

植物乳杆菌 FB-T9 抑制变异链球菌及其生物膜形成的研究

张秋香, 黄 银, 姚沛琳, 张 灏, 陈 卫*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为筛选得到对变异链球菌及其生物膜形成具有抑制作用的益生菌,从健康及龋病病人口腔、健康人粪便以及新鲜菜叶等样品中分离出乳酸菌,从中挑选出 12 株对变异链球菌具有良好抑菌作用的菌株进行抑制变异链球菌生物膜形成实验,并对这些菌株的共聚和自聚能力、自身生物膜形成能力、表面疏水性、酸碱电荷等性质进行测定。通过 PCA 综合分析得到一株性能优良的植物乳杆菌 FB-T9,并探究了 FB-T9 在不同时期介导对变异链球菌生物膜形成的影响。为考察 FB-T9 在口腔环境中的生存适应性,对该菌粘附唾液包裹的羟磷灰石的能力和溶菌酶的耐受能力进行了体外分析。结果表明植物乳杆菌 FB-T9 具有良好的抑制变异链球菌及其生物膜形成的能力,同时表现出较理想的自聚和共聚能力、表面疏水性质。菌体表面酸电荷较低、碱电荷较高,自身生物膜形成能力低。对唾液包裹的羟磷灰石的粘附率为 32.93%,溶菌酶最高耐受质量浓度为 1.2 mg/mL,说明植物乳杆菌 FB-T9 具有作为预防龋病的口腔益生菌的潜力。

关键词: 乳酸菌;变异链球菌;龋病;抑菌性;生物膜

中图分类号:TS 201.3 文章编号:1673-1689(2019)09-0017-10 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.09.003

Inhibition of *Streptococcus mutans* and Its Biofilm Formation by *Lactobacillus plantarum* FB-T9

ZHANG Qiuxiang, HUANG Yin, YAO Peilin, ZHANG Hao, CHEN Wei*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to screen probiotics that had a inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and its biofilm formation, lactic acid bacteria were isolated from oral samples and feces of healthy people and fresh vegetable leaves, among which 12 strains that could significantly inhibit the growth of *S. mutans* were selected to detect their abilities of inhibiting the biofilm formation of *S. mutans*. The abilities of auto-aggregation, co-aggregation, self-biofilm formation, surface hydrophobicity and surface acid-base charge of these strains were tested, and finally *Lactobacillus plantarum* FB-T9 was

收稿日期: 2017-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31125021, 31200691); 江苏省产学研联合创新资金项目(BY2015019-34)。

作者简介: 张秋香(1979—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品微生物研究。E-mail: zhangqx@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 陈 卫(1966—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事功能性益生菌研究。E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张秋香, 黄银, 姚沛琳, 等. 植物乳杆菌 FB-T9 抑制变异链球菌及其生物膜形成的研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(09): 17-26.

selected by PCA analysis. The inhibition of biofilm formation of *S. mutans* by FB-T9 at different time was further studied. To investigate the survival adaptation of FB-T9 in oral environment, the adhesive capacity to saliva-coated hydroxyapatite and lysozyme tolerance of FB-T9 were measured. *L. plantarum* could strongly inhibit the growth of *S. mutans* and its biofilm formation and showed ideal characters. The adhesive capacity of this strain was 32.93% and the maximum tolerated concentration of lysozyme was 1.2 mg/mL. The results showed that *L. plantarum* FB-T9 could be a potential probiotic to prevent dental caries.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Streptococcus mutans*, dental caries, antibacterial activity, biofilm

龋病是由细菌引起的慢性感染性疾病,是一个连续矿化和脱矿化交替变化的过程^[1]。牙齿表面的牙菌斑^[2]是龋病发生的始动因子,它是一种典型的生物膜,是由细菌分泌的物质和细菌之间相互作用而形成的。变异链球菌(*Streptococcus mutans*)是公认的人类口腔中最主要的致龋细菌^[3],它能高效利用蔗糖代谢产生乳酸,破坏牙体组织;并且具有很强的粘附能力和产多糖能力,会促进牙齿表面致龋性生物膜的进一步形成和发展^[4]。此外12岁儿童恒牙龋齿的患病率为28.9%,而中年人龋齿患病率为88.1%,老年人龋齿患病率为98.4%,龋病总体状况不容乐观^[5]。

现阶段防治儿童龋病的常见方法^[6]有氟化物的应用、糖代替品的使用、养成正确的刷牙方法和频率、定期口腔保健和儿童龋病风险性评估等。但含氟牙膏摄入过量时会导致氟斑牙,糖替代品的使用要求父母具有较强的识别观念,机械去除牙菌斑的方法需考虑到儿童的接受性,定期口腔保健及风险评估对家庭经济状况的要求较高,因此寻找一种简单有效的龋病防治手段很有必要。近些年来,许多专家学者发现多种益生菌能通过抑制致病菌定植、调节粘膜免疫等机制对牙周病、口臭以及口腔念珠菌病等口腔疾病的治疗发挥作用^[7]。口腔益生菌能竞争性抑制口腔致病菌粘附和定植,尤其可以减少唾液中变异链球菌的数量^[8]。为降低龋病的发病率,适用于口腔健康的益生菌需要具备的首要生物特性是能够抑制变异链球菌的生长和生物膜的形成,并能在口腔黏膜和牙面粘附增殖^[9],对溶菌酶也具有一定的耐受能力^[10]。

作者通过抑制致龋细菌生长和抑制致龋菌生物膜形成两个指标筛选得到性能良好的乳酸菌,探究待测菌株的菌株特性,及其对唾液包裹的羟磷灰

石的粘附性和对溶菌酶的耐受性,以期得到能有效预防龋齿的优良乳酸菌。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 唾液、牙菌斑和口腔粘膜:无锡朝阳口腔医院提供;粪便样品:取自江苏如皋和广西巴马长寿村老人,样品收集后置于体积分数30%甘油中-80℃保存。白菜叶、青菜叶等菜叶样品:市售,采集后,进行乳酸菌的分离和筛选。

