高粘附性戊糖片球菌的筛选、标记及其表面疏水与自凝聚性特征

杨振泉[1,2]，靳彩娟[1]，张 咪[1]，王晓霖[1]，高 璐[1]，顾瑞霞[1,2]
（1. 扬州大学 食品科学与工程学院，江苏 扬州 225127；2. 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室，江苏 扬州 225127）

摘要：通过常规乳酸菌分离技术结合形态观察、生理生化试验，以及16S rDNA同源性分析等方法，从臭豆腐发酵卤水中分离获得7株戊糖片球菌分离株，并通过随机扩增多态性DNA技术构建了不同菌株的特征指纹图谱；以Caco-2细胞和固定化肠黏液蛋白质作为体外模型，研究了菌株的粘附能力，并探讨了菌株粘附能力与基因型以及表面疏水性、自凝聚能力等表型特征的相关性。结果显示，发酵卤水中的戊糖片球菌存在高度分子多样性，7个分离株中存在6种不同的指纹图谱模式，其中A5型菌株（F28-8和Y27-4）对Caco-2细胞和肠黏液蛋白质的粘附性最强，并显示了高度的疏水性（>90%）和较强的自凝聚能力（>25%）。相关性分析表明，戊糖片球菌表面疏水率和自凝聚率与Caco-2细胞粘附率测定结果呈显著正相关（r=0.900和0.792，P<0.05），但是与肠黏液蛋白质粘附率测定结果相关性不显著（r=0.426和0.700，P>0.05）。研究成果为建立高粘附性戊糖片球菌快速筛选方法及其体内定植和分布研究提供了依据。

关键词：戊糖片球菌，粘附性，表面疏水性，自凝聚能力，DNA指纹图谱
中图分类号：TS 254　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)09—0926—09

Screening and Molecular Marking of Highly Adhesive *Pediococcus pentosaceus* and the Characteristics of Their Surface Hydrophobicities and Autoaggregation Abilities

YANG Zhenquan[1,2]，*JIN Caijuan*[1]，*ZHANG Mi*[1]，*WANG Xiaolin*[1]，*GAO Lu*[1]，*GU Ruixia*[1,2]
（1. College of Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou 225127, China）

Abstract: Seven strains of *Pediococcus pentosaceus* were isolated and identified from the fermented stinky tofu brine using methods of conventional bacteria isolation combined with physiological and biochemical test and 16S rDNA sequencing identification. The specific fingerprint for each strain was developed by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. The adhesive ability of the strain and the correlation of phenotypic characteristics of strain adhesion and genotype, surface hydrophobicity, and aggregation ability were studied using Caco-2 cell and intestinal mucus protein

收稿日期：2014-09-30
基金项目：国家自然科学基金项目（31371806）；江苏省重点实验室开放课题；江苏省青蓝工程资助项目。
作者简介：杨振泉（1975—），男，江苏南通人，农学博士，副教授，主要从事食品微生物资源开发与利用研究。E-mail：yangzq@ yzu.edu.cn

as in vitro model. Results showed that six different fingerprint patterns were found in the seven *Pediococcus pentosaceus* strains, among them, the A5 subtype of strains (F28-8 and Y27-4) showed the strongest adhesion to the Caco-2 cells and intestinal mucus. Furthermore, these two strains also exhibited highly hydrophobic (the hydrophobicity rate > 90%) and higher aggregation ability (the aggregation rate at 2 h > 5%). Correlation analysis results showed that the surface hydrophobicity and aggregation ability of *Pediococcus pentosaceus* were positively related to the adhesive ability to the Caco-2 cell significantly (r=0.900 and 0.792, P<0.05), but they were not significantly correlated to the adhesive ability to the intestinal mucus (r = 0.426 and 0.700, P>0.05). The results of this study provide the basis for establishing techniques of rapid screening highly adhesive *Pediococcus pentosaceus* strains and their colonization and distribution *in vivo*.

Keyword: *Pediococcus pentosaceus*, adhesion, surface hydrophobicity, autoaggregation ability, DNA fingerprint

戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)广泛分布于腌制和泡制蔬菜、干酪、香肠等传统发酵食品中,对提高发酵食品的营养、风味及安全性具有重要作用[1-2]。该菌代谢糖类产生乳酸,并产生 IIa 类片球菌素,对病原菌及腐败微生物产生强烈的抑制效应[3]。已有的研究表明,戊糖片球菌的一些菌株具有提高机体的天然免疫能力、促进健康以及抵抗病原菌的侵袭等益生特性[4-5],具有用于人类或动物的微生态制剂的开发潜力。菌株粘附能力是微生态制剂在肠道发挥生态效应和生理作用的重要基础,筛选高粘附性菌株对微生态制剂开发具有重要意义,但目前国内外对戊糖片球菌粘附特性及其机制的研究尚不多见。利用人结肠癌细胞系 Caco-2 评价乳酸菌的粘附能力是目前广泛使用的体外模型和方法[6],但是没有考虑到肠道内覆盖在肠上皮细胞外层的肠黏液的作用[7],固定化小肠黏液蛋白质模型能够反映乳酸菌在体内与肠黏液的作用[8],结合这两种模型可以较好地评价乳酸菌的粘附特性,但是这两种模型需要复杂的细胞培养和实验动物操作,价格昂贵,不利于大规模的菌株筛选。

