

健康婴儿粪便中粪肠球菌的分离鉴定 与体外安全性评价

桑微¹, 李国花¹, 赵馨¹, 马雨哲¹, 钱卫生², 鲁曦^{1*}

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710021)

(2. 空军军医大学唐都医院室, 陕西西安 710038)

摘要: 为筛选出符合安全要求的粪肠球菌, 该研究以采集的1月龄健康婴儿粪便样本为研究对象, 采用MRS分离纯化和16S rRNA测序进行菌种鉴定, 共鉴定出64株粪肠球菌。该研究对其中16株菌进行体外安全性评价, 分别考察其溶血性、抗生素敏感性和6种毒力基因。结果发现16株粪肠球菌均未出现 β 溶血现象; 药敏试验发现菌株对四环素(56.25%)、红霉素(43.75%)耐药率较高, 青霉素(37.50%)和环丙沙星(31.25%)次之, 未发现万古霉素和替考拉宁耐受菌株; 继上述实验获得的8株相对安全菌株进行毒力基因检测, 共检出5种毒力基因: *ace*、*asal*、*efaA*、*cylA*、*gelE*, 以 $ace^+ efaA^+ gelE^+$ 为主要携带模式; 综合评价后最终得到4株粪肠球菌候选菌株, 编号为:LX29、LX31、LX41、LX50, 可为后续的功能性研究和产品开发奠定基础。

关键词: 粪肠球菌; 抗生素耐药性; 毒力基因

文章编号: 1673-9078(2024)03-83-90

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0273

Isolation, Identification, and *in Vitro* Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* in the Stool of Healthy Infants

SANG Wei¹, LI Guohua¹, ZHAO Xin¹, MA Yuzhe¹, QIAN Weisheng², LU Xi^{1*}

(1. School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

(2. Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: To screen for safe strains of *Enterococcus faecalis*, stool samples were collected from healthy 1-month-old infants and strains were cultured in MRS medium. A total of 64 *E. faecalis* strains were identified via 16S rRNA sequencing. Among them, 16 were selected for *in vitro* safety evaluation, and their hemolytic property, antibiotic sensitivity, and six virulence genes were determined. Based on the hemolysis results, the 16 strains of *E. faecalis* did not exhibit β -hemolysis. Further, the antibiotic sensitivity tests revealed that the strains were highly resistant to tetracycline (56.25%) and erythromycin (43.75%), followed by penicillin (37.50%) and ciprofloxacin (31.25%). No vancomycin- and teicoplanin-resistant strains were found. Eight relatively safe strains were identified based on the above experiments, and five virulence genes: *ace*, *asal*, *efaA*, *cylA*, and *gelE*, were subsequently determined, with $ace^+ efaA^+ gelE^+$ as the dominant mode. Finally, four candidate

引文格式:

桑微,李国花,赵馨,等.健康婴儿粪便中粪肠球菌的分离鉴定与体外安全性评价[J].现代食品科技,2024,40(3):83-90.

SANG Wei, LI Guohua, ZHAO Xin, et al. Isolation, identification, and *in vitro* safety evaluation of *Enterococcus faecalis* in the stool of healthy infants [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 83-90.

收稿日期: 2023-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31970115); 陕西省重点研发计划(2022NY-030)

作者简介: 桑微(1999-),女,硕士研究生,研究方向: 益生菌基础与应用, E-mail: sangwsust@163.com

通讯作者: 鲁曦(1983-),男,博士,副教授,研究方向: 益生菌资源开发与利用, E-mail: luxil126@163.com

strains of *E. faecalis*, namely LX29, LX31, LX41, and LX50, were acquired after comprehensive evaluation. Overall, our findings lay the foundation for subsequent functional research and product development.

Key words: *Enterococcus faecalis*; antibiotic resistance; virulence gene

肠球菌是广泛存在于自然界的一类乳酸菌，具有高 pH 和高盐耐受性，参与营养物质代谢，能产生细菌素抑制病原体生长，在食品发酵、防腐以及动物饲料等领域发挥重要作用^[1]；同时作为定殖于消化道的共生菌，具有调节人体和动物的免疫系统、维持肠道内稳态等功能，已被推荐作为益生菌食品添加剂和治疗肠道菌群失调及其它疾病的备选菌种^[2]。其中，粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*) 是肠球菌属模式种，为革兰氏阳性、兼性厌氧球菌，是健康人体肠道菌群的重要组成部分，在初生健康婴儿肠道中具有强定殖能力^[3]；作为一种潜在的益生菌，具有降低血清胆固醇、缓解炎症、抑癌及抗氧化等益生功效^[4]；也可与其它的益生菌联用，作为微生物制剂治疗肠道菌群失调导致的腹泻等疾病，目前已有多种含有粪肠球菌的产品上市^[5]；粪肠球菌的商业化菌株也投入使用，如以药物制剂形式生产的德国品牌 *E. faecalis* Symbioflor® 1 (SymbioPharm, Herborn, Germany) 用于慢性鼻窦炎或支气管炎治疗^[6]。