1.1.2 菌种 变异链球菌 ATCC25175 (*Streptococcus mutans*):中国普通微生物菌种保藏管理中心提供。

1.1.3 培养基和主要试剂

1)MRS^[11]:葡萄糖20.0g,蛋白胨10.0g,牛肉膏10.0g,酵母粉5.0g,三水合乙酸钠5.0g,柠檬酸氢二铵2.0g,七水合磷酸氢二钾2.0g,七水合硫酸镁0.2g,四水合硫酸锰0.05g,吐温-801.0mL,蒸馏水1000mL,pH6.2±0.2,0.1MPa灭菌20min。用于乳酸菌的筛选和培养;

2)TSB^[11]:胰蛋白胨17.0g,大豆蛋白胨3.0g,酵母浸膏6.0g,葡萄糖2.5g,氯化钠5.0g,磷酸氢二钾2.5g,蒸馏水1000mL,pH7.2±0.2,0.1MPa灭菌20min。用于变异链球菌的培养增殖。

1.1.4 主要试剂 碳酸钙,醋酸氯己定溶液(洗必泰),羟磷灰石,结晶紫,丙酮,无水乙醇,二甲苯,硝酸钾,乙酸乙酯,氯仿,溶菌酶:中国医药集团上海化学试剂公司产品;CFSE荧光染料:Invitrogen公司产品;PI染料:Sigma公司产品。

1.1.5 主要仪器 UV-1800紫外可见分光光度计:岛津企业管理有限公司产品;D-78532 Tuttlingen 冷冻离心机:德国RUMA-ZENTRIFUGEN公司产品;

LSM710 激光共聚焦显微镜:德国蔡司公司产品; MMLTISKAN GO 酶标仪:Thermo 公司产品; M5 荧光酶标仪: Molecular Devices 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的分离 利用添加有 15 g/L CaCO_3 的 MRS 培养基从样品中筛选乳酸菌^[12],供后续实验备用。

1.2.2 拮抗 *S. mutans* 乳酸菌的筛选 通过牛津杯琼脂扩散实验从得到的乳酸菌中筛选对变异链球菌具有拮抗作用的乳酸菌,具体实验方法参考姚沛琳^[11]。将质量分数 0.02% 醋酸氯己定溶液稀释 3 倍后作为阳性对照。

1.2.3 抑制 *S. mutans* 生物膜形成乳酸菌的筛选 选取抑菌效果良好的乳酸菌进一步筛选出能抑制 *S. mutans* 生物膜形成的菌株。生物膜标本的制备、荧光染料的配制及染色主要依据 Khan^[13]等人的方法进行;通过专业软件处理得到生物膜厚度,并计算生物膜中活菌面积和死菌面积。生物膜中细菌量的变化用细菌总面积减少率来表示,即细菌总面积减少率(%)=(实验组-对照组)/对照组,通过比较形成的生物膜中的菌体面积减少率初步判定待测乳酸菌对变异链球菌的生物膜形成抑制与否^[14]。

1.2.4 菌体性质的测定

1) 待测菌株自聚和共聚能力的测定 乳酸菌和变异链球菌均过夜培养 12 h, 3 000 r/min 离心 15 min 后弃上清收集菌体,重悬于 PBS 中,调节均浓度为 10^8 CFU/mL。根据菌体单独培养和混合培养时菌液上层吸光值分别判断菌株的自聚和共聚能力,计算公式为:自凝集率(%)= $1 - \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100\%$,其中 A_t 表示在 2、4、16 h 吸光值, A_0 表示 $t = 0$ 时刻的吸光值;交互凝集率(%)= $\frac{(A_x + A_y) - 2A_{\text{mix}}}{(A_x + A_y)} \times 100\%$,其中 A_x 表示乳酸菌的吸光值, A_y 表示变异链球菌的吸光值, A_{mix} 表示混合样品的吸光值。

2) 待测菌株自身生物膜形成能力测定 待测菌株自身生物膜形成能力的测定参考 Wen^[14]等人的方法进行。实验方法稍有改动:染色后用乙醇-丙酮混合液显色,显色后于酶标仪 600 nm 处测定吸光度。

3) 待测菌株表面疏水性和表面酸碱电荷测定 以二甲苯为疏水性有机溶剂测定待测菌株表面疏水性;选择乙酸乙酯作为路易斯碱,氯仿作为路易斯

酸,测定待测菌株表面酸碱电荷。乳酸菌表面疏水性和表面酸碱电荷的测定参考 Samot. J^[15]等人所描述的方法。将乳酸菌过夜培养 12 h 后,离心收集菌体,重悬于 pH 6.2 的 0.1 mol/L KNO_3 中,在 600 nm 下调吸光度为 0.6,记为 A_0 ;将 1 mL 有机溶剂加入到 3 mL 菌液中,在室温下先预培养 10 min,之后振荡 2 min,再在室温下培养 20 min,测定水相在 600 nm 下的吸光度,记为 A_1 ,计算公式:

$$\text{疏水率}(\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0}$$

菌体表面酸碱电荷的测定同上,将有机溶剂替换为乙酸乙酯和氯仿。

1.2.5 菌株综合性质分析 对菌株性质的测定结果采用主成分分析法^[16] (Principal Component Analysis, PCA) 进行分析,从中得到综合性能优良的菌株进行后续实验。

1.2.6 目的菌株的鉴定 将分析得到的性质良好的菌株进行 16S rDNA 分子生物鉴定^[17],将其基因组进行提取、PCR 之后由测序公司测序,所得序列在 NCBI 上采用 BLAST 程序在 GenBank 基因库中与已有的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。

