

研究报告

羊肠道蒙氏肠球菌和屎肠球菌的分离鉴定及益生特性分析

褚鑫龙^{1,2}, 马轲^{2,3}, 高鹏程^{2,3}, 付磊^{2,3}, 李学瑞^{2,3}, 冉维^{2,3}, 储岳峰^{*2,3}, 蒋建军^{*1}

1 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046

褚鑫龙, 马轲, 高鹏程, 付磊, 李学瑞, 冉维, 储岳峰, 蒋建军. 羊肠道蒙氏肠球菌和屎肠球菌的分离鉴定及益生特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2546-2562.

CHU Xinlong, MA Ke, GAO Pengcheng, FU Lei, LI Xuerui, RAN Wei, CHU Yuefeng, JIANG Jianjun. Isolation and identification of *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus faecium* with probiotic properties from the intestine of sheep[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2546-2562.

摘要:【背景】随着病原菌对抗生素耐药性的不断增加, 在畜牧业养殖中研发安全可靠的抗生素替代品变得越来越重要。益生菌以其无毒、无残留、低成本且能有效补充肠道有益微生物等诸多优点, 成为一种理想的抗生素替代品。【目的】从绵羊肠道共生菌中分离获得满足益生特性的益生菌。【方法】将健康绵羊肠道内容物及粪便在 MRS 培养基上分离纯化, 利用形态学和 16S rRNA 基因序列分析鉴定分离菌株; 通过抗菌活性分析、耐酸和耐胆盐能力测定、自聚集能力测定、抗生素敏感性分析及对小鼠的安全性测定等确定益生特性。【结果】从健康绵羊肠道中分离出多株肠道共生菌, 经鉴定其中 2 株属于肠球菌, 分别为蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*) A12 和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) C1。抗菌分析显示, 分离菌株 A12 和 C1 培养上清对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 和猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*) 均有很强的抗菌活性。耐受性分析显示分离菌株 A12 和 C1 具有良好的耐酸和耐胆盐特性, 并且均具有很强的自聚集能力。药敏试验发现分离菌株 A12 和 C1 对多种抗生素敏感。小鼠体内安全性试验显示分离菌株 A12 和 C1 未使小鼠出现明显的病理变化, 因此具备良好的安全性。【结论】分离纯化的 2 株肠道共生菌 *Enterococcus mundtii* A12 和 *Enterococcus faecium* C1 具有优良的益生特性和良好的安全性, 具备作为益生菌开发的潜力。

关键词: 羊肠道; 分离纯化; 肠球菌; 益生特性

资助项目: 甘肃省科技重大专项课题(22ZD6NA001); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2021-LVRI)

This work was supported by the Major Science and Technology Project of Gansu Province (22ZD6NA001) and the Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2021-LVRI).

*Corresponding authors. E-mail: JIANG Jianjun, jiangjianjun@shzu.edu.cn; CHU Yuefeng, chuyuefeng@caas.cn

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-02-01; Published online: 2024-04-07

Isolation and identification of *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus faecium* with probiotic properties from the intestine of sheep

CHU Xinlong^{1,2}, MA Ke^{2,3}, GAO Pengcheng^{2,3}, FU Lei^{2,3}, LI Xuerui^{2,3}, RAN Wei^{2,3},
CHU Yuefeng^{*2,3}, JIANG Jianjun^{*1}

1 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

3 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Background] As the resistance of pathogens to antibiotics is enhancing, it is increasingly important to develop safe and reliable antibiotic alternatives in the animal husbandry. Probiotics with no toxicity, no residues, and low costs have emerged as potential solutions, offering effective supplements of beneficial microorganisms in the intestinal tract. [Objective] To isolate probiotics from the intestine of sheep. [Methods] The intestinal contents and feces of healthy sheep were cultured and purified with the MRS medium, and the isolates were then identified by morphological analysis and 16S rRNA gene sequencing. The probiotic properties of the isolates were assessed, including the antimicrobial activity, acid and bile salt tolerance, self-aggregation capacity, antibiotic sensitivity, and safety in mice. [Results] Several strains were isolated from the intestine of healthy sheep, among which A12 and C1 were identified as *Enterococcus mundtii* and *E. faecium*, respectively. The cell-free supernatants of isolates A12 and C1 had strong inhibitory activities against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis*. The isolates A12 and C1 had good acid and bile salt tolerance and strong self-aggregation ability and were susceptible to a variety of antibiotics. In addition, the two isolates did not induce obvious pathological lesions in mice, demonstrating good safety. [Conclusion] *E. mundtii* strain A12 and *E. faecium* strain C1 isolated from the sheep intestine have excellent probiotic properties and good safety, showcasing the potential to be developed as probiotics.

Keywords: sheep intestine; isolation and purification; *Enterococcus* sp.; probiotic properties

据报道,病原体对抗生素产生耐药的速率甚至比新抗生素的研发更加迅速^[1]。畜产品中抗生素残留和抗生素滥用是导致耐药菌不断出现和进化的两个主要原因^[2]。因此,研发安全可靠的抗生素替代品已变得至关重要。益生菌以其低毒、无残留、强耐受特性以及促进肠道有益菌生长等诸多优点,成为一种理想的抗生

素替代物而被广泛研究^[3]。

益生菌是由不同途径产生的特定对宿主有益的重要菌群,其中对肠道菌群的调节是最重要的一种调节方式。受病原菌感染的畜禽肠道菌群平衡容易失衡,引起肠道菌群失调,降低畜禽的免疫功能,从而降低生产性能,引起各种疾病和死亡^[4]。益生菌可通过多种机制发

挥益生作用,包括拮抗病原菌、提高机体免疫力、调节肠道菌群平衡、改善肠道屏障以及提高消化吸收率等^[5]。

肠球菌(*Enterococcus* sp.)属于乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)^[6],是革兰氏阳性、兼性厌氧球菌,存在于肠道菌群中。作为肠道共生菌,肠球菌定植于消化系统并参与免疫系统的调节^[7]。本研究从健康绵羊肠道中分离肠道共生菌,通过测定其生长特性、抗菌活性、酸和胆盐耐受性、自聚集能力、抗生素敏感性小鼠体内安全性等试验评价其益生特性,以期筛选出具有优良益生特性的肠道共生菌,为进一步研发益生菌制剂奠定坚实的基础。

1 材料与方 法

1.1 样 品

样品采集于本地健康绵羊肠道内容物及粪便。猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*) C78-2 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) USA 300 由中国农业科学院兰州兽医研究所草食动物细菌病实验室保藏。

BALB/c 小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心,并且已通过中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会审查(LVRIAEC-2023-058)。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

MRS 培养基,海博生物技术有限公司;TSB 培养基,BD 公司。胰蛋白胨、酵母提取物,OXOID 公司;氯化钠,天津市百世化工有限公司;浓盐酸和氢氧化钠,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;琼脂粉和革兰氏染色试剂,北京索莱宝科技有限公司;牛胆盐,上海麦克林生化科技有限公司;药敏片,杭州滨河微生物试剂有限公司。

恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;核酸电

泳成像仪,Bio-Rad 公司;PCR 仪,杭州博日科技公司;紫外分光光度计,Beckman Coulter 公司;离心机,Eppendorf 公司。

1.3 菌株的分离纯化

取 1 g 采集的粪便加入 9 mL PBS,研磨后用 PBS 以 10 倍倍比稀释,吸取 200 μ L 稀释液在 MRS 培养基上均匀涂布,37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h。随后挑取单菌落在 MRS 培养基上反复划线纯化直到得到单菌落,用甘油于-80 $^{\circ}$ C 保存,挑选分离菌株 A12 和 C1 进行后续实验。

1.4 菌株 16S rRNA 基因鉴定

用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTACCTTGT TACGACTT-3')对纯化的分离菌株进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times San Taq PCR Mix 10 μ L, 分离菌液 1 μ L (浓度约为 1×10^9 CFU/mL), 27F (10 μ mol/L) 1 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将序列上传 NCBI 中进行 BLAST 比对分析,选取相似度较高的菌种绘制系统发育树,确定分离菌株的分类地位。

1.5 分离菌株生长曲线的测定

将分离菌株接种至 TSB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 静置过夜。将过夜菌 7 000 r/min 离心 3 min 后,用 PBS 洗 2 遍,调整菌液 OD₆₀₀ 为 1.0,然后按 1%接种量转接种至新的 TSB 培养基中,设 2 个重复,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 10 h,每隔 1 h 取 1 mL 菌液,以空白 TSB 培养基为对照,用紫外分光光度计测 OD₆₀₀ 值。根据所测的数据绘制菌株的生长曲线^[8]。