细菌表面疏水性和自凝聚性与粘附特性密切相关。表面疏水性是决定细菌非特异性粘附到生物表面的重要动力,在乳酸菌向肠壁粘附和定植的过程中发挥重要的作用[9]。自凝聚特性有助于细菌形成生物膜并在宿主肠道定植,阻止病原菌的粘附和侵袭,并且与致病菌的清除存在一定关联[10]。目前已有研究表明,在部分双歧杆菌和乳酸杆菌菌种中,基于菌株的表面疏水性和自凝聚能力与其对肠上皮细胞粘附能力的相关性,可以应用简单廉价的凝聚性和疏水性测定方法替代昂贵的细胞和动物评价模型对菌株的粘附能力进行预测和初步筛选[11],对从大量菌株中筛选高粘附性菌株,缩小试验范围和降低成本具有重要意义。但是,目前对于戊糖片球菌的粘附能力和表面疏水性以及自凝聚能力之间的相关性还需要进一步数据证实。本研究中从臭豆腐发酵卤水中分离鉴定了 7 株戊糖片球菌,通过 Caco-2 细胞和固定化小肠黏液蛋白质模型,比较了不同菌株的粘附能力,并探讨了粘附能力与菌株基因型、表面疏水性以及自凝聚特性的相关性,为高粘附性戊糖片球菌菌株高效定向筛选及微生态制剂开发提供了候选菌株和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 PCR 试剂、溶菌酶、蛋白酶 K,均购自上海生工生物工程有限公司;MRS 培养基以及细菌生化鉴定试剂,广州环凯生物试剂有限公司产品;细菌 16S rDNA 扩增引物 8F:5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’ 和 15R:5’-AAGGAG GTGATCCAGCCGCA-3’,以及 DNA 指纹图谱扩增随机引物 M13:5′-GAGGGTGGCGGTTCT-3′ 和 M14:5′-GAG GGTGGGGCCGTT-3′,均由上海生工生物工程有限公司合成;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备 ABI2720 型热循环仪，美国 Life Technologies 公司制造；凝胶成像系统，法国 Vilber Lourmat 公司制造；UV-7504C 分光光度计，上海欣茂仪器有限公司制造；Elx-800 型酶标仪，美国 Bio-Tek 公司制造；显微镜，日本 Olympus 公司制造；S-4800 型场发射扫描电镜，日本日立公司制造；Heracell 240i CO_2 培养箱，美国 Thermo Scientific 公司制造。

1.1.3 细胞与实验动物 Caco-2 细胞株，购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；DMEM 培养液、胎牛血清、质量分数 0.25%胰蛋白酶、D-Hank's 缓冲液，均购自 GIBCO 公司；青霉素和链霉素，美国 Sigma 公司产品；6 周龄 ICR 实验小鼠，购自扬州大学比较医学中心。

1.2 方法

1.2.1 戊糖片球菌的分离及生理生化鉴定 臭豆腐发酵卤水样品分别采集自扬州本地不同臭豆腐生产作坊。发酵卤水样品充分混匀后用灭菌生理盐水 10 倍稀释。吸取 250 μL 不同稀释度样品液涂布含有质量分数 0.75% $CaCO_3$ 的 MRS 平板，放入厌氧罐，37 ℃恒温培养 48 h，选择分离程度较好的平板挑取有溶钙圈的单菌落，在 MRS 平板上反复划线纯化，按文献[12]所述的方法对接触酶阴性、产酸的革兰氏阳性球菌进行耐盐性、温度、耐酸碱、动力学以及糖和氨基酸发酵试验，细菌的细胞微观形态采用扫描电镜观察。

1.2.2 细菌基因组 DNA 提取 基因组 DNA 的制备按文献[13]所述的 CTAB 法进行，并作适当改良。吸取 48 h 培养物 1.5 mL 置于离心管中，10 000 r/min 离心 5 min，收集细胞；细胞用 TE 缓冲液洗涤 2 次后重悬于 567 μL TE 缓冲液中，加入 30 μL 质量分数 10% SDS 和 5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K，颠倒混匀，37 ℃温育 1 h；加入 100 μL 5 mol/L 的 NaCl 溶液，混匀后加入 80 μL CTAB-NaCl 溶液，65 ℃水浴 10 min。用酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1)抽提两次，上清液加 2 倍体积的无水乙醇和 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc，-20 ℃静置 1 h；10 000 r/min 离心5 min 收集沉淀，用体积分数 70%乙醇洗涤两次，沉淀经真空冷冻干燥 2 h 后用 40 μL TE 缓冲液溶解，加入 1 μL 10 mg/L 的 RNA 酶，37 ℃消化 1 h。提取物用核酸测定仪测定总 DNA 浓度，- 20 ℃保存备用。