1.2.7 植物乳杆菌 FB-T9 不同时期介导对变异链球菌生物膜形成的影响 作者选择在 *S. mutans* 生物膜形成前期的 0、6 h 和 12 h 以及生物膜形成初期(24 h)和成熟后期(48 h)加入乳酸菌菌悬液进行介导,利用激光共聚焦显微镜(CLSM)对生物膜进行扫描拍照,判断 FB-T9 介导对变异链球菌生物膜形成的影响。生物膜模型的建立和生物膜结构的观察参考 Lynch^[18] 等人的方法,并稍作改动。将 *S. mutans* 过夜培养 12 h 后,调节菌浓度为 10^5 CFU/mL,取 1 mL 菌液和 3 mL 蔗糖质量分数为 0.25% 的 TSB 液体培养基于直径 6 cm 的玻璃培养皿中,将 18 mm × 18 mm 规格的无菌盖玻片作为生物膜形成载体置于培养皿中,在培养时间为第 0、6、12 h 时分别加入 200 μL 乳酸菌菌悬液,静置培养 24 h 后取出玻璃片,染色、观察。而在 *S. mutans* 24 h(或 48 h)生物膜形成后介导的操作如下:在 12 h(或 24 h)更换 3 mL 新鲜 TSB 培养基,形成 24 h(或 48 h) *S. mutans* 生物膜,去除培养皿中培养基,PBS 洗涤玻片 2 次,去除表面浮游细菌,加入 4 mL 乳酸菌菌悬液,静置培养 24 h 后,取出玻璃片,染色、观察。

1.2.8 植物乳杆菌 FB-T9 对唾液包裹的羟基磷灰石的粘附能力测定 健康志愿者唾液的收集与处理以及唾液包被的羟基磷灰石(S-HA)的制备、待测乳酸菌的培养、荧光染色及菌体的粘附参考赵红萍^[19]等人的方法,在荧光酶标仪上以激发波长 492 nm、发射波长 517 nm 测定各孔的荧光值,扣除阴性对照组的荧光值,即为粘附菌的荧光值。细菌粘附率=粘附菌的荧光值/总荧光值×100%,其中总荧光值是只含有标记的菌液、未加入羟基磷灰石测定的荧光值;阴性对照是只含有羟基磷灰石和 PBS 测定的荧光值。

1.2.9 植物乳杆菌 FB-T9 对溶菌酶的耐受能力的分析 采用分光光度法考察 FB-T9 对溶菌酶的耐受情况。在 96 孔培养板中加入 MRS 培养基,再分

别添加不同质量浓度的溶菌酶溶液使得终质量浓度分别为 0.2~3.0 mg/mL。将乳酸菌培养物以体积分数 5%的接种量接种到 96 孔培养板中,37 ℃培养 24 h,测定 $A_{600\text{nm}}$,即根据 FB-T9 的生长情况判断 FB-T9 对溶菌酶的耐受性。对照组只添加等体积的 10^8 CFU/mL 乳酸菌培养物,溶菌酶溶液的量用等体积无菌水替代。

2 结果与讨论

2.1 拮抗 *S. mutans* 乳酸菌的筛选

通过选择性 MRS 培养基从样品中筛选出乳酸菌,然后利用牛津杯琼脂扩散法筛选对变异链球菌具有抑制作用的菌株,抑菌结果如表 1 所示。

表 1 乳酸菌对变异链球菌生长的抑制

Table 1 Inhibition of LAB strains on the growth of *S. mutans*

来源	菌株编号	抑菌圈大小/mm	来源	菌株编号	抑菌圈大小/mm
阳性对照	洗必泰	18.69±0.04	粪便	FB-T9	17.82±0.31
唾液	L1-1	15.11±0.11	粪便	FB-T1	15.06±0.38
唾液	L1-3	14.11±0.31	粪便	14931	8.62±0.41
唾液	L1-4	13.98±0.14	白菜叶	7-1-8	10.81±0.83
唾液	L1-6	10.57±1.68	白菜叶	7-1-18	16.24±0.29
唾液	L2-1	15.67±1.56	白菜叶	7-1-21	8.79±0.34
唾液	23A	11.79±0.79	白菜叶	7-1-22	0
唾液	D135	15.91±0.24	白菜叶	7-1-25	16.85±0.37
唾液	12A	8.71±0.57	白菜叶	7-1-28	14.33±0.49
牙面	L2-3	13.93±0.83	白菜叶	7-1-29	9.05±0.87
牙面	L2-5	12.18±1.18	白菜叶	7-2-29	0
牙面	L2-6	14.95±0.11	马兰头叶	8-1	13.96±0.42
舌面	Q8	0	马兰头叶	8-3	0
舌面	LBS1C	14.12±1.43	马兰头叶	8-7	10.01±1.25
上粘膜	X1-1	14.30±0.45	马兰头叶	8-10	13.06±1.01
上粘膜	X2-1	15.88±1.27	青菜叶	10-9	14.80±1.28
颊粘膜	5C-2	12.88±0.79	青菜叶	10-11	10.65±0.61
颊粘膜	5C-3	15.63±0.65	青菜叶	12-22	17.01±0.17
颊粘膜	5C-4	0	青菜叶	12-26	14.83±0.41
颊粘膜	5C-5	14.3±0.74	青菜叶	12-31	15.07±0.08
颊粘膜	5D-3	15.17±0.08	青菜叶	12-39	13.55±0.93
颊粘膜	7E	13.24±0.96	青菜叶	12-32	10.11±0.33
腌制卤水	LP-10	14.03±0.05	青菜叶	12-52	8.55±0.32
腌制卤水	LY-103	16.77±0.62	青菜叶	12-60	0
腌制卤水	LP-234	13.65±0.79	青菜叶	12-62	14.94±0.51
腌制卤水	LPZ-14	16.05±0.38	青菜叶	20-11	14.18±0.54