1.6 分离菌株的革兰氏染色

对纯化后的菌株进行革兰氏染色,将分离

菌株 7 000 r/min 离心 3 min, 用 PBS 洗 2 遍后均匀涂布在载玻片上; 首先滴加结晶紫染色液染色 1 min, 水洗; 再加碘液染色 1 min, 水洗; 然后滴加脱色液脱水 1 min 后水洗; 最后滴加番红染色液染色 1 min, 水洗后空气中晾干置于显微镜下观察。

1.7 抗菌活性测定

1.7.1 牛津杯琼脂扩散法测定抑菌活性

将菌株 USA 300 和 C78-2 分别接种于 TSB 培养基和 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至对数生长期(浓度约为 1×10^9 CFU/mL), 用 PBS 洗涤 2 次, 将菌液浓度调至 1×10^9 CFU/mL, 备用。将分离菌 A12 和 C1 接种于 MRS 液体培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养 36 h, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集上清, 用 0.22 μ m 滤膜过滤。采用牛津杯琼脂扩散法进行抑菌作用的测定, 在涂有 USA 300 和 C78-2 的平板上放置牛津杯, 在杯中分别加入 200 μ L 分离菌 A12 和 C1 的培养上清, 37 °C 静置培养 14 h, 独立重复 3 次实验, 测量抑菌圈直径。

1.7.2 共培养方式测定抑菌活性

根据 Boudjelthia 等^[9]描述的方法略作改动测定抑菌活性, 简述如下: 将分离菌菌液浓度调整 OD_{600} 为 1.0, 然后按 1% 的接种量接种于 MRS 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 36 h, 分别于 3、6、9、12、24、28、32 和 36 h 各取 1 mL, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 用 0.22 μ m 滤膜过滤。以共培养的方式测定各时间点培养上清菌株 C78-2 和 USA 300 的抗菌活性。37 °C 恒温培养箱静置培养 12 h 后用紫外分光光度计测 OD_{600} , 以空白 MRS 培养基为对照, 重复 3 次实验, 根据所测数据评估分离菌株的抗菌活性。

1.8 抗菌物质排酸试验

抗菌物质排酸试验参考王娜等^[10]方法稍作

改动, 简述如下: 将收集的分离菌株 A12 和 C1 的培养上清用盐酸调节 pH 值至 5.74, 以相同 pH 值的 MRS 培养基作为对照, 实验重复 3 次, 分别测定两株分离菌对金黄色葡萄球菌的抗菌活性, 确定酸对抗菌活性的影响。

1.9 抗菌物质耐热试验

将收集的分离菌株 A12 和 C1 的培养上清, 分别在 40、60、80 和 100 °C 条件下处理 1 h, 测定对金黄色葡萄球菌的抗菌活性, 以空白 MRS 培养基为对照, 实验重复 3 次, 确定温度对抗菌活性的影响。

1.10 分离菌株耐酸和耐胆盐能力的测定

1.10.1 耐酸试验

根据陈晓玉等^[11]描述的方法稍作改动进行耐酸试验, 简述如下: 将保存的分离菌株 A12 和 C1 分别接种至 TSB 培养基中, 37 °C 静置过夜。将过夜菌 7 000 r/min 离心 3 min, 用 PBS 洗 2 遍, 调整菌液浓度 OD_{600} 为 1.0, 备用。使用盐酸将 TSB 培养基 pH 值调为 2.0 和 3.0, 备用。然后按 10% 接种量将备用的分离菌株菌液分别接种到 pH 值为 2.0 和 3.0 的 TSB 培养基中, 37 °C 恒温培养箱静置培养 2 h。分别在培养 0 h 和 2 h 各取 50 μ L 菌液, 用 PBS 适当稀释, 取稀释后的菌液 50 μ L 于 TSB 平板涂布, 37 °C 恒温培养箱静置培养过夜, 实验重复 3 次, 计数, 取平均值按公式(1)计算存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_t 为处理 2 h 后的菌落数(CFU/mL); A_0 为处理前的菌落数(CFU/mL)。

1.10.2 耐胆盐试验

在 TSB 培养基中加入牛胆盐, 使其浓度分别为 0%、0.2%、0.4%, 然后按 10% 接种量将备用的分离菌株菌液分别接种到不同胆盐浓度的 TSB 中, 37 °C 恒温培养箱静置培养 2 h。分

别在培养 0 h 和 2 h 各取 50 μ L 菌液, 用 PBS 适当稀释, 取稀释后的菌液 50 μ L 于 TSB 平板涂布, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱静置培养过夜, 实验重复 3 次, 计数, 取平均值按公式(1)计算存活率。

1.11 自聚集能力测定

自聚集能力测定参考 Wang 等^[12]描述的方法, 简述如下: 将保存的分离菌株 A12 和 C1 接种至 TSB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置过夜。将过夜菌用 PBS 洗 2 遍, 调整菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$, 备用。用紫外分光光度计测定 OD_{600} 值, 记做(A_0)。将细菌悬液于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱静置培养, 分别在第 4、16 和 30 h 取上层菌液, 测定 OD_{600} 值, 记做(A_t)。以空白 PBS 为对照, 试验重复 3 次, 按公式(2)计算自聚集能力。

$$\text{自聚集能力(\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

1.12 表面疏水性试验

表面疏水性试验参考张文晓等^[13]描述的方法稍作改动, 简述如下: 将保存的分离菌株 A12 和 C1 接种至 TSB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置过夜后分别转接种至 TSB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至对数生长期(浓度约为 1×10^9 CFU/mL), 用 PBS 洗 2 遍, 调整菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$, 备用。用紫外分光光度计测定 OD_{600} 值, 记做(A_0)。加入等体积的二甲苯涡旋振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱静置培养, 分别在第 1、2 和 3 h 取下层水相, 测定 OD_{600} 值, 记做(A)。以空白 PBS 为对照, 实验重复 3 次, 按公式(3)计算表面疏水性。

$$\text{表面疏水性(\%)} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

1.13 抗生素敏感性试验

用猪霍乱沙门氏菌 C78-2 和金黄色葡萄球菌 USA 300 作为质控菌株, 将保存的分离菌株 A12、C1 和质控菌株分别接种至 TSB 培养基中,

37 $^{\circ}$ C 静置过夜。将过夜菌用 PBS 洗 2 遍, 调整菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$, 备用。将 10^8 CFU 的菌液均匀涂布于 TSB 培养基。用镊子夹取药敏片, 将其贴在培养基表面, 轻压以使纸片与培养基贴合牢固。将平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱静置培养 16 h 后测定抑菌圈直径, 根据药敏片说明书判定标准判定分离菌的抗生素敏感性。

1.14 耐药基因检测

为检测分离菌株 A12 和 C1 的耐药基因, 参考林倩颖等^[14]描述的方法设计氨基糖苷类、四环素类、 β -内酰胺类、大环内酯类和万古霉素类耐药基因引物(表 1)。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times San Taq PCR Mix 10 μ L, 分离菌菌液 1 μ L (浓度约为 1×10^9 CFU/mL), 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s; 50 $^{\circ}$ C 20 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.15 动物安全性试验

将 BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。对照组小鼠不做处理, 正常饲喂; 实验组小鼠按照 1×10^8 CFU/mL 的量分别灌胃分离菌 A12 和 C1 菌液, 分别连续灌胃 7 d 和 14 d, 每天观察小鼠状态, 于第 7、14 天分别安乐死处死 5 只小鼠, 剖检, 观察脏器变化, 以此评价分离菌对小鼠的安全性。

1.16 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析, 统计结果以平均数 \pm 标准差表示。组内数据使用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化结果

对采集的样品进行反复分离纯化, 直至得到单菌落。纯化过程如图 1A 所示, 挑选 16 株不同菌落形态的单菌落培养后进行 PCR 扩增

表 1 分离菌耐药基因引物序列

Table 1 Primer sequence of antibiotic resistance gene of isolated bacteria

Drug classification	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
Aminoglycosides	<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GATGAACAAAGCCCTGAA R: GTCCGTCACATTCCAACCAT	320
	<i>ant(6)-I</i>	F: TAGGATGATGTCGTGGAA R: CTCTGGATAATCAAACCC	229
	<i>aac(6')</i>	F: GTATCACAGGTTGGGAATT R: GGATGGAAGCCACTTTAT	210
	<i>aph(2'')-I</i>	F: AAGACTAAATGCAACAAC R: TTCCAGAATCTCCAAAAT	128
Tetracycline	<i>tetA</i>	F: AGCAGACGCTGACGCAATC R: TATAGGCCCGCATGACCC	495
β-lactams	<i>TEM</i>	F: AGGAAGAGTATGATTCAACA R: CTCGTCGTTTGGTATGGC	535
Macrolide	<i>ermB</i>	F: CACTAGGGTTGCTCTTGC R: ACTTTGGCGTGTTTCATT	241
Vancomycins	<i>vanM</i>	F: CGGCAGATTCGTTTACCT R: TTATCCGTTCTCGCTCCT	339