1.2.3 16S rDNA PCR 扩增与测序鉴定 以细菌基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL)包括：2 μL 模板(50 ng/μL)、2 μL dNTPs(10 mmol/L)、引物 8F(10 pmol/μL)和 15R(10 pmol/μL)各 2.0 μL，以及 5 μL 10×Buffer、5 μL $MgCl_2$(25 mmol/L)、0.3 μL Tag 酶(5 U/μL)，最后加 ddH_2O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 40 s，50 ℃退火 35 s，72 ℃延伸 2.0 min，35 次循环；72 ℃延伸 10 min。取 7.0 μL PCR 产物用质量分数 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测片段大小，其余 PCR 产物委托上海生物工程有限公司测序，所得序列在 GenBank (http:// www. ncbi.nlm.nih.gov)数据库中进行在线比对，序列同源性大于 99%设为相同种。

1.2.4 菌株分子指纹图谱鉴别 菌株之间的基因型差异通过 RAPD 指纹图谱鉴别。以细菌基因组 DNA 为模板，应用 M13 和 M14 随机引物进行RAPD 扩增。将 DNA 提取物用 ddH_2O 稀释至 100 ng/μL，随机引物浓度稀释至 10 pmol/μL；优化的 PCR 扩增反应体系为：模板 2.0 μL，dNTPs 0.5 μL，随机引物 2.0 μL，10×Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ 2.5 μL，Tag 酶 0.3 μL，ddH_2O 15.7 μL；RAPD 反应循环参数为：95 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 1 min；53 ℃退火 1 min；72 ℃延伸 1 min，30 个循环；72 ℃补充延伸 8 min。取 10 μL 产物在质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳(电压 5 V/cm)1.5 h，EB 染色 20 min，凝胶成像系统拍照记录，根据条带清晰程度、弥散背景以及带型强弱情况选择稳定的指纹图谱进行分析。

1.2.5 指纹图谱聚类分析 根据在指纹图谱中同一迁移率位点上的扩增条带的“有”和“无”进行数字化处理，用“1”表示“有”，“0”表示“无”，建立矩阵，应用 DPS7.05 数据处理系统中的 0-1 系统聚类分析程序，选择 Nei 氏遗传距离和类平均法进行聚类分析。

1.2.6 菌株表面疏水性测定 参照文献[8]应用微生物粘着碳氢化合物 (Microbial Adhesion To Hydrocarbons，MATH)法测定菌株的表面疏水性。取 36 h 细菌培养物 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，生理盐水洗涤两次，5 000 r/min 离心 10 min。以生理盐水调整受试菌株菌液浓度，使菌悬液在 600 nm 波长下 A 值约为 1.0(A_{600}=1.0)。取 2 mL 菌悬液与 2 mL 二甲苯混合，涡旋 120 s，室温静置 30 min 分层。取 1 mL 水相，以生理盐水为空白对照组，测定

A_{600},每株细菌平行做3管重复。细菌表面疏水率(CSH)计算:

$$H=[(A_0-A)/A_0]\times100\% \quad (1)$$

式(1)中:H即CSH,A_0和A分别是与二甲苯混匀前后水相测定所得的A_{600}值。

1.2.7 菌株自凝聚能力测定 菌株自凝聚能力测定参照文献[14]进行。菌株悬液制备同1.2.6。取4 mL制备好的菌悬液(A_{600}=1.0)置于10 mL带刻度的螺口试管中,室温静置分层,分别在静置1、2、3、4、5 h后吸取1 mL上层悬液测A_{600}值,分别记作A_1、A_2、A_3、A_4、A_5,每个菌株每个时间点平行做3管重复。细菌自凝聚率(AA)计算:

$$C=[1-(A_t/A_0)]\times100\% \quad (2)$$

式(2)中:C即AA,A_0和A_t分别是自凝聚前后上层悬液在600 nm下测量所得的A值。

1.2.8 菌株对Caco-2细胞的粘附能力测定 采有Caco-2细胞作为体外模型测试菌株的粘附能力。Caco-2细胞用添加体积分数10%胎牛血清和100 U/mL青链双抗的DMEM培养液培养,细胞于体积分数5% CO_2培养箱中37 ℃培养,2 d换液一次。细胞用质量分数0.25%胰酶消化并转移到24孔细胞培养板中,于37 ℃、体积分数5% CO_2培养箱中培养至单层细胞形成。戊糖片球菌用MRS活化两代,离心收集菌体,PBS洗2次,用不含胎牛血清和抗生素的DMEM培养液重悬菌体。倾去Caco-2细胞培养板中的培养液,用无菌PBS冲洗2次,然后加入0.5 mL菌悬液,培养1 h后用无菌PBS洗涤4次,洗去未粘附的菌体,加入1 mL Triton 100(体积分数1%),使粘附的菌体同细胞分离,吹打混匀,梯度稀释平板法测定粘附细菌数。用细菌数与阴性对照孔中的细胞数的比值(cfu/cell)表示菌株对Caco-2细胞的粘附能力。

