 植物乳杆菌 CHEN1 的全基因组测序及产细菌素基因分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 43-50.
- CHEN ZN, YIN LL, LIU J, SHAO MY, YE T, HUANG XC. Complete gene sequencing and bacteriocin-producing gene analysis of a *Lactobacillus plantarum* CHEN1 inhibiting MRSA[J]. Food Science, 2024, 45(2): 43-50 (in Chinese).
- [35] MILERIENE J, AKSOMAITIENE J, KONDROTIENE K, ASLEDOTTIR T, VEGARUD GE, SERNIENE L, MALAKAUSKAS M. Whole-genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL16 confirms safety, probiotic potential, and reveals functional traits[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 1034.
- [36] 汪金秀, 张琪, 丁伟, 陈拓. 核糖体肽生物合成中的典型翻译后修饰研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 215-225.
- WANG JX, ZHANG Q, DING W, CHEN T. Classic post-translational modification in ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides biosynthesis[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(10): 215-225 (in Chinese).
- [37] LUNDY TA, MORI S, CHANDRIKA NT, GARNEAU-TSODIKOVA S. Characterization of a unique interrupted adenylation domain that can catalyze three reactions[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15(1): 282-289.
- [38] 孔祥丽, 吴昕雨, 许晓曦. 植物乳杆菌代谢产物抑菌机制与应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3131-3140.
- KONG XL, WU XY, XU XX. Research progress on metabolites and bacteriostasis mechanism of *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(8): 3131-3140 (in Chinese).
- [39] ZHANG H, HUANGFU HP, WANG X, ZHAO SS, LIU Y, LV HX, QIN GY, TAN ZF. Antibacterial activity of lactic acid producing *Leuconostoc mesenteroides* QZ1178 against pathogenic *Gallibacterium anatis*[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 630294.
- [40] 漆亚云, 胡伟男, 孟娇, 陈洁, 李文, 朱梅, 甘宜远, 王贞超, 欧阳贵平. 吡啶类化合物抑菌活性研究进展[J]. 化学研究与应用, 2019, 31(7): 1225-1233.
- QI YY, HU WN, MENG J, CHEN J, LI W, ZHU M, GAN YY, WANG ZC, OUYANG GP. Research advance on antibacterial activity of indole compounds[J]. Chemical Research and Application, 2019, 31(7): 1225-1233 (in Chinese).
- [41] 李赛男, 段燕文, 黄勇. 细菌源吡咯里西啶类生物碱的发现及生物合成研究进展[J]. 微生物学通报, 2021,

- 48(7): 2437-2453.
LI SN, DUAN YW, HUANG Y. Discovery and biosynthesis of bacterial pyrrolizidine alkaloids[J]. Microbiology China, 2021, 48(7): 2437-2453 (in Chinese).
- [42] ZHAO X, YAN Y, ZHOU WH, FENG RZ, SHUAI YK, YANG L, LIU MJ, HE XY, WEI Q. Transcriptome and metabolome reveal the accumulation of secondary metabolites in different varieties of *Cinnamomum longepaniculatum*[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 243.
- [43] FUOCHI V, CARDILE V, PETRONIO GP, FURNERI PM. Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(5): 1541-1550.
- [44] SAADOULI I, ZENDAH EL EUCH I, TRABELSI E, MOSBAH A, REDISSI A, FERJANI R, FHOULA I, CHERIF A, SABATIER JM, SEWALD N, OUZARI HI. Isolation, characterization and chemical synthesis of large spectrum antimicrobial cyclic dipeptide (L-Leu-L-Pro) from *Streptomyces misionensis* V16R3Y1 bacteria extracts. a novel ¹H NMR metabolomic approach[J]. Antibiotics, 2020, 9(5): 270.
- [45] WU PT, LV QG, WANG S, FENG XQ, ZHANG KY, LI CN, LI YS, GAO XC, SUN JM. Using a dual-disease target mapping network pharmacology approach, verbascoside ameliorates osteoporosis by activating estrogen signaling to alleviate oxidative stress[J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2024.
- [46] TA XT, WANG BT, BAI JY, YU JL, CHEN HY, WANG C. The source, extraction, purification, physiological function, and application of stachyose in the food industry[J]. Food Chemistry, 2024, 461: 140791.
- [47] WANG N, REN DY, ZHANG L, HAN N, ZHAO Y, YANG XB. Effects of sheep whey protein combined with Fu brick tea polysaccharides and stachyose on immune function and intestinal metabolites of cyclophosphamide-treated mice[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(7): 3402-3413.
- [48] 孙恬, 刘凤松, 杨丽, 冯冲, 丁平. 巴戟天采后储存温度和时间对寡糖类成分的影响[J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 80-84, 107.
SUN T, LIU FS, YANG L, FENG C, DING P. Effect of temperature and time on oligosaccharides in freshly harvested *Morinda officinalis* during storage[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(1): 80-84, 107 (in Chinese).
- [49] SALEHI B, QUISPE C, IMRAN M, UL-HAQ I, ŽIVKOVIĆ J, ABU-REIDAH IM, SEN S, TAHERI Y, ACHARYA K, AZADI H, del MAR CONTRERAS M, SEGURA-CARRETERO A, MNAYER D, SETHI G, MARTORELL M, ABDULL RAZIS AF, SUNUSI U, KAMAL RM, RASUL SULERIA HA, SHARIFI-RAD J. *Nigella* plants-traditional uses, bioactive phytoconstituents, preclinical and clinical studies[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 625386.
- [50] 娄向弟, 周强, 贺江, 张向向, 王永慧, 熊建华, 郜彦彦. 贝莱斯芽孢杆菌 PJP10 的抑菌物质稳定性及活性代谢产物挖掘[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 935-949.
LOU XD, ZHOU Q, HE J, ZHANG XX, WANG YH, XIONG JH, GAO YY. Stability evaluation and genome mining of antimicrobial metabolites of *Bacillus velezensis* PJP10[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 935-949 (in Chinese).
- [51] 荣梓嫻. 屎肠球菌 TRS5 所产细菌素的特性及其发酵条件研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
RONG ZX. Characteristics of bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* TRS5 and fermentation conditions for its production[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019 (in Chinese).