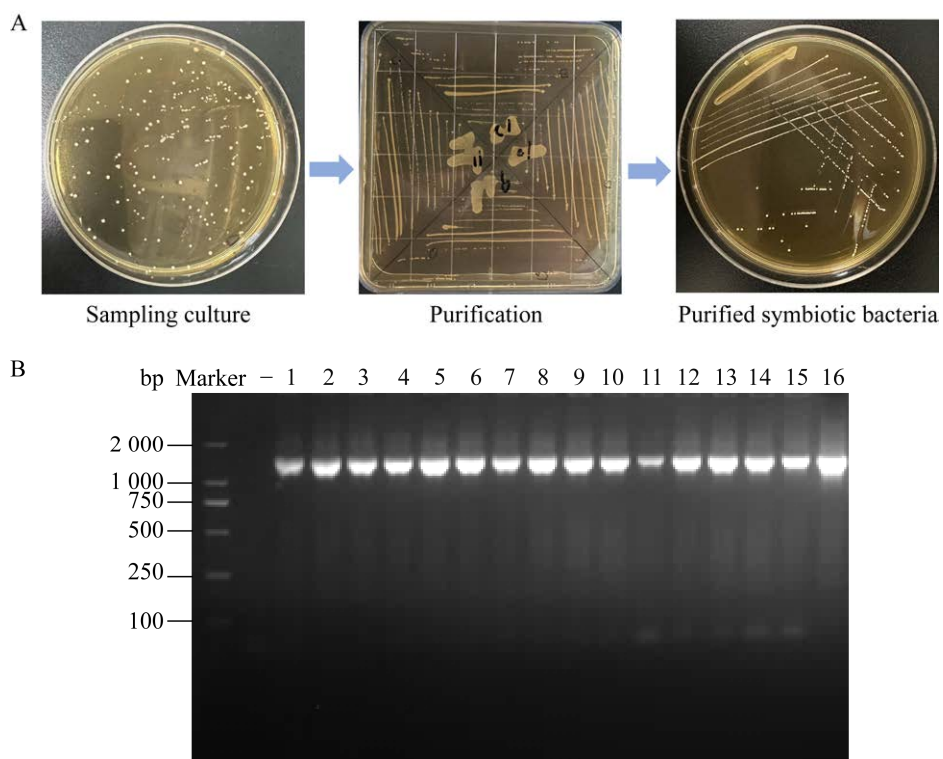


图 1 分离纯化过程(A)与 16S rRNA 基因扩增(B)

Figure 1 Isolation and purification process (A) and 16S rRNA gene amplification (B). Marker: DL2000 DNA Marker.

16S rRNA 基因, 如图 1B 所示, 扩增目的条带清晰可见, 大约为 1 400–1 500 bp。

2.2 16S rRNA 基因序列分析及分离菌 A12 和 C1 形态特征

将扩增的分离菌 16S rRNA 基因序列通过 BLAST 比对, 确定所有分离菌株的种属类别(表 2)。肉眼观察可见分离菌株 A12 (图 2A)菌落呈乳白色, 边缘整齐, 革兰氏染色呈阳性(图 2B), 呈单个、成对或短链状排列。构建分离菌株 A12 系统发育树(图 2C), 结果显示菌株 A12 为蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*)。分离菌株 C1 (图 3A)菌落呈乳白色, 边缘整齐, 革兰氏染色呈阳性(图 3B), 呈单个、成对或短链状排列。系统发育树(图 3C)显示菌株 C1 为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。两株分离菌属于肠球菌属, 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank 数

表 2 羊肠道共生菌分离鉴定统计结果

Table 2 The statistics of isolation and identification results of intestinal bacteria in sheep

Strain code	The most similar strains of the isolates	Similarity (%)
A11	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.86
A12	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.72
A13	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.79
A14	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.86
A15	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.72
B2	<i>Enterococcus hirae</i> strain NBRC 3181	99.79
B3	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	98.04
B4	<i>Enterococcus hirae</i> strain NBRC 3181	99.93
C1	<i>Enterococcus faecium</i> strain NBRC 100486	99.65
C2	<i>Enterococcus faecium</i> strain NBRC 100486	99.59
C3	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.79
C4	<i>Enterococcus mundtii</i> strain NBRC 100490	99.79
D1	<i>Enterococcus faecium</i> strain DSM 20477	99.86
D2	<i>Enterococcus faecium</i> strain DSM 20477	99.72
D3	<i>Enterococcus faecium</i> strain DSM 20477	99.79
D4	<i>Enterococcus faecium</i> strain DSM 20477	99.65

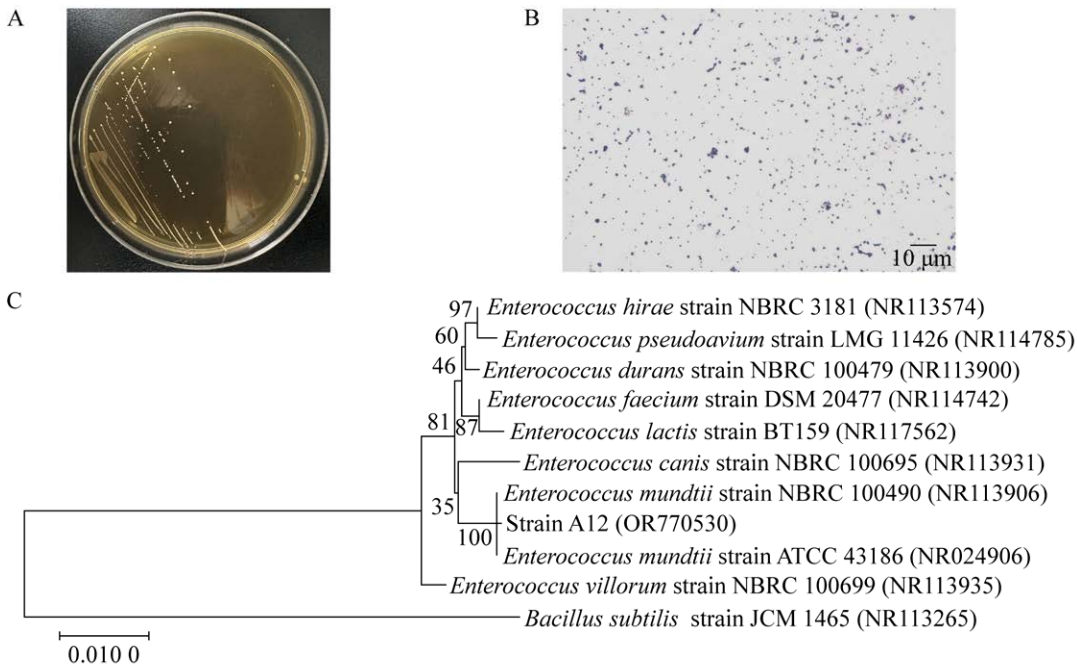


图 2 分离菌株 A12 的菌落形态(A)、革兰氏染色(B)和基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(C) 括号中的序号代表 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表该分支的置信程度; 标尺表示进化距离
Figure 2 The colony morphology (A), Gram staining (B), and the phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (C) of the isolate A12. The serial number in brackets represents the GenBank accession number. The number on the branch point indicates the confidence of the branch. The ruler represents evolutionary distances.