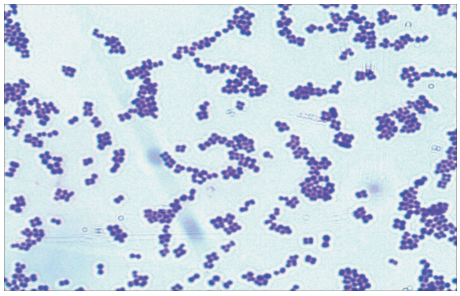
1.2.9 菌株对小肠黏液的粘附能力测定 参照文献[15]方法制备小肠黏液,将6周龄ICR小鼠固定24 h后解剖,取小肠置于冰面,用无菌PBS(pH 7.2,0.01 mol/L)冲洗小肠3次后纵向剪开,刮取小肠内表面黏液,加入2倍体积的PBS缓冲液,混匀,然后12 000 r/min、4 ℃离心10 min,收集上清液,用考马斯亮蓝法测定黏液蛋白质质量浓度,分装后-20 ℃保存备用。取1.0 mL不同浓度的戊糖片球菌悬液于离心管中,10 000 r/min离心10 min,弃上清液,加入1.0 mL质量分数0.1%结晶紫溶液染色50 min后离心收集菌体,PBS洗涤5次后加入1.0 mL柠檬酸盐缓冲液重悬,室温放置60 min后测定A_{540},建立A_{540}和菌悬液细胞数的标准曲线。再参考Vesterlund等建立的方法[16]测定菌株对小肠黏液的粘附能力。取96孔板,每孔加入100 μL鼠小肠黏膜提取液(蛋白质2.0 mg/mL),4 ℃过夜固定。每孔加入100 μL菌悬液,4 ℃孵育2 h倾去悬液并用PBS缓冲液洗涤4次,除去未粘附的细菌。将96孔板置于60 ℃烘箱30 min。每孔加入100 μL质量分数0.1%结晶紫溶液染色50 min,250 μL PBS洗涤5次,加入100 μL柠檬酸盐缓冲液(pH 4.3,0.02 mol/L),室温放置60 min后测定A_{540},并根据建立的标准曲线计算多孔板中粘附的细菌数量,以粘附细菌数和加入细菌数的百分数表示菌株的粘附能力。

1.2.10 数据分析 菌株表面疏水率、自凝聚率以及粘附指数试验结果取3次试验的平均值,以平均值±标准差表示,菌株间差异及数据间的相关性采用Sigmaplot 10.0软件中的t检验和线性回归模式进行统计分析,以P<0.05为有统计学意义。

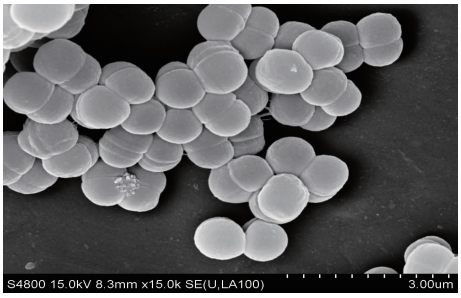
2 结果与分析

2.1 戊糖片球菌分离鉴定结果

通过改良MRS平板分离和厌氧培养在采集的不同来源的臭豆腐发酵卤水样品中均分离得到大量革兰氏阳性、接触酶阴性的产酸菌株,其中菌株F28-8、Y45-30、F3、Y27-4、H13、H6和H10的细胞形态呈二联或四联球状的分离株,如图1(a)所示,扫描电镜结果显示分离株的细胞形态以四联球为主,并且成片聚集在一起,如图1(b)所示。这7个菌株具有相同的生理生化特征,实验结果如表1所示,根据伯杰细菌手册[17]及常见细菌系统鉴定手册[12]描述,这7株球菌菌株均具有典型的戊糖片球菌的生理生化特征。进一步提取7个球菌分离株的基因组DNA并进行16S rDNA扩增,扩增产物和预期大小一致(1 500 bp左右)。将扩增产物测序结果在基因库GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行Blasten比对,结果如表2所示,序列同源性相似性最高的均为戊糖片球菌(最大同源性>99%),只是不同的菌株在GenBank中相似度最高的菌株有所不同。因此,这7个分离株均属于戊糖片球菌种,但可能属不同的基因型。



(a) 革兰氏染色后显微图片(×400)



(b) 扫描电镜结果(×1 5000)

图 1 戊糖片球菌分离株的细胞形态

Fig. 1 Cell morphology of *Pediococcus pentosaceus* strains

表 1 戊糖片球菌分离株的生理生化鉴定结果

Table 1 Results of physiological and biochemical characteristics of *Pediococcus pentosaceus* strains

序号	实验项目	反应
1	运动性	–
2	10 ℃生长	–
3	45 ℃生长	+
4	pH 4.5 生长	+
5	pH 9.6 生长	–
6	质量分数 10% NaCl 生长	–
7	产乳酸	+
8	精氨酸水解实验	+
9	淀粉水解实验	–
10	葡萄糖产气	–
11	乳糖产酸	+
12	蔗糖产酸	–
13	纤维二糖产酸	+
14	木糖产酸	+
15	阿拉伯糖产酸	+
16	鼠李糖产酸	–
17	麦芽糖产酸	+
18	甘露醇产酸	–
19	山梨醇产酸	–

注:“+”表示反应呈阳性,“–”表示反应呈阴性。

表 2 戊糖片球菌分离株 16S rDNA 测序鉴定结果

Table 2 Sequencing results of 16S rDNA identification of *Pediococcus pentosaceus* strains