续表 1

来源	菌株编号	抑菌圈大小/mm	来源	菌株编号	抑菌圈大小/mm
腌制卤水	574	14.92±0.13	青菜叶	20-27	0
牛奶	10	15.12±0.15	青菜叶	22-3	16.36±0.62
面团	381	16.37±0.33	青菜叶	22-8	15.66±0.55
酸豆角	426	14.73±0.21	青菜叶	22-11	10.44±0.52
酒饼	430	15.91±0.41	青菜叶	22-12	12.27±1.17
鱼酱	438	16.98±1.21	青菜叶	22-19	15.08±1.07
酸辣椒	547	14.79±0.58	冰草叶	13-13	13.34±0.11
酸菜	578	15.56±0.62	冰草叶	13-14	13.84±1.04
泡菜	PC-T4	16.61±0.31	冰草叶	13-15	15.96±0.58
泡菜	567	14.35±0.52	冰草叶	13-19	11.12±1.11
泡菜	9	13.94±0.91	花菜叶	19-17	14.79±0.31
泡菜	713	13.62±0.85	花菜叶	19-18	17.16±0.55
酵素粉	LY-LR	15.17±0.27	花菜叶	19-30	8.73±0.37
酵素粉	PA-18	14.17±0.76	油菜菜叶	24-29	11.94±1.63
酸奶	Z7	15.56±0.62	油菜菜叶	24-35	15.73±0.11
酸奶	LR-135	12.18±1.18	油菜菜叶	24-36	15.19±1.16
酸奶	LP-11	16.95±0.23	油菜菜叶	24-39	14.47±0.81
酸奶	La-137	13.65±0.46	油菜菜叶	24-58	14.77±1.24
酸奶	Lb-12	13.36±0.52	油菜菜叶	24-51	15.26±1.05
酸奶	15	13.36±0.52	莴笋叶	39-1-3	11.61±1.01
粪便	D12	11.04±1.01	莴笋叶	39-1-7	13.88±0.33

注:“0”表示无抑菌效果;抑菌直径 7 mm <Φ<11 mm,抑菌效果较弱;11 mm<Φ<15 mm,抑菌效果一般;15 mm<Φ<19 mm,抑菌效果较好;Φ≥19 mm,抑菌效果强。

根据抑菌实验的结果,选择抑菌效果良好(抑菌圈在 15 mm 及以上)的菌株 5D-3、PC-T4、LP-11、FB-T9、LPZ-14、381、430、438、7-1-18、12-22、13-15、24-35 共 12 株菌进行后续的筛菌实验。

2.2 抑制 *S. mutans* 生物膜形成乳酸菌的筛选

在 0 h 将待测菌株与变异链球菌一起培养 24 h,使用共聚焦激光扫描显微镜观察生物膜结构,并计算各自的菌体总面积相对于空白组的减少率,结果如表 2 所示。

表 2 不同菌株对变异链球菌生物膜形成的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of LAB on *S. mutans* biofilm formation($\bar{x} \pm s$)

菌株编号	减少率/%	菌株编号	减少率/%
PC-T4	-47.34±1.42	438	13.80±0.86
LPZ-14	33.59±0.65	5D-3	-30.93±1.02
LP-11	-43.56±0.91	7-1-18	45.12±1.71
FB-T9	60.33±1.87	12-22	26.51±0.79
381	-62.09±1.03	13-15	47.57±0.66
430	-34.71±0.67	24-35	-60.15±1.10

有些乳酸菌如 LPZ-14、FB-T9 等对变异链球菌的生物膜的形成有抑制作用,而 PC-T4、5D-3 等则起到促进作用。这种情况与姚沛琳^[11]的测定结果具有相似性。具有防治龋病能力的益生菌,需要在抑制变异链球菌的同时能抑制其生物膜的形成。

2.3 待测菌株菌体性质测定

2.3.1 待测菌株自聚能力的测定 菌体的自聚能力与其黏附宿主细胞的能力有一定相关性,具有较强自凝集能力的菌株,定殖能力更好^[20]。待测菌株的自聚能力过低说明该菌株在口腔中的生长繁殖能力较弱,不利于在口腔环境中的定殖;但薛龙^[21]等人指出高自聚能力是一些口腔致病菌引起口腔疾病的一个重要原因,所以综合而言初期自聚力较高而后期自聚力不强的菌株可能更具作为口腔益生菌的潜能。从表 3 的实验结果中可以看出,初期(4 h)待测菌株的自聚能力强弱不同(8.31%~35.09%),而此自聚结果整体偏低,可能原因是测定时间的不同和菌株的差异性。

表 3 不同时间点待测菌株的自聚能力

Table 3 Auto-aggregation ability of LAB at different time

待测菌株	t/h		
	2	4	16
PC-T4	14.45±1.13	25.96±1.06	69.307±0.38
5D-3	27.14±1.33	33.33±1.83	67.90±0.46
381	5.60±1.70	22.54±0.98	70.19±2.01
430	3.00±1.10	11.22±1.24	73.62±1.59
438	9.33±1.36	14.02±0.82	48.33±0.59
12-22	5.01±0.74	12.91±0.32	53.63±2.24
FB-T9	28.52±0.43	35.09±0.26	64.63±1.65
24-35	11.45±0.83	32.66±0.88	44.89±2.08
13-15	9.20±0.65	21.59±0.37	71.04±0.37
LP-11	0.82±0.61	8.31±1.09	20.87±0.61
LPZ-14	10.77±0.86	12.77±2.49	28.06±0.26
7-1-18	9.32±1.34	17.73±1.79	66.48±0.85

2.3.2 待测菌株共聚能力的测定 益生菌与致病菌的共聚能力也是益生菌发挥益生功能的一个重要方面。如果益生菌能够与口腔中浮游的致病菌发生共聚,随着唾液的吞咽、口腔清理等行为,有助于减少口腔中浮游的致病菌数量,从而减少致病菌在口腔中的定植。

由表 4 的实验结果可以看出,2 h 时待测菌株的共聚能力较低,可能原因是初期的待测菌株主要发挥增殖作用和抑菌作用,而 4 h 的共聚能力明显增大,说明待测菌株开始与变异链球菌发生相互凝

表 4 不同时间下待测菌的共聚能力

Table 4 Coagregation ability of LAB at different time

待测菌株	t/h	
	2	4
PC-T4	4.92±0.42	9.28±0.37
5D-3	5.82±0.10	13.72±0.07
381	9.60±0.05	17.19±0.20
430	4.62±0.02	9.93±0.09
438	4.43±0.38	7.62±0.45
12-22	13.92±0.10	21.00±0.46
24-35	3.92±0.46	11.49±0.39
FB-T9	8.69±0.57	15.26±0.33
13-15	1.69±0.39	8.43±0.12
LP-11	4.60±0.09	12.37±0.33
LPZ-14	7.76±0.22	16.67±0.32
7-1-18	8.28±0.35	12.41±0.11