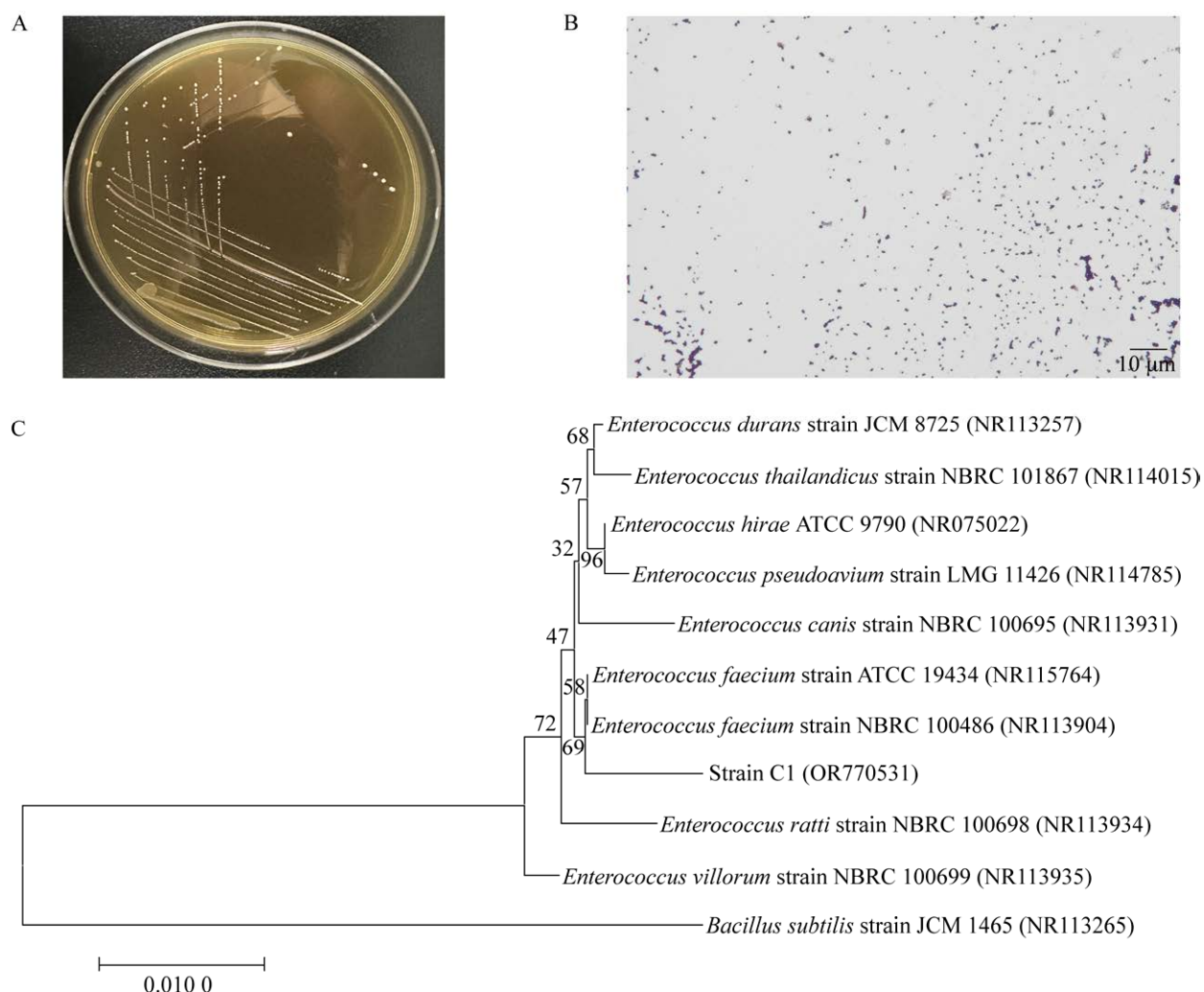


图3 分离菌株 C1 的菌落形态(A)、革兰氏染色(B)和基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(C) 括号中的序号代表 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表该分支的置信程度; 标尺表示进化距离

Figure 3 The colony morphology (A), Gram staining (B), and the phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (C) of the isolate C1. The serial number in brackets represents the GenBank accession number. The number on the branch point indicates the confidence of the branch. The ruler represents evolutionary distances.

数据库, A12 和 C1 的登录号分别为 OR770530 和 OR770531。

2.3 生长曲线测定结果

菌株 A12 与菌株 C1 的生长曲线如图 4 所示, 0–1 h 为迟缓期; 1 h 后生长速度达到最大, 代谢旺盛, 为对数生长期; 5 h 之后增殖速度渐趋下降, 增殖数与死亡数大致平衡, 进入稳定期。

2.4 抗菌活性测定结果

2.4.1 牛津杯琼脂扩散法抗菌活性测定结果

通过牛津杯琼脂扩散法检测抗菌活性, 结果如图 5 所示, 菌株 A12 与菌株 C1 在培养 36 h 时, 培养上清对菌株 USA 300 和 C78-2 抑菌圈直径均大于 11 mm, 对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用, 通过测量抑菌圈直径发现

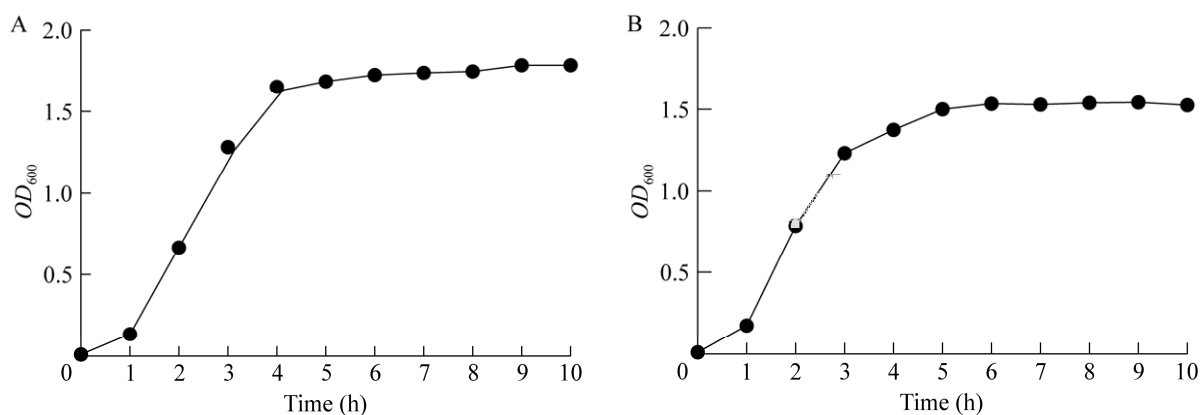


图4 菌株 A12 (A)与 C1 (B)生长曲线

Figure 4 Growth curves of isolates A12 (A) and C1 (B).

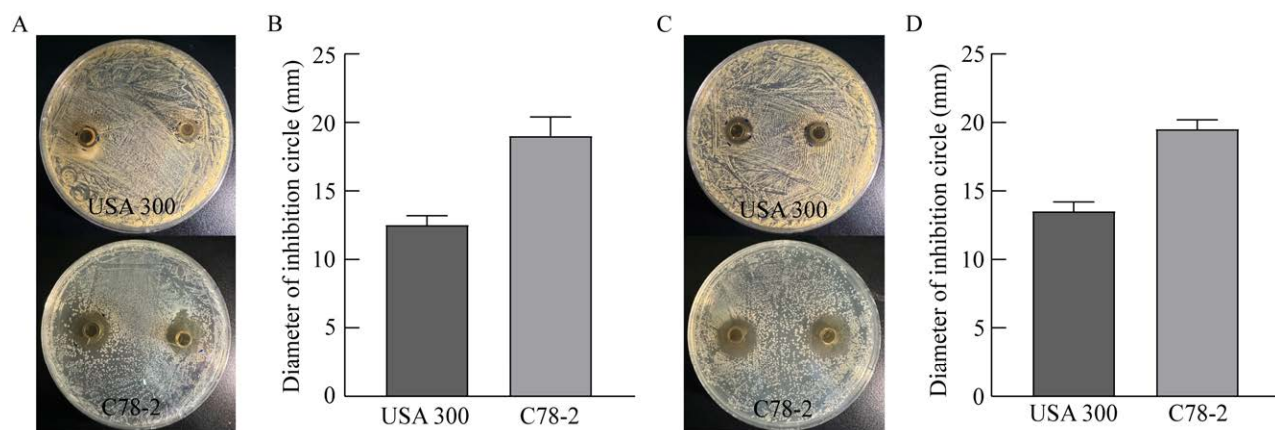


图5 菌株 A12 (A、B)和 C1 (C、D)对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌抗菌活性

Figure 5 The antibacterial activity of isolates A12 (A and B) and C1 (C and D) against *Salmonella choleraesuis* and *Staphylococcus aureus*.

两株分离菌对菌株 C78-2 的抑菌圈直径均大于 17 mm, 对沙门氏菌的抑制作用最强。

2.4.2 共培养方式抗菌活性测定结果

通过共培养的方式检测抗菌活性结果发现, 菌株 A12 在培养 6 h 时, 培养上清对菌株 C78-2 的抑菌能力开始增强(图 6A), 对菌株 USA 300 抑菌能力在 9 h 时显著增强(图 6B), 12 h 抑菌能力更强; 菌株 C1 在培养 3 h 时, 培养上清对菌株 C78-2 的抑菌能力开始增强(图 6C), 对菌株 USA 300 抑菌能力在 6 h 时显著增强(图 6D),

12 h 抑菌能力显著加强, 36 h 抑菌能力更强。表明 2 株菌均可产生广谱抗菌物质, 并且抗菌活性随着培养时间的增加而变强。

2.5 排酸后抗菌活性测定结果

由图 7 可见, 在排除酸干扰后 MRS 培养基的 pH 值为 5.74, 且 MRS 培养基无抗菌活性, 菌株 A12 (图 7A)和菌株 C1 (图 7B)培养上清对菌株 USA 300 的抗菌活性有所降低, 但仍有抗菌活性, 表明菌株 A12 和菌株 C1 除产生有机酸外, 还可产生其他类型的抗菌物质。