菌株	序列长度/bp	GenBank 同源序列	最高同源性菌株	最大同源性/%
F28–8	1524	JX397934.1	*Pediococcus pentosaceus* strain A–3	100
Y45–30	1514	AB598964.1	*Pediococcus pentosaceus* strain Ni1144	99
F3	1517	AB598964.1	*Pediococcus pentosaceus* strain Ni1144	99
Y27–4	1516	AB598987	*Pediococcus pentosaceus* strain Ni1386	99
H13	1477	AB550294.1	*Pediococcus pentosaceus* isolate LE1–1	99
H6	1481	HM130536.1	*Pediococcus pentosaceus* strain Pp–33	99
H10	1481	HQ286591.1	*Pediococcus pentosaceus* strain PP	99

2.2 戊糖片球菌的菌株分子多样性

应用 RAPD 分子分型方法对 7 株戊糖片球菌分离株的基因型进行分析,两种不同随机引物 M13 和 M14 的扩增谱带模式如图 2 所示。M13 扩增得到 2 个不同的指纹图谱 (A 型和 B 型),M14 扩增得到 5 个不同的指纹图谱, 分别为 1 型、2 型、3 型、4 型和 5 型。将两种谱带模式进行组合分型, 获得了 6 种基因型,表明发酵卤水中的戊糖片球菌存在高度的分子多样性, 其中 H6 为 A1 型,H10 为 B2 型, H13 为 B3 型,F3 为 A4 型,Y45–30 为 A6 型, 菌株 F28–8 和 Y27–4 谱型相同均为 A5 型。将菌株的特征指纹图谱中的扩增条带按“有”和“无”进行数字化处理, 应用 Nei 氏遗传距离和类平均法进行聚类分析,结果显示在 Nei 氏遗传距离为 0.30 处,可以分成 4 簇, 其中第 1 簇包含菌株 H6、F28–8、Y27–4 和 Y45–30, 显示了这 4 个菌株具有较为相似的基因型,而 F3、H10 和 H13 各自形成一簇,表明菌株间基因型具有较大的差异性。

2.3 不同戊糖片球菌菌株细胞表面特性及粘附能力测定结果

7 株不同戊糖片球菌细胞表面特性及粘附能力测定结果如图 3 所示。MATH 法测定表面疏水率结果显示 7 株戊糖片球菌的表面疏水性存在高度的菌株差异性,如图 3(a)所示,不同菌株的表面疏水

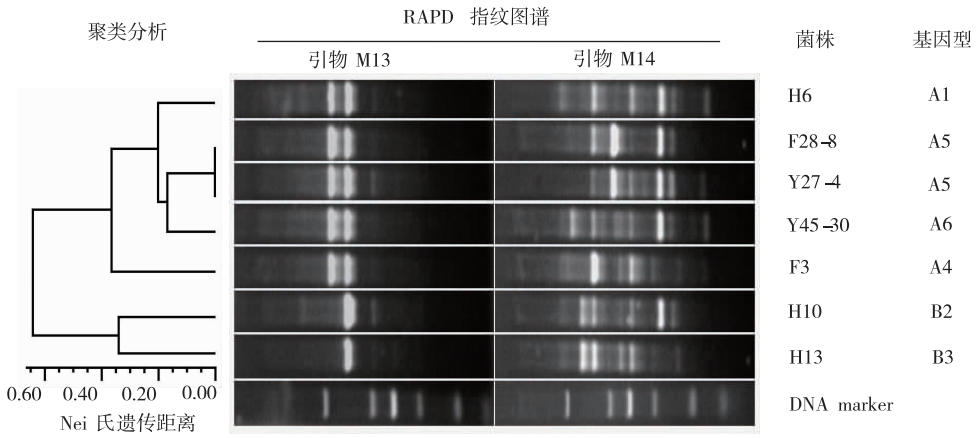
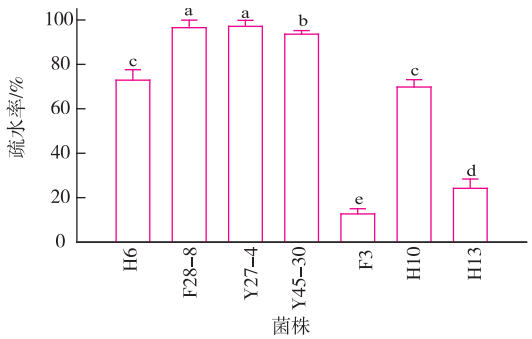


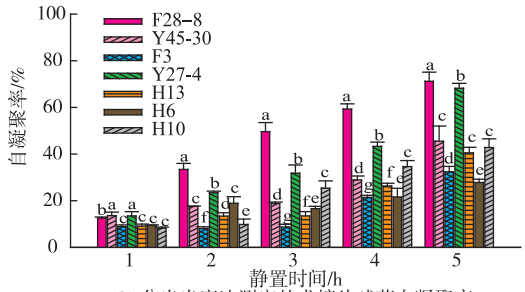
图 2　不同戊糖片球菌分离株的 RAPD 指纹图谱及聚类分析

Fig. 2　RAPD fingerprinting and clustering analysis of different *Pediococcus pentosaceus* strains