集作用,且交互凝集率在 7.3%~22.5%。菌株 381、12-22、FB-T9、LPZ-14 具有较为良好的共聚能力,说明它们在口腔环境中可能具备促进浮游变异链球菌排除口腔的能力。

2.3.3 待测菌株自身生物膜形成能力测定 TORLAKOVIC^[22]等人的研究表明除了变异链球菌,包括乳酸菌属和双歧杆菌属在内的菌种也可能与早期龋损的发展有关,作为益生菌菌株自身生物膜的形成至关重要。为了保证它们作为益生菌在口腔环境中不会促进口腔生物膜的形成,其自身生物膜形成能力尽可能越低越好。由图 1 的实验结果可以看出,相比于主要致龋菌 *S. mutans* 形成生物膜的能力,待测菌株自身生物膜形成能力普遍较低,其中菌株 381、430、FB-T9 和 LPZ-14 自身形成生物膜的能力相对低下,表明它们在口腔中作用时可能不会促进生物膜的形成。

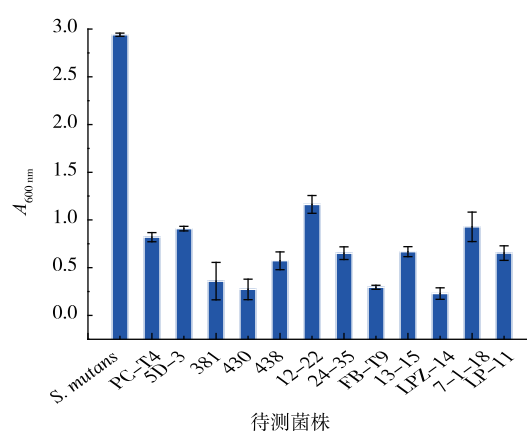


图 1 待测菌株自身生物膜形成能力

Fig. 1 Biofilm formation ability of LAB

2.3.4 待测菌株表面疏水性测定 菌株的表面疏水性越高,对上皮细胞的粘附性越好^[23]。由图 2 显示的结果可以看出菌株 PC-T4、FB-T9、438、13-15 和 24-35 具有较高的疏水性,可能对口腔上皮细胞的粘附力强,更有利于有益菌株在口腔内的定植。

2.3.5 待测菌株表面酸碱电荷测定 菌体的表面性质,如表面疏水性和表面酸碱电荷与菌株之间及与宿主之间的非特异性粘附有关^[24],菌体表面具有较低的酸电荷和较高的碱电荷不会促进生物膜的形成,反而能抑制其形成。由表 5 显示的结果可以看出待测菌株 FB-T9 和 438 具有较理想的酸碱电荷性质,这与它们能有效抑制变异链球菌生物膜形成量的结果保持一致。

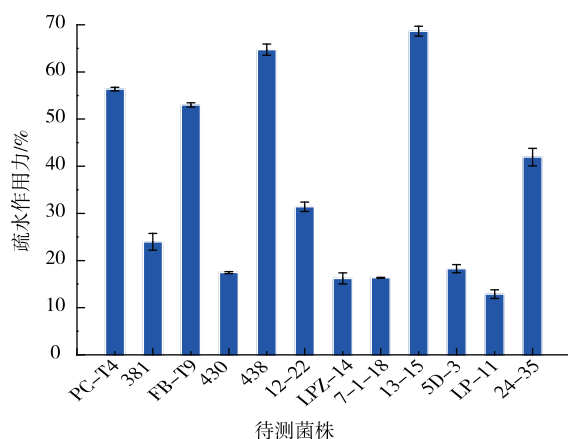


图 2 待测菌株的表面疏水性

Fig. 2 Surface hydrophobicity of LAB

表 5 待测菌株的表面酸碱电荷

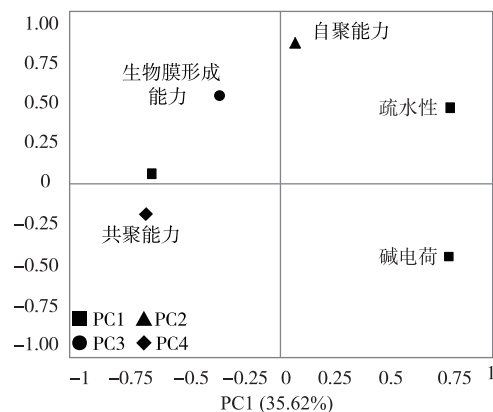
Table 5 Acid and alkali charge of the surface of LAB %

待测菌株	酸电荷	碱电荷
PC-T4	54.68±0.74	13.43±0.03
381	79.47±0.10	4.94±0.26
FB-T9	34.52±0.61	20.32±0.05
430	51.91±0.84	13.52±1.44
438	52.22±0.44	24.96±0.23
12-22	52.14±1.71	10.92±0.17
LPZ-14	42.06±0.93	13.53±0.84
7-1-18	35.51±0.26	7.60±0.89
13-15	34.48±0.90	9.08±0.16
5D-3	61.53±0.59	2.07±0.68
LP-11	63.65±0.75	10.25±0.58
24-35	61.89±1.19	5.44±0.07