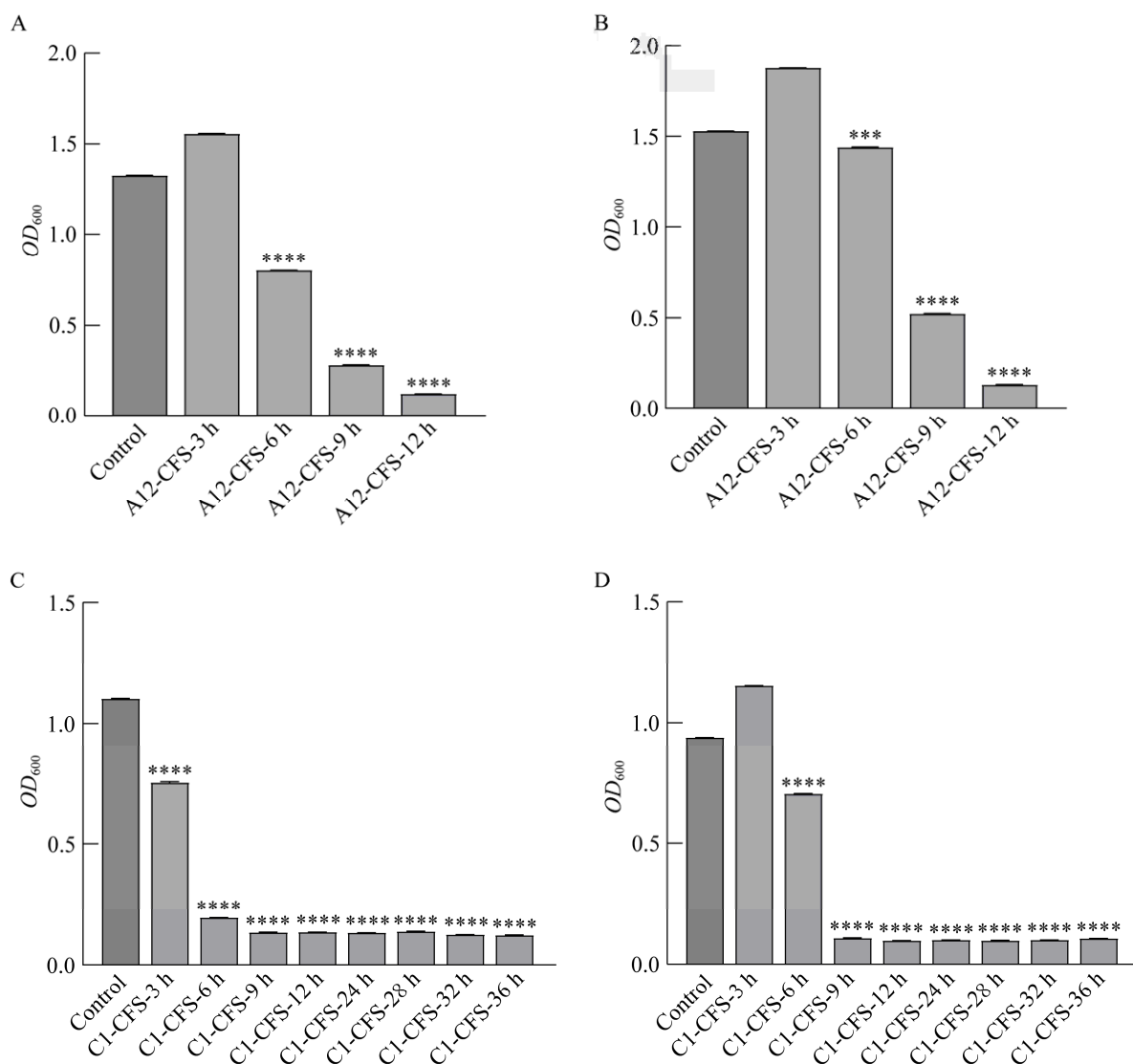


图 6 不同时间点菌株 A12 (A、B)和 C1 (C、D)培养上清对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌抗菌活性

Figure 6 The antibacterial activity of cell-free supernatants isolated from isolates A12 (A and B) and C1 (C and D) against *Salmonella choleraesuis* and *Staphylococcus aureus*. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

2.6 抗菌物质耐热测定结果

在抗菌物质耐热测定中,如图 8 所示,菌株 A12 和菌株 C1 培养上清随温度的升高,抗菌活性有所下降,在 80 °C 时抗菌活性仍保留 90% 以上。但对金黄色葡萄球菌(USA 300)仍具有很强的抗菌效果,说明这 2 株菌抗菌物质具有较强的热稳定性。

2.7 分离菌 A12 和 C1 耐酸耐胆盐特性测定结果

2.7.1 耐酸结果

菌株 A12 在 pH 2.0 的条件下仍有活菌存在,在 pH 3.0 的条件下大部分可以存活,存活率分别为 0.325% 和 65.774%;菌株 C1 在 pH 2.0 的条件下的也有活菌存在,在 pH 3.0 的条件下

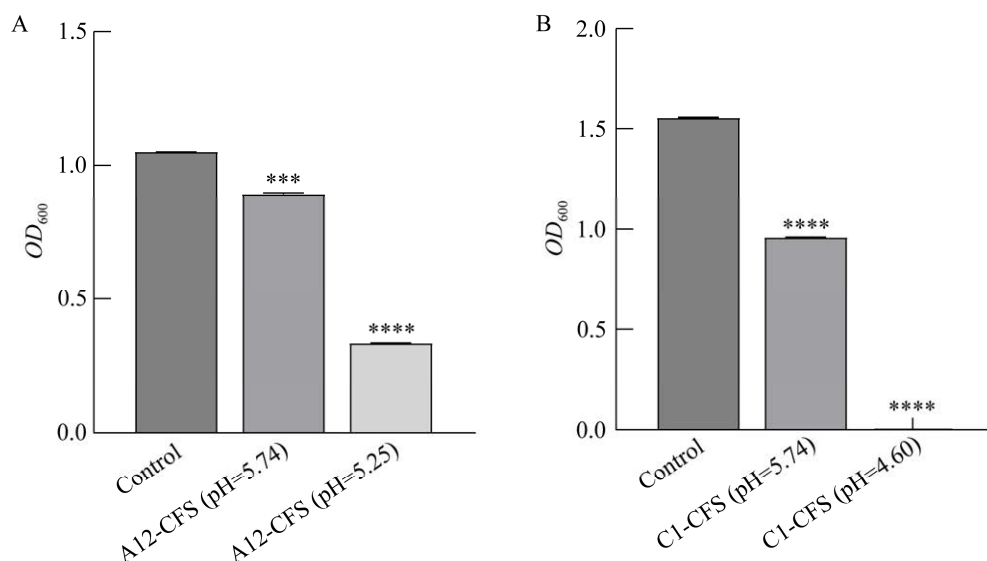


图 7 菌株 A12 (A)与 C1 (B)培养上清排酸后对金黄色葡萄球菌的抗菌活性测定

Figure 7 Determination of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* in strain A12 (A) and C1 (B) cell-free supernatants after acid discharge. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

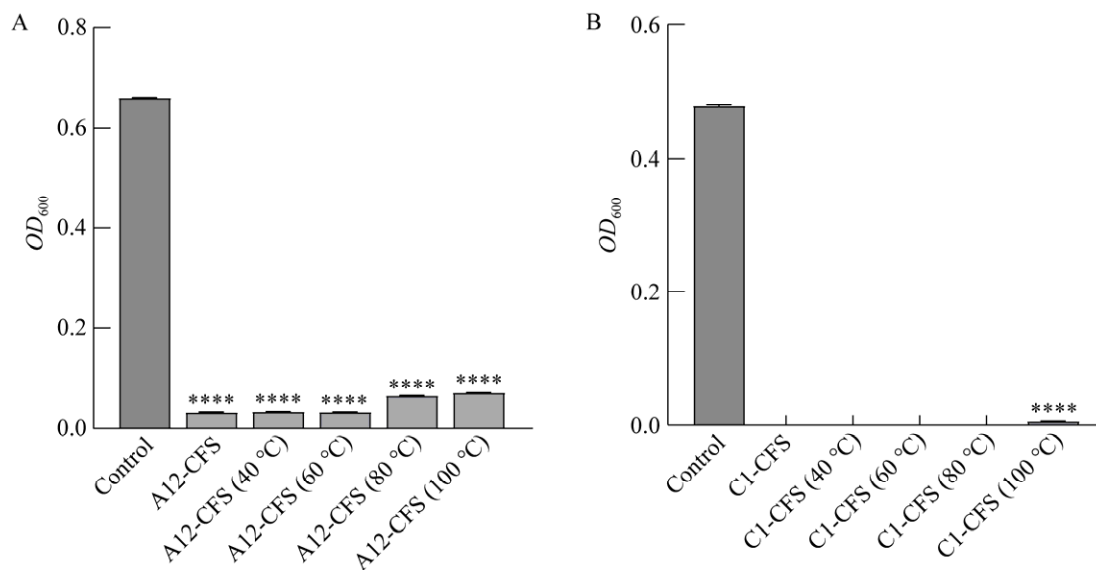


图 8 菌株 A12 (A)与 C1 (B)抗菌物质耐热结果

Figure 8 Heat resistance results of strain A12 (A) and C1 (B) antibacterial substances. ****: $P < 0.0001$.