粪肠球菌是一种机会致病菌，在特殊情况下会引发心内膜炎、尿路感染、菌血症等疾病^[2,7]；且存在两类已知的安全性问题：一是抗生素耐药性：粪肠球菌对头孢类、氨基糖苷类等抗生素存在固有耐药性^[8]，同时其携带抗性基因可通过质粒、转座子等可移动原件在细菌间水平转移^[9]，引起细菌获得性耐药；二是含有潜在毒力因子：主要与宿主的黏附相关，当宿主肠道生态失衡或免疫缺陷时可能引发感染。目前发现的毒力因子主要包括细胞溶血素、明胶酶、肠球菌表面蛋白、聚集物质、胶原蛋白黏附素、心内膜炎抗原等^[10]。但目前对于粪肠球菌毒力因子是否致病存在一定争议，有研究表明上述部分“毒力因子”与粪肠球菌肠内定殖有关且并不导致疾病^[11,12]。虽然粪肠球菌具有多种益生功能，但在应用于产品开发之前需对菌株进行全面的安全性评估与筛选。Romyasamit 等^[13]从婴儿粪便中分离出的 6 株粪肠球菌对胃蛋白酶和胆盐均表现出强的耐受性，未发现毒力表型或携带可转移抗生素耐药基因，具有预防艰难梭状芽胞杆菌感染的应用前景。Wang 等^[14]从健康婴儿粪便中分离出一株无溶血和

明胶酶活性、对抗生素敏感的安全粪肠球菌，并具有较好的抗应激性和益生特性。

目前粪肠球菌的分离和筛选主要来源于动物、发酵食品和环境等，但是外源益生菌的生存环境与人体内肠道环境差距较大，人源益生菌更能适应体内环境，且菌株的来源与使用对象一致，可更好发挥其益生作用^[15]。本实验菌株是从纯母乳喂养的健康婴儿粪便中分离得到，来源可溯，安全性高，无代谢类疾病，受抗生素干预小，相较于外源益生菌，不易被人体肠道免疫系统所排斥，在肠道定植及功效体现方面更具潜在优势。由于安全性具有菌株特异性，本研究对健康婴儿粪便样本中粪肠球菌进行分离鉴定，并在体外进行安全性评价，筛选出安全菌株，可为后续深入研究提供对象，并为开发安全的益生菌产品提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂和仪器

1.1.1 实验材料

来自某母婴护理中心的 125 份健康婴儿粪便样本 (背景信息: 年龄 1 月内婴儿, 体质量 2.4~3.5 kg, 男婴比例 59%, 女婴 41%), 该研究通过空军军医大学唐都医院医学伦理委员会许可 (201903-29), 并获得被试者知情同意; 粪肠球菌标准菌株 (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212); 金黄色葡萄球菌标准菌株 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 为本实验室保存。

1.1.2 实验试剂

蛋白胨、酵母粉购于牛津有限责任公司; 牛肉粉购于北京博奥星生物技术有限责任公司; 脑心浸出液肉汤 (BHI)、Mueller-Hinton 琼脂购于青岛海博生物技术有限公司; GL DNA Marker 2000、琼脂糖凝胶、2×pro Taq Master mix, 购于艾科瑞生物工程技术有限公司; 哥伦比亚血琼脂平板购于北京陆桥技术股份有限公司; 药物敏感纸片购于常德比克曼生物科技有限公司。

1.1.3 实验仪器

XFH-40CA 电热式压力蒸汽灭菌器, 浙江新丰医

疗器械有限公司; DHG-303-4B 恒温培养箱, 浙江力辰仪器科技有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰技术有限公司; TGL-16M 高速冷冻台式离心机, 湖南湘仪仪器开发有限公司; TC1000-G PCR 梯度基因扩增仪, 大龙兴创实验仪器股份公司; BM2000 生物显微镜, 南京麦迪森仪器有限公司; WGZ-XT 细菌浊度仪, 杭州齐威仪器有限公司; 130130E 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; 2013C004-31 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离纯化

将存有粪便样品的拭子置于含 1 mL 生理盐水的离心管中, 充分涡旋制得均匀样品悬液; 从上