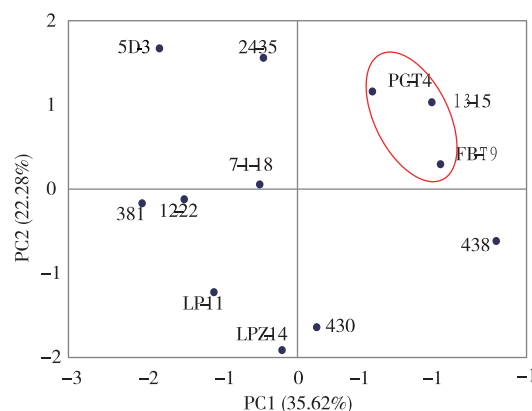
2.4 菌株性质综合分析

利用 PCA 分析方法评价乳酸菌的菌株特性与抑制 *S. mutans* 生物膜形成的能力,从而筛选出具有潜在抑制 *S. mutans* 生物膜形成作用的乳酸菌。由因子载荷图 3(a)可知,主要分成 4 个主成分:(1)第一主成分(PC1)在模型中的贡献率为 35.62%,特征是疏水性、酸电荷和碱电荷;第二主成分(PC2)在模型中的贡献率为 22.28%,特征是自聚能力;第三主成分(PC3)在模型中的贡献率为 16.24%,特征是自身生物膜形成能力;第四主成分(PC4)在模型中的贡献率为 13.66%,特征是共聚能力。因子评分图 3(b)和图 3(c)展示了潜在乳酸菌的分布。从因子评分图 3(b)上可以看出,在主成分 1 和主成分 2 上综合得分高的有 3 株菌,分别为 PC-T4、13-15 和 FB-T9;从因子评分图 3(c)上可以看出,在主成分 3 和

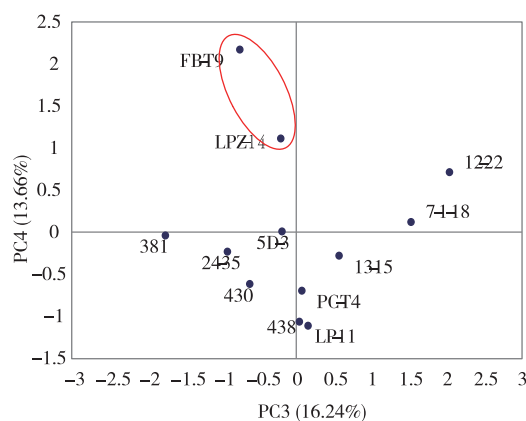
主成分 4 上综合得分高的有两株菌,分别为 FB-T9 和 LPZ-14。综合看来,菌株 FB-T9 表现出较高的综合能力。结合筛菌结果,在抑菌作用和抑制变异链球菌生物膜形成性质上表现良好的菌株为 FB-T9。



(a)因子载荷图



(b)PC1和PC2的因子评分



(c)PC3和PC4的因子评分图

图 3 主成分分析乳酸菌菌株特性

Fig. 3 Graphical representation of the principal component analysis of LAB properties

2.5 目的菌株的鉴定

基于 16S rDNA 基因两端的保守序列,对菌株

FB-T9 进行分子鉴定,结果表明菌株 FB-T9 的 16S rDNA 序列与植物乳杆菌序列具有 100%的同源性,可以初步判定菌株 FB-T9 为植物乳杆菌。

2.6 植物乳杆菌 FB-T9 介导对变异链球菌生物膜形成的影响

根据唐子圣^[25]等人的研究结果,变异链球菌早期生物膜经过 24 h 已经基本形成,形成规律具体如下:0 h 细菌开始粘附;6 h 细菌开始定殖,是生物膜典型结构形成的关键时期;到 12 h,早期生物膜开始形成;24 h 时早期生物膜已经基本形成;而到 48 h,变异链球菌生物膜已经成熟。

为考察植物乳杆菌 FB-T9 的介导时间对变异链球菌生物膜的影响,在 0、6、12 h 时分别在变异链

球菌培养液中加入 FB-T9,随后培养至 24 h,通过激光共聚焦显微镜观察变异链球菌的生物膜结构。随着培养时间的增加,从 24 h(图 4(a))到 48 h(图 4(b)),阴性对照组中 *S. mutans* 生物膜的荧光强度和面积增大,结构逐渐变得致密,生物膜的形成量也逐渐增大。在 0 h(图 4(c))加入 FB-T9 介导培养至 24 h 后,荧光强度极低,说明 FB-T9 严重抑制了 *S. mutans* 的粘附;在 6 h(图 4(d))介导后培养至 24 h,能看到零散的橘色荧光,死菌较多,说明前 6 h *S. mutans* 开始粘附,但之后由于 FB-T9 的加入,抑制了 *S. mutans* 的定殖;而在 12 h(图 4(e))介导时,由于 *S. mutans* 已成功定殖,菌体荧光面积逐渐增大,但呈现出分散的橘色荧光,说明 *S. mutans* 的生长和