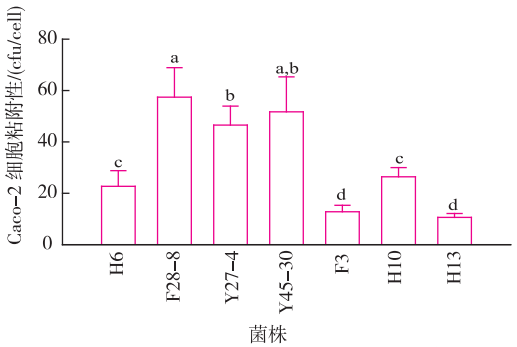
率大小介于 12.7%~97.1%,其中 3 个基因型高度相似的菌株 F28-8、Y27-4 和 Y45-30 显示了高度疏水性,疏水率分别为 96.5%,97.1% 和 93.6%。而菌株 F3 和 H13 的疏水率为 12.7% 和 24.2%,显著低于其它菌株($P < 0.01$),为弱疏水性菌株。应用分光光度法对 7 株戊糖片球菌在涡旋后静置 1~5 h 的自凝聚性进行测定,结果如图 3(b)所示。结果显示,菌株悬液涡旋振荡以后随着静置时间的延长自凝聚率逐渐增大,菌株间的自凝聚率具有显著差异,其中菌株 F28-8、Y27-7 在 2 h 后的各个时间点的凝聚率均显著高于其它菌株($P<0.01$),显示了较高的自凝聚能力。而菌株 F3 和 H13 显示了较弱的自凝聚能力。应用 Caco-2 细胞作为模型研究了 7 株戊糖片球菌对肠上皮细胞的粘附性,结果如图 3(c)所示。结果表明,不同菌株的 Caco-2 细胞粘附率在 12.8~57.4 cfu/cell 之间,其中高疏水性菌株 F28-8、Y27-4 和 Y45-30 具有较高的粘附性,细胞粘附率分别为 57.4、46.5 cfu/cell 和 51.7 cfu/cell,而弱疏水性菌株 F3 和 H13 细胞粘附率分别为 12.8、10.6 cfu/cell,显示了相对较低的细胞粘附性。通过提取小鼠的肠黏液蛋白质建立体外模型测定了 7 株戊糖片球菌对肠黏液的粘附率,结果如图 3(d)所示。不同菌株对肠黏液蛋白质显示了不同的粘附率,其中菌株 F28-8 和 Y45-30 显示了较高的粘附性,分别为 35.2%和 25.8%,显著高于其它菌株($P<0.01$),菌株 H13、H6 和 H10 的粘附率分别为 9.7%、5.7% 和 4.3%,显示了相对较低的粘附性。



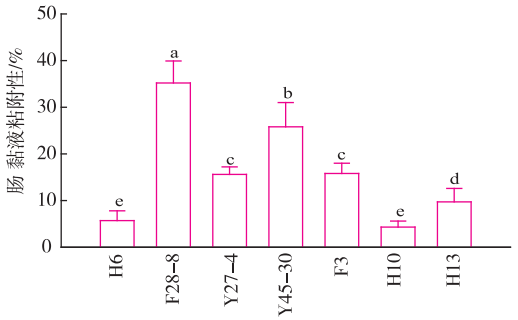
(a) MATH法测定的戊糖片球菌表面疏水率



(b) 分光光度法测定的戊糖片球菌自凝聚率



(c) 不同戊糖片球菌对Caco-2细胞的粘附率



(d) 不同戊糖片球菌对固定化小鼠小肠黏液蛋白质的粘附率

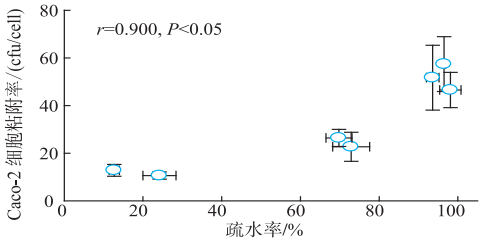
数据为 3 次平行试验结果的平均值,表示为平均值±标准差,不同字母表示菌株之间存在显著差异(P<0.05)。

图 3　不同戊糖片球菌表面疏水性、自凝聚能力以及对 Caco-2 细胞和肠黏膜蛋白质的粘附能力比较

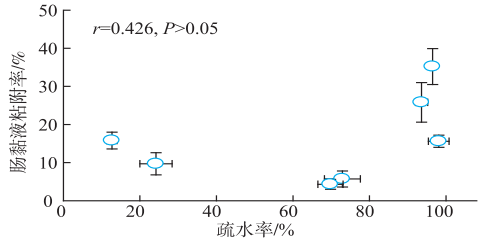
Fig. 3　Comparison of surface hydrophobicity, autoaggregation ability, and adhesion ability to Caco-2 cell and intestinal mucus of different *Pediococcus pentosaceus* strains