存活率提高, 分别为 0.584%和 8.918%(表 3)。结果表明, 2 株肠球菌对酸都具有良好的耐受能力。

2.7.2 耐胆盐结果

应用 2 种不同浓度胆盐处理, 结果表明: 菌株 A12 在胆盐浓度为 0.2%和 0.4%时生长状

态良好, 存活率达到 100%以上; 菌株 C1 在胆盐浓度为 0.2%时存活率达到 67.152%, 在胆盐浓度为 0.4%时存活率有所下降, 但仍有 30.331%的存活率(表 4)。以上结果表明, 菌株 A12 和菌株 C1 有很强的胆盐耐受能力。

表 3 菌株 A12 和 C1 耐酸试验结果

Table 3 Acid resistance test of the isolates strain A12 and C1

Item	Strain A12	Strain C1
A_0 (CFU/mL)	5.230×10^7	4.620×10^7
A_t pH 2.0 (CFU/mL)	0.017×10^7	0.027×10^7
A_t pH 3.0 (CFU/mL)	3.440×10^7	0.412×10^7
Survival rate at pH 2.0 (%)	0.325	0.584
Survival rate at pH 3.0 (%)	65.774	8.918

表 4 菌株 A12 和 C1 耐胆盐试验结果

Table 4 Bile salt tolerance test of the isolates A12 and C1

Item	Strain A12	Strain C1
A_0 (CFU/mL)	6.91×10^7	7.55×10^7
A_t 0.2% bile salt (CFU/mL)	7.48×10^7	5.07×10^7
A_t 0.4% bile salt (CFU/mL)	7.00×10^7	2.29×10^7
Survival rate at 0.2% bile salt (%)	108.249	67.152
Survival rate at 0.4% bile salt (%)	101.302	30.331

2.8 自聚集能力测定结果

自聚集能力是细菌黏附能力的一个关键因素。如表 5 所示, 菌株 A12 和 C1 的自聚集能力随着时间的增加而增加, 在 30 h 时, 菌株 A12 自聚集能力为 87.799%, 菌株 C1 自聚集能力为 96.870%。结果表明这 2 株肠球菌均具有很强的自聚集能力。

2.9 表面疏水性试验结果

如表 6 所示, 菌株 A12 和 C1 的表面疏水性随着时间的增加而增加, 在 3 h 时, A12 表面疏水性为 11.69%, 菌株 C1 表面疏水性为 10.287%。结果表明这 2 株肠球菌均具有一定的表面疏水性能力。

2.10 抗生素敏感性结果

抗生素敏感性试验结果见表 7, 分离菌株 A12 和 C1 均对氨苄西林、青霉素 G、氯霉素、米诺环素、左氟沙星、复方新诺明敏感, 对头孢哌酮和红霉素中等耐药, 而对头孢曲松、链霉

表 5 菌株 A12 和 C1 自聚集能力测定结果

Table 5 The self-aggregation rate of the isolates A12 and C1

Item	Strain A12	Strain C1
OD_{600}		
A_0	1.152	1.199
A_t 4 h	0.809	0.720
A_t 6 h	0.234	0.042
A_t 30 h	0.141	0.036
Self-aggregating rate (%)		
4 h	29.744	39.967
6 h	80.476	96.490
30 h	87.799	96.870

表 6 菌株 A12 和 C1 疏水性测定结果

Table 6 The hydrophobicity determination of the isolates A12 and C1

Item	Strain A12	Strain C1
OD_{600}		
A_0	1.055	1.010
A_t 1 h	1.018	0.951
A_t 2 h	0.993	0.934
A_t 3 h	0.932	0.907
Hydrophobicity (%)		
1 h	3.507	5.935
2 h	5.877	7.616
3 h	11.690	10.287

素、卡那霉素、庆大霉素、苯唑西林、克林霉素均耐药。分离菌 A12 对氧氟沙星、麦迪霉素、克拉霉素、万古霉素敏感; 而对四环素、诺氟沙星、环丙沙星、头孢哌酮、红霉素、头孢西丁中等耐药; 对大观霉素、阿米卡星、多黏菌素 B 耐药。分离菌 C1 对大观霉素、阿米卡星、多黏菌素 B、四环素、诺氟沙星、环丙沙星敏感, 而对氧氟沙星、克拉霉素中等耐药, 对麦迪霉素、万古霉素、头孢西丁耐药。结果表明, 菌株 A12 与 C1 对部分抗生素表现出耐药性, 但对大多数抗生素敏感。

表 7 抗生素敏感性结果

Table 7 Determination of antibiotic sensitivity

Antibiotics	Specifications ($\mu\text{g}/\text{tablet}$)	Diameter of inhibition zone (mm)			Strain			
		S (sensitive)	I (intermediary)	R (resistant)	C78-2	USA300	A12	C1
Ampicillin	10	≤ 13	14–16	≥ 16	S	R	S	S
Penicillin G	10	≤ 14		≥ 15	S	R	S	S
Chloramphenicol	30	≤ 12	13–17	≥ 18	S	S	S	S
Minocycline	30	≤ 14	15–18	≥ 19	I	S	S	S
Levofloxacin	5	≤ 13	14–16	≥ 17	S	S	S	S
Cotrimoxazole	23.75 SMZ/1.25 TMP	≤ 10	11–15	≥ 12	S	S	S	S
Nitrofurantoin	300	≤ 14	15–16	≥ 16	S	S	S	S
Ofloxacin	5	≤ 12	13–15	≥ 16	S	S	S	I
Medemycin	30	≤ 13	14–17	≥ 18	R	S	S	R
Clarithromycin	15	≤ 16	17–20	≥ 21	R	I	S	I
Vancomycin	30	≤ 14	15–16	≥ 17	R	I	S	R
Spectinomycin	100	≤ 14	15–17	≥ 18	S	I	R	S
Amikacin	30	≤ 14	15–16	≥ 17	S	I	R	S
Polymyxin b	30	≤ 8	9–11	≥ 12	S	I	R	S
Tetracycline	30	≤ 14	15–18	≥ 19	I	S	I	S
Norfloxacin	10	≤ 12	13–16	≥ 17	S	S	I	S
Ciprofloxacin	5	≤ 15	16–20	≥ 21	S	S	I	S
Cefoperazone	75	≤ 15	16–20	≥ 21	S	R	I	I
Illotycin	15	≤ 13	14–22	≥ 23	I	I	I	I
Cefoxitin	30	≤ 14	15–17	≥ 18	S	R	I	R
Ceftriaxone	30	≤ 13	14–20	≥ 21	S	R	R	R
Streptomycin	10	≤ 11	12–14	≥ 15	S	I	R	R
Kanamycin	30	≤ 13	14–17	≥ 18	S	R	R	R
Gentamycin	10	≤ 12	13–14	≥ 15	S	R	R	R
Oxacillin	1	≤ 10	11–12	≥ 13	R	R	R	R
Clindamycin	2	≤ 14	15–20	≥ 21	R	S	R	R

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感

R: Resistant; I: Intermediary; S: Sensitive.

2.11 耐药基因检测结果

如图 9A 所示, 分离菌 A12 含有 *aph(2'')-I* 和 *TEM* 耐药基因, 而 *tetA*、*vanM*、*aac(6')*、*tetM*、*aph(3')-IIIa*、*erm*、*ant(6)-I* 耐药基因均未检出。如图 9B 所示, 分离菌 C1 含有 *aac(6')* 耐药基因, 而 *aph(2'')-I*、*TEM*、*tetA*、*vanM*、*tetM*、*aph(3')-IIIa*、*erm*、*ant(6)-I* 均未检出。以上结果表明分离菌 A12 与 C1 未携带多种耐药基因。

2.12 动物安全性试验结果

经过 7 d (图 10A) 和 14 d (图 10B) 连续灌胃, 观察结果显示, 实验过程中实验组与对照组小鼠精神状态均良好, 体重正常, 未表现出明显的临床症状和死亡等情况。对所有组别小鼠进行解剖, 实验组小鼠与对照组小鼠相比均未出现病变; 随后观察其脾脏、肾脏、肝脏等器官, 未出现病理变化。表明菌株 A12 与菌株 C1 对小鼠安全性良好。

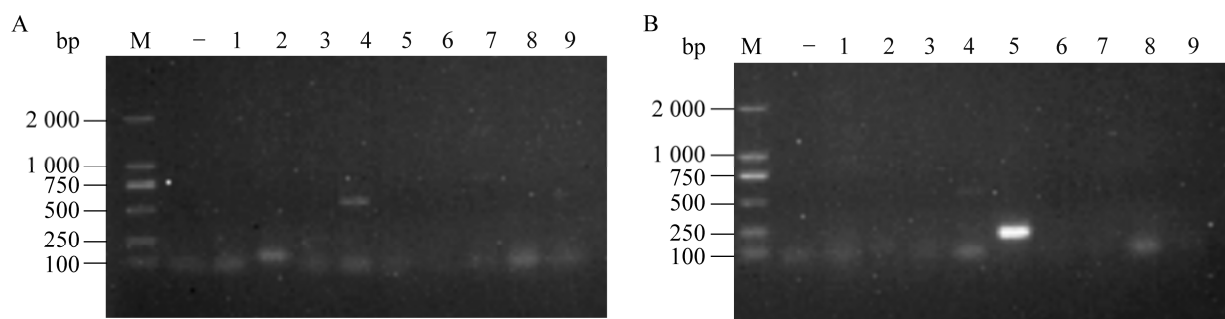


图9 耐药基因检测 A12 (A)和 C1 (B)

Figure 9 Antibiotic gene detection A12 (A) and C1 (B). M: DL2000 DNA Marker; -: Control; 1: *tetA*; 2: *aph(2'')-I*; 3: *vanM*; 4: *TEM*; 5: *aac(6')*; 6: *tetM*; 7: *aph(3')-IIIa*; 8: *ermB*; 9: *ant(6)-I*.

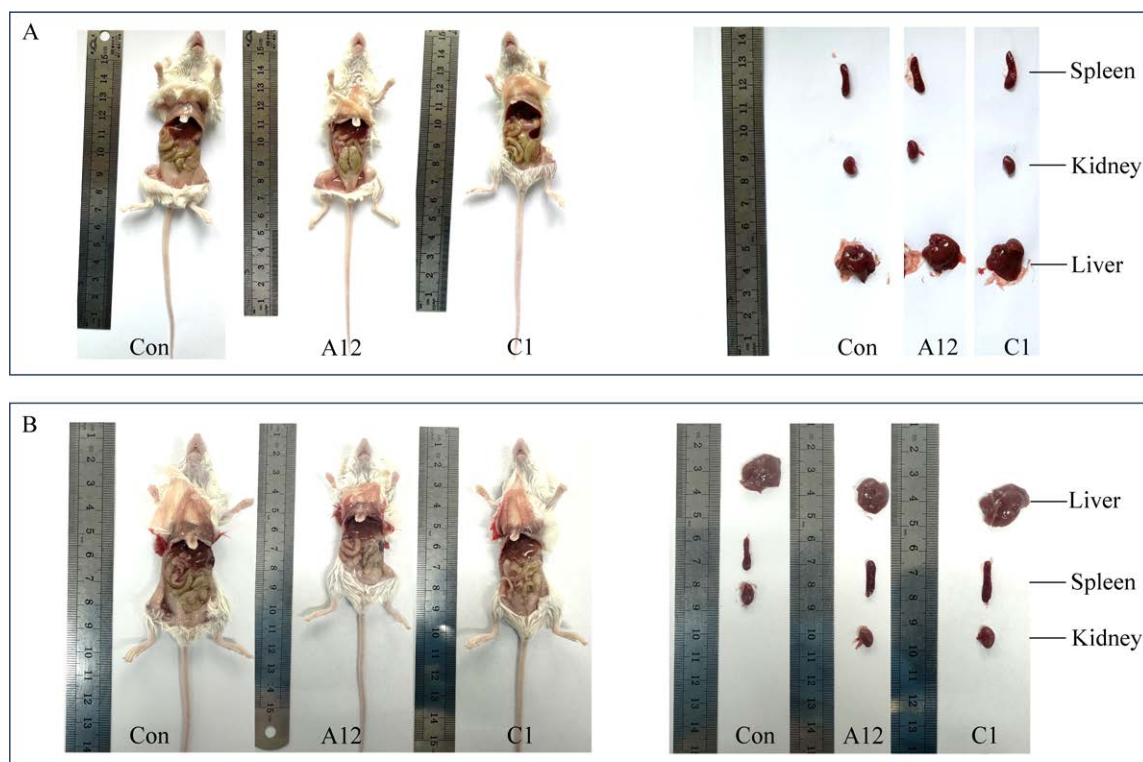


图10 灌胃 7 d 后(A)与 14 d 后(B)小鼠组织器官观察结果

Figure 10 Observation results of tissues and organs in mice after 7 days (A) and 14 days (B) of gavage.

3 讨论与结论

肠球菌属是革兰氏阳性菌，多以短链、成对或单个球菌的形态存在^[15]。肠球菌作为肠道共生菌，可产生有机酸及细菌素等抗菌物质，抑制病原菌的繁殖，从而形成优势菌群，促进

肠道健康，进而调节肠道微生态平衡^[16]。因此具有益生特性的肠球菌被认为是具有很大潜力被开发为畜禽微生态制剂的候选菌种。

筛选具有益生特性的肠道共生菌时，抗菌活性是筛选条件中的一项重要指标。王朝等^[17]发现从牦牛粪便中分离获得的屎肠球菌对沙门

氏菌和金黄色葡萄球菌都有很强的抗菌作用。Lauková 等^[18]发现蒙氏肠球菌可产生对部分革兰氏阳性菌具有抑菌活性的细菌素类抗菌物质。本研究从健康羊肠道中分离出 2 株肠球菌(菌株 A12 和 C1),通过抗菌试验发现,2 株菌对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌均具有很强的抗菌活性,表明分离获得的这 2 株肠球菌满足作为益生菌的首要指标,可作为潜在的益生菌菌株。未来对分离菌 A12 和 C1 培养上清中抗菌活性物质具体成分鉴定和对其抗菌机制的充分探究是非常必要的。

益生菌具有稳定快速的增殖能力,对于其定植于宿主胃肠道黏膜表面以及对宿主产生有益影响,是益生菌发挥功能的重要前提^[19]。本实验中,菌株 A12 和 C1 在 1 h 时进入对数生长期,5 h 时进入稳定期,具备快速生长的能力。

宿主的胃肠道是益生菌能够发挥促进健康功能的主要部位^[20]。因此,益生菌具有耐受宿主胃肠道中特殊环境的能力,对于其发挥促进宿主健康至关重要。在本研究中,菌株 A12 在 pH 3.0 的环境下存活率超过 60%,在 pH 2.0 的环境下仍有活菌存在,且在 0.2%和 0.4%胆盐浓度下几乎不死亡,具有很强的耐受酸和胆盐的能力。菌株 C1 在 pH 2.0 和 3.0 的环境下均有菌存活,且在 0.2%和 0.4%胆盐浓度下,存活率能分别达到 67.152%和 30.331%,同样表现出对胆盐有较强的耐受能力。上述结果充分表明 2 株菌具有很强的耐酸耐胆盐特性,具备在胃肠道定植的能力。

益生菌对宿主黏膜表面的黏附对益生菌在宿主肠道定植至关重要^[21]。自聚集能力通常反映细菌的黏附能力,自聚集能力强则有助于菌株对肠上皮细胞显著黏附,并且促进其在肠道中定植^[22],因此,自聚集能力常用于评价益生菌的黏附特性。本研究发现,分离菌株 A12 和

C1 有较强的自聚集能力,在培养超过 16 h 时,A12 自聚集能力 80%以上,而 C1 更是超过 90%,表明 2 株菌具有很强的自聚集能力。表面疏水性试验发现分离菌株 A12 和 C1 的表面疏水性随着时间的增加而增加,说明这 2 株肠球菌均具有一定的表面疏水性能力。以上结果表明分离菌株 A12 和 C1 对肠道具有强黏附的潜力,可促进形成胃肠道防御屏障,从而具有抵抗病原菌的潜能。

益生菌通常含有一些抗性基因,但一般被认为是无害的。例如,对四环素表现耐药几乎是所有乳酸菌都有的特性。本研究分离得到的 2 株肠球菌对氨苄西林、青霉素 G、氯霉素、米诺环素、左氟沙星、复方新诺明敏感,对头孢曲松、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、苯唑西林、克林霉素耐药。徐淑琴等^[23]报道的藏羊源肠球菌 EF1-mh 对米诺环素也较为敏感,对苯唑西林耐药,这与本研究结果一致。本研究通过多种药物耐药基因的检测发现,分离菌 A12 含有 *aph(2'')-I* 和 *TEM* 耐药基因,分离菌 C1 含有 *aac(6')* 耐药基因,而 *aph(2'')-I*、*tetA*、*vanM*、*tetM*、*aph(3')-IIIa*、*erm*、*ant(6)-I* 均未检出。综合抗生素敏感性测定及耐药基因检测结果可见,菌株 A12 和 C1 对部分抗生素耐药,但仍然对多数的抗生素敏感,但具体的耐药特性还需测试更多抗生素以及从基因组水平进一步分析,从而为临床应用提供更加有效的支撑。

益生菌的安全性与其预期用途有关,因为它们在给药时是活的微生物,并且与其他食品或药物成分不同,具有传染性或原位毒素产生的潜力^[24],所以安全性评估是筛选潜在益生菌的重要标准之一。王晓禹等^[25]研究发现分离的两株肠球菌 EF1 和 EF2 均会引起小鼠出现精神沉郁、被毛不顺等临床症状,组织病变以肾、肝、脾最为明显,其中脾脏病变最为严重。为

了进一步验证分离菌株 A12 和 C1 的安全性,采取灌胃的方式对小鼠饲喂分离菌,经临床观察和病理解剖,结果发现 2 株分离菌分别经过 7 d 和 14 d 饲喂后,与对照组小鼠相比未表现出明显的临床症状和病理变化,通过临床观察和病理解剖初步表明这 2 株分离菌对小鼠安全性良好。我们后期的实验将进一步探究菌株 A12 和 C1 的回补,或可易位至组织器官,并从分子层面评价分离菌对小鼠生理、营养、肠道稳态和免疫等的影响,从而进一步验证分离菌株的安全性,为益生菌开发提供有效的实验证明。

总之,本研究从健康绵羊肠道中分离得到 2 株肠球菌 A12 和 C1,它们可产生抗菌物质,具有较强的耐酸和耐胆盐能力,以及很强的自聚集能力,对一些抗生素敏感,且对小鼠安全性良好。因此,分离菌株 A12 和 C1 可以适应胃肠道生存环境,并在肠道中定殖和抵抗病原菌入侵,具备作为益生菌的潜力。

REFERENCES

- [1] GUO MJ, LI MT, ZHANG CC, ZHANG XR, WU YT. Dietary administration of the *Bacillus subtilis* enhances immune responses and disease resistance in chickens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1768.
- [2] KHALIQUE A, ZENG D, SHOAIB M, WANG HS, QING XD, RAJPUT DS, PAN KC, NI XQ. Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 50.
- [3] YIN YY, LIAO YY, LI J, PEI Z, WANG LP, SHI Y, PENG HY, TAN YZ, LI CT, BAI HL, MA CX, GONG Y, WEI TC, PENG H. *Lactobacillus plantarum* GX17 benefits growth performance and improves functions of intestinal barrier/intestinal flora among yellow-feathered broilers[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1195382.
- [4] SHI S, LIU J, DONG J, HU J, LIU Y, FENG J, ZHOU D. Research progress on the regulation mechanism of probiotics on the microecological flora of infected intestines in livestock and poultry[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 74(5): 647-655.
- [5] REDWEIK GAJ, DANIELS K, SEVERIN AJ, LYTE M, MELLATA M. Oral treatments with probiotics and live *Salmonella* vaccine induce unique changes in gut neurochemicals and microbiome in chickens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3064.
- [6] NAMI Y, BAKHSHAYESH RV, JALALY HM, LOTFI H, ESLAMI S, HEJAZI MA. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 300.
- [7] KRAWCZYK B, WITYK P, GAŁĘCKA M, MICHALIK M. The many faces of *Enterococcus* spp.-commensal, probiotic and opportunistic pathogen[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1900.
- [8] 瞿静, 王琰, 李亮亮, 张琨, 万一. 林麝肠道中乳酸菌的分离筛选及益生特性[J]. *食品科学*, 2024, 45(8): 79-86.
ZI J, WANG Y, LI LL, ZHANG K, WAN Y. Isolation, screening and characterization of lactic acid bacteria from forest musk deer[J]. *Food Science*, 2024, 45(8): 79-86 (in Chinese).
- [9] BOUDJELTHIA NK, BELABBAS M, BEKENNICHE N, MONNOYE M, GÉRARD P, RIAZI A. Probiotic properties of lactic acid bacteria newly isolated from Algerian raw cow's milk[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2091.
- [10] 王娜, 李慧, 戴伶俐, 孙学颖, 靳烨, 赵丽华. 产细菌素乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(12): 248-255.
WANG N, LI H, DAI LL, SUN XY, JIN Y, ZHAO LH. Screening and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(12): 248-255 (in Chinese).
- [11] 陈晓玉, 温敏, 张宇, 丁壮, 田维鹏, 王正平. 犬源益生菌的筛选及特性研究[J]. *中国饲料*, 2024(9): 72-76.
CHEN XY, WEN M, ZHANG Y, DING Z, TIAN WP, WANG ZP. Screening and characterization of lactic acid bacteria from canine[J]. *China Feed*, 2024(9): 72-76 (in Chinese).
- [12] WANG J, PU Y, ZENG Y, CHEN YY, ZHAO W, NIU LL, CHEN BH, YANG ZH, WU LQ, PAN KC, JING B, ZENG D, NI XQ. Multi-functional potential of five lactic acid bacteria strains derived from giant *Panda* (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023, 15(3): 668-681.
- [13] 张文晓, 白筱翠, 王楠, 田晗, 金慧, 王娟, 张家鑫, 肖纯凌. 呼吸道潜在益生菌 D-19 表面疏水性及自动聚集能力的研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2022, 34(3):

- 278-283, 288.
- ZHANG WX, BAI XC, WANG N, TIAN H, JIN H, WANG J, ZHANG JX, XIAO CL. Surface hydrophobicity and automatic aggregation of potential respiratory probiotics D-19[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(3): 278-283, 288 (in Chinese).
- [14] 林倩颖, 侯铭源, 贾丽, 杨明, 武英豪, 李连敏, 袁丽宁, 马玉忠, 杨威. 保定地区羊源致病性粪肠球菌的分离鉴定及其毒力性与耐药性分析[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(4): 733-740.
- LIN QY, HOU MY, JIA L, YANG M, WU YH, LI LM, YUAN LN, MA YZ, YANG W. Isolation, identification, resistance and virulence of pathogenic *Enterococcus faecalis* from sheep in Baoding area[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2023, 43(4): 733-740 (in Chinese).
- [15] MISHRA AK, GHOSH AR. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* AG5 isolated from wistar rat, demonstrating adherence to HCT 116 cells and gastrointestinal survivability[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(3): 435-445.
- [16] 白天天, 郭雪峰. 屎肠球菌的特性及其在畜牧生产中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(2): 16-20.
- BAI TT, GUO XF. Characteristics of *Enterococcus faecium* and its application in livestock production[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(2): 16-20 (in Chinese).
- [17] 王朝, 冉旋, 雷江英, 陈德纯. 牦牛源产细菌素屎肠球菌的分离鉴定和益生特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3454-3466.
- WANG Z, RAN X, LEI JY, CHEN DC. Isolation, identification, and probiotic properties of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* from yak[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3454-3466 (in Chinese).
- [18] LAUKOVÁ A, FOČKOVÁ V, POGÁNY SIMONOVÁ M. *Enterococcus mundtii* isolated from Slovak raw goat milk and its bacteriocinogenic potential[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(24): 9504.
- [19] SUEZ J, ZMORA N, SEGAL E, ELINAV E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics[J]. Nature Medicine, 2019, 25: 716-729.
- [20] ZHANG JC, SUN ZH, JIANG SM, BAI XY, MA CC, PENG QN, CHEN KN, CHANG HB, FANG TY, ZHANG HP. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 regulates the secretion of sex hormones in polycystic ovary syndrome patients through the gut-brain axis[J]. mSystems, 2019, 4(2): e00017-19.
- [21] QIN WF, XIA YJ, XIONG ZQ, SONG X, AI LZ, WANG GQ. The intestinal colonization of *Lactiplantibacillus plantarum* AR113 is influenced by its mucins and intestinal environment[J]. Food Research International, 2022, 157: 111382.
- [22] SHIVANGI S, DEVI PB, RAGUL K, SHETTY PH. Probiotic potential of *Bacillus* strains isolated from an acidic fermented food idli[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(4): 1502-1513.
- [23] 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).
- [24] SAMTIYA M, BHAT MI, GUPTA T, KAPILA S, KAPILA R. Safety assessment of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC-5898 in murine model after repetitive dose for 28 days (sub-acute exposure)[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(1): 259-270.
- [25] 王晓禹, 马维武, 周学章. 两株牛源致病性肠球菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(8): 809-813.
- WANG XY, MA WW, ZHOU XZ. Isolation, identification, and analysis of the biological characteristics of 2 strains of *Enterococcus* from cattle[J]. Journal of Pathogen Biology, 2018, 13(8): 809-813 (in Chinese).