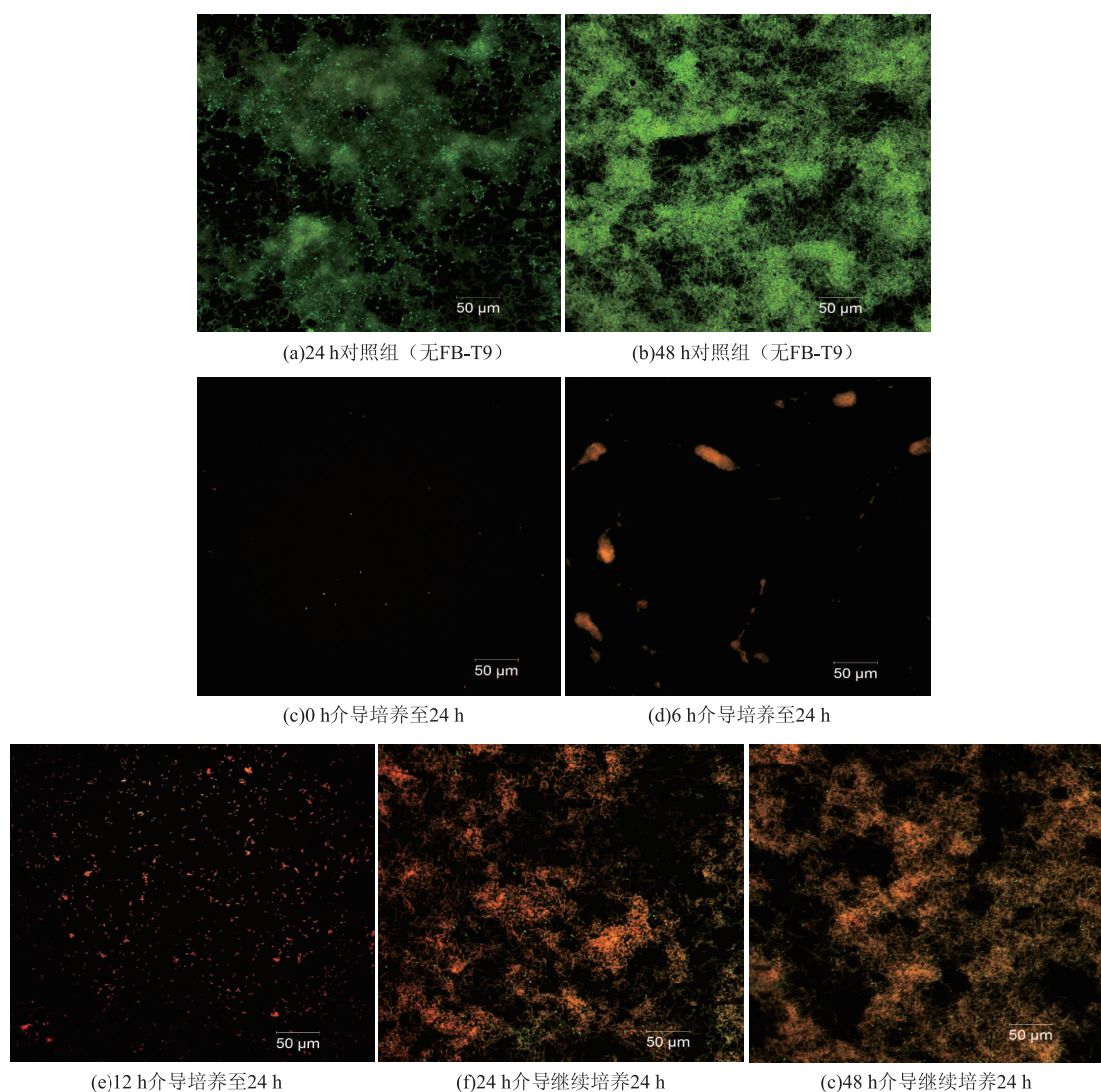


图 4 激光共聚焦显微镜下的生物膜结构图

Fig. 4 CLSM images of biofilm structure

生物膜的形成受到了抑制。

为考察 *S. mutans* 生物膜形成后 FB-T9 的抑制作用,在 24 h 时加入 FB-T9 介导,培养到 48 h 观察生物膜结构。可以看到在 24 h(图 4(f))介导时由于 *S. mutans* 生物膜已经基本形成,呈现出小面积的团状结构,且相对于 12 h(图 4(e))介导后的生物膜结构致密,但对比 24 h 阴性对照(图 4(a)),绿色荧光面积很少,主要呈现出橘色荧光,说明 FB-T9 对生物膜中的菌体有明显抑制作用,但在结构上没有明显的破坏作用;而在 48 h 时介导,由于 *S. mutans* 生物膜已经成熟,生物膜呈现致密的团块状结构,菌落聚集融合,但是相较于 48 h 的阴性对照(图 4(b)),除了生物膜中的死菌面积明显增大以外,生物膜结构没有显著变化,说明在 *S. mutans* 生物膜成熟以后 FB-T9 的介导效果并不理想。从而可推断,植物乳杆菌 FB-T9 在 *S. mutans* 生物膜形成前期的介导效果较好,能显著抑制变异链球菌的粘附和定殖,对其生物膜结构的形成表现出明显的抑制作用,且对于减少各时期生物膜中的活菌面积有显著效果。

2.7 植物乳杆菌 FB-T9 对唾液包裹的羟磷灰石粘附能力的测定

人类牙齿的主要成分为羟磷灰石,体外利用 S-HA 模拟口腔牙齿,考察植物乳杆菌 FB-T9 对牙面的粘附能力。实验结果显示:植物乳杆菌 FB-T9 对 S-HA 的粘附率为 32.93%,显著低于变异链球菌对 S-HA 的粘附率 ($P < 0.05$)。这表明植物乳杆菌 FB-T9 对牙面的粘附性相对较低,不会在牙齿表面大量聚集,对牙齿酸蚀威胁的可能性较小。

2.8 植物乳杆菌 FB-T9 对溶菌酶的耐受能力的分析

实验结果显示:在 0~1.2 mg/mL 质量浓度下的溶菌酶基本不影响植物乳杆菌 FB-T9 的生长,但是当溶菌酶质量浓度高达 1.4 mg/mL 时,菌体生长吸

光值发生突然变小,可能原因是在植物乳杆菌 FB-T9 的对溶菌酶耐受的临界质量浓度介于 1.2~1.4 mg/mL 之间,即植物乳杆菌 FB-T9 对溶菌酶的最高耐受质量浓度为 1.2 mg/mL^[26]。作者的实验结果远远高出人口腔唾液中溶菌酶质量浓度(0~57 $\mu\text{g/mL}$),这说明该菌株具备在口腔环境中存活的能力。

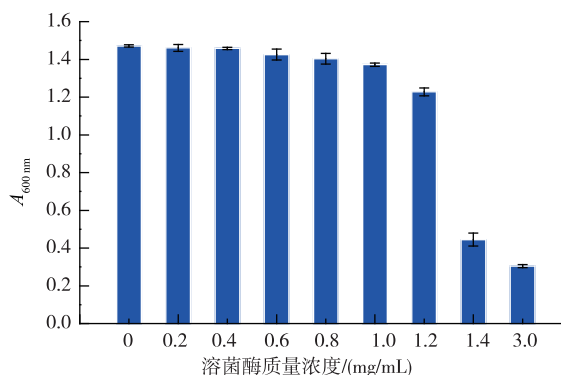


图 5 植物乳杆菌 FB-T9 在不同质量浓度溶菌酶下培养 24 h 的生长情况

Fig. 5 Growth of *L. plantarum* FB-T9 at 24 h in different concentrations of lysozyme

3 结 语

从健康人的粪便中分离得到一株对变异链球菌的生长及生物膜形成具有抑制效果的植物乳杆菌 FB-T9。 *L. plantarum* FB-T9 的早期介导能显著抑制 *S. mutans* 的粘附和定殖,进而抑制生物膜形成,且能有效减少生物膜中的活菌面积。此外,该菌对牙面表现出较低的粘附率,并在远高于口腔溶菌酶浓度的条件下,表现出良好的耐受性,说明 FB-T9 具备作为口腔益生菌的潜能。由于 *L. plantarum* FB-T9 在《可用于食品的菌种》名单之列,可以作为安全益生菌株添加于食品中,以咀嚼片或奶片的形式作为日常口腔益生菌产品在预防儿童和成人人口腔龋齿上发挥作用。

参考文献:

- [1] LU Zhangmin. New ideas and research direction of dental decay [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2015, 50 (2): 65-68. (in Chinese)
- [2] MARSH P D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease [J]. *BMC Oral Health*, 2006, 6(1): S14.
- [3] WANG Chenglong, SU Donghua, LIU Jjiao, et al. Isolation and identification of *Streptococcus mutans* strains with different genotype from clinical samples[J]. *West China Journal of Stomatology*, 2013, 31(1): 80-85. (in Chinese)
- [4] SHI Airon. The characteristics and situation of prevention and control of domestic children's dental decay[J]. *Youjiang Medical*

- Journal**, 2014, 42(4):487-490. (in Chinese)
- [5] QU Yanmei. The harm and prevention and control of children's dental decay [J]. **General Oral Medical Electronic Magazine**, 2015, 7(2):14-15. (in Chinese)
- [6] ZOU Jing. The risk assessment of children's dental decay [J]. **West China Journal of Stomatology**, 2014, 32 (1):1-4. (in Chinese)
- [7] ZHAO Chen, HUA Hong, YAN Zhimin. The research progress of probiotics for the prevention and treatment of oral diseases[J]. **Journal of Oral Science Research**, 2016, 32(4):4184-4120. (in Chinese)
- [8] CAGLAR E, CILDIR S K, ERGENELI S, et al. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets[J]. **Acta Odontologica Scandinavica**, 2006, 64(5):314-318.
- [9] MEURMAN J H, STAMATOVA I. Probiotics: contributions to oral health[J]. **Oral Diseases**, 2007, 13(5):443-451.
- [10] BOSCH M, NART J, AUDIVERT S, et al. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health [J]. **Archives of Oral Biology**, 2012, 57(5):539-549.
- [11] YAO Peilin, LIU Sisi, ZHANG Ning, et al. Screening and research of a probiotic lactic acid bacteria against dental caries in vitro [J]. **Food Industry Science and Technology Magazine**, 2015, 19:347-351. (in Chinese)
- [12] LI Jing, WANG Yao, DENG Maoheng. Screening and characterization of an excellent *Lactobacillus* isolated from Pickle[J]. **Food Industry Science and Technology Magazine**, 2016, 37(6):229-232. (in Chinese)
- [13] KHAN R, ZAKIR M, KHANAM Z, et al. Novel compound from *Trachyspermum ammi* (*Ajowan caraway*) seeds with antibiofilm and antiadherence activities against *Streptococcus mutans*: a potential chemotherapeutic agent against dental caries[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2010, 109(6):2151-2159.
- [14] WEN Z T, SUNTHARALIGHAM P, CVITKOVITCH D G, et al. Trigger factor in streptococcus mutans is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation[J]. **Infection & Immunity**, 2005, 73(1):219-225.
- [15] SAMOT J, LEBRETON J, BADET C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes [J]. **Anaerobe**, 2011, 17(2):69-72.
- [16] 陈佩. 益生乳酸菌的降糖作用及其机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [17] CUI Yanting, WANG Yang, LI Pinglan. Selection and Identification of lactic acid bacteria strains for fermented meat starter cultures[J]. **Journal of Food and Biological Technology**, 2011, 30(2):239-244. (in Chinese)
- [18] LYNCH D J, FOUNTAIN T L, MAZURKIEWICZ J E, et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2007, 268(2):158-165.
- [19] ZHAO Hongping, Wu Buling, Su Linyun, et al. In vitro investigation of the adhesion properties of glucan-binding protein D gene inactivated mutant of *Streptococcus mutans*[J]. **Journal of Clinical Oral Medicine**, 2012, 28(6):604-607. (in Chinese)
- [20] WANG Qiangyi, WANG Shuai, DONG Li. Identification of vaginal *Lactobacillus* isolated by 16S rDNA sequencing and characterization of the hydrogen peroxide production and autoaggregation activities of the predominant strain[J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2014, 26(10):1117-1122. (in Chinese)
- [21] XUE Long, WANG Lihe, LIE Hongbing, et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus salivarius* W22a on the periodontal pathogens [J]. **Journal of Oral Science Research**, 2016, 32(10):1042-1046. (in Chinese)
- [22] TORLAKOVIC L, KLEPACCERAJ V, OGAARD B, et al. Microbial community succession on developing lesions on human enamel[J]. **Journal of Oral Microbiology**, 2011, 4:16125-16132.
- [23] RIBEIRO S C, O'CONNOR P M, ROSS R P, et al. An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lactacin 481[J]. **International Dairy Journal**, 2016, 63:18-28.
- [24] FAVARO L, BASAGLIA M, CASELLA S, et al. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese[J]. **Food Microbiology**, 2014, 38(2):228-239.
- [25] TANG Zisheng, ZHU Min, LIU Zheng. The observation of the architecture of *Streptococcus mutans* biofilms[J]. **Chinese Journal of Microbiology and Immunology**, 2004, 24(2):103-106. (in Chinese)
- [26] YANG Juan, OU Cuocheng, CHEN Jian, et al. Screening of oral lactobacilli and research of its probiotic properties[J]. **Journal of Microbiology**, 2013, 53(4):403-408. (in Chinese)