2.4　相关性分析结果

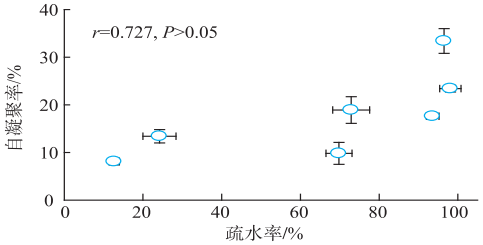
将不同戊糖片球菌菌株的 Caco-2 细胞粘附率、黏液蛋白质粘附率、表面疏水率和自凝聚率(2 h)数据两两组合进行统计分析，绘制相关性散点图(如图 4(a)—(f)所示),并用线性模型模拟它们之间的关系。结果表明戊糖片球菌不同菌株对 Caco-2 细胞粘附性和肠黏液蛋白质的粘附率呈显著正相关(r=0.763,P=0.046,图 4(f)),可能 Caco-2 细胞和肠黏液蛋白质中存在共同的戊糖片球菌粘附素受体。菌株的表面疏水率和自凝聚率(2 h)与 Caco-2 细胞粘附率呈显著正相关 (r=0.900 和 0.792,P<0.05,图 4(a)(d)),但是与肠黏液蛋白质粘附率相关性不显著(r=0.426 和 0.700,P>0.05,图 4(b)(e)),可能原因是戊糖片球菌在与 Caco-2 细胞粘附中表面疏水性和自凝聚能力等非特异粘附发挥了主要作用，而在肠黏液蛋白质作用体系中“粘附素-受体”特异性粘附起主要作用,表面疏水性和自凝聚能力影响较小。疏水性与自凝聚的相关性分析结果显示,两者呈正相关趋势(r=0.727),但不显著(P=0.064,图 4(c)),疏水性是细菌发生自凝聚的主要驱动力,但是受多种因素的影响,如细菌表面组分和结构等,但是总体看来疏水性较高的菌株如 F28-8 和 Y27-4 自凝聚率也相对较高。



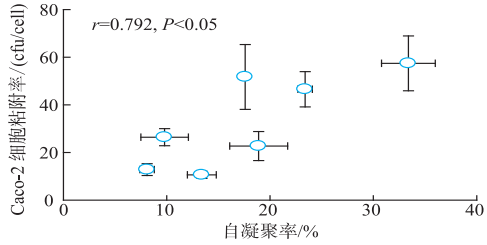
(a) 表面疏水率与细胞粘附率的相关性



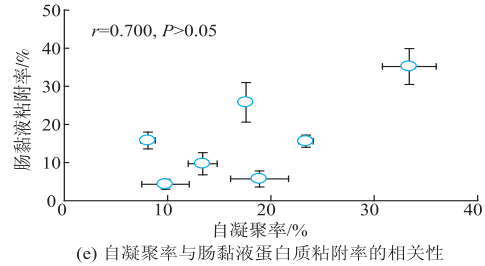
(b) 表面疏水率与肠黏液蛋白质粘附率的相关性



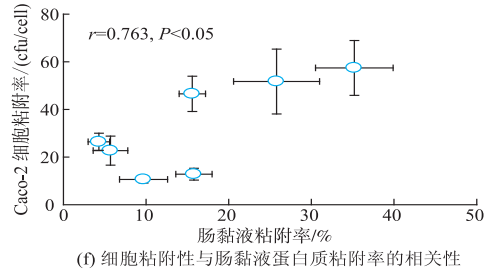
(c) 疏水性与自凝聚率的相关性



(d) 自凝聚率与细胞粘附率的相关性



(e) 自凝聚率与肠黏液蛋白质粘附率的相关性



(f) 细胞粘附性与肠黏液蛋白质粘附率的相关性

图 4　戊糖片球菌细胞表面特性与粘附能力的相关性分析

Fig. 4　Correlation analysis between cell surface characteristics and adhesion abilities of *Pediococcus pentosaceus* strains

3 讨 论

由于抗生素在人类疾病治疗和动物饲养中的大量使用,导致环境中抗生素的积累和耐药性菌株的不断出现,对环境和食品安全带来了威胁。微生态制剂因其能够改善胃肠道功能、提高动物免疫力,在疾病预防和动物饲养中得到了大量推广和应用。戊糖片球菌由于其独特的抗菌性能和免疫调节功能而具有良好应用前景[4-5,18-19]。目前普遍认为粘附能力是益生菌发挥生理作用的前提,也是决定这种益生菌制剂实际效果的重要因素[20]。本课题研究中从臭豆腐发酵卤水中分离鉴定了 7 株戊糖片球菌,DNA 指纹图谱显示具有高度的种内分子多样性。应用 Caco-2 细胞系和固定化肠黏液蛋白质两种体外模型评价了 7 株戊糖片球菌分离株的粘附性,结果显示特征指纹图谱为 A5 型的两个菌株(F28-8 和 Y27-4)显示了最高的 Caco-2 细胞和肠黏液蛋白质粘附能力。

应用 Caco-2 细胞系和固定化肠黏液蛋白质模型评价菌株的黏附能力涉及到细胞培养和动物解剖试验,操作复杂且耗费昂贵。应用分光光度法测定细菌自凝聚能力和微生物粘着碳氢化合物(Microbial Adhesion To Hydrocarbons,MATH)法测定疏水性,对细菌粘附性进行预测和初步筛选更为简单、廉价。本文中探讨了戊糖片球菌表面理化特性与其肠道细胞和黏液粘附的相关性,研究结果显示,戊糖片球菌的表面疏水性和自聚集能力存在显著菌株差异性,其中指纹图谱最相近的 3 个菌株 F28-8(A5 型)、Y27-4(A5 型)和 Y45-30(A6 型)显示了高度疏水性(>90%)。本研究中戊糖片球菌的表面疏水率和自凝聚率(2 h)与 Caco-2 细胞粘附率呈显著正相关(P<0.05),与前期报道中对 *Bifidobacterium longum* 菌株的研究结果[21]一致,表明菌株的表面疏水性和自凝聚性在 Caco-2 细胞粘附过程中发挥了重要作用。尽管有研究表明乳酸菌的一些菌株在体外对 Caco-2 细胞粘附性和肠黏液粘附能力并不一致[22],但本研究中戊糖片球菌对 Caco-2 细胞和固定化肠黏液的粘附率却呈显著正相关(P<0.05),这可能是戊糖片球菌对这两种基质的粘附存在共同的作用机制和影响因素。但是表面疏水率和自凝聚率与肠黏液蛋白质粘附率相关性不显著(P>0.05),可能原因是戊糖片球菌在固定化肠黏液蛋白质作用体系中"粘附素-受体"特异性粘附起了主要作用[23],表面疏水性和自凝聚能力引起的非特异粘附影响较小。

4 结 语

本研究结果为建立体外筛选高粘附性戊糖片球菌菌株提供了实验依据,并为进一步体内研究戊糖片球菌功能特性提供了候选菌株。也为开发戊糖片球菌生态制剂提供了候选菌株,同时为深入研究戊糖片球菌在动物体内的定植和动态变化提供了分子追踪方法。对从大量菌株中筛选高粘附性菌株,缩小试验范围、节约测试成本具有重要意义[9,11]。

参考文献:

[1] 谭汝成,欧阳加敏,卢晓莉,等. 接种植物乳杆菌和戊糖片球菌发酵对鱼鲊品质的影响[J]. 食品科学,2007,28(12):268-271.
TAN Rucheng,OUYANG Jiamin,LU Xiaoli,et al. Fermentation conditions of Yuzha by inoculated *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pertosaceus*[J]. **Food Science**,2007,28(12):268-271.(in Chinese)

[2] 李骏,张春晖,谢华. 发酵剂戊糖片球菌 I9 应用于发酵香肠的效果分析[J]. 肉类工业,2006(9):36-37.
LI Jun,ZHANG Chunhui,XIE Hua. Application of *Pediococcus pentosaceus* I 9 in the fermentation sausage [J]. **Meat Industry**,2006(9):36-37.(in Chinese)

[3] 张红星, 刘丽, 谢远红, 等. 产细菌素的戊糖片球菌的筛选及其细菌素的理化性质研究 [J]. 现代食品科技,2011,27(2):135-138.
ZHANG Hongxing,LIU Li,XIE Yuanhong,et al. Screening of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* strain and study on physicochemical characteristics of bacteriocin[J]. **Modern Food Science and Technology**,2011,27(2):135-138.(in Chinese)

[4] Jonganurakkun B,Wang Q,Xu S H,et al. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2008,106(1):69-73.

[5] Xing C F,Hu H H,Huang J B,et al. Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (Rachycentron canadum)

enhances growth rate,respiratory burst and resistance against photobacteriosis [J]. **Fish & Shellfish Immunology**,2013,35:1122-1128.

[6] Dunne C,O'Mahony L,Murphy L,et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin:correlation with *in vivo* findings[J]. **American Journal of Clinical Nutrition**,2001,73:386S-392S.

[7] Crociani J,Grill J P,Huppert M,et al. Adhesion of different Bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study[J]. **Letters in Applied Microbiology**,1995,21:146-148.

[8] Li X J,Yue L Y,Guan X F,et al. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2008,104:1082-1091.

[9] Del R B,Busetto A,Vignola G,et a1. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacteriumsuis* strain[J]. **Letters in Applied Microbiology**,1998,27:307-310.

[10] Collado M C,Meriluoto J,Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens:*In vitro* evaluation of different methods[J]. **Journal of Microbiological Methods**,2007,71:71-74.

[11] Collado M C,Meriluoto J,Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains[J]. **European Food Research and Technology**,2008,226:1065-1073.

[12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.

[13] 奥斯伯. 精编分子生物学指南[M]. 第 5 版. 北京:科学出版社,2008.

[14] Rahman M M,Kim W S,Kumura H,et al. Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria [J]**. World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2008,24:1593-1598.

[15] Balcazar J L,Vendrell D. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens[J]. **Veterinary Microbiology**,2007,122:373-380.

[16] Vesterlund S,Ouwehand A C,Paltta J,et al. Measurement of bacterial adhesion in vitro evaluation of different methods [J]. **Journal of Microbiological Methods**,2005,60:225-233.

[17] 希坎南. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第 9 版. 北京:科学出版社,1989.

[18] Huang J B,Wu Y C,Chi S C. Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity,physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper(Epinephelus coioides)[J]. **Fish & Shellfish Immunology**,2014,39:196-205.

[19] Shukla R,Goyal A. Novel dextran from *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 isolated from fermented cucumber with anti-cancer properties[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2013,62:352-357.

[20] Henriksson A,Conway P L. Adhesion of *Lactobacillus fermentum* 104-S to porcine stomach mucus [J]. **Current Microbiology**,1996,33:31-34.

[21] Del R B,Sgorbati B,Miglioli M,et al. Adhesion,autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2000,31:438-442.

[22] Van Tassell M L,Miller M J. *Lactobacillus adhesion* to mucus[J]. **Nutrients**,2011(3):613-636.

[23] Rojas M,Ascencio F,Conway P L,et al. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2002,68:2330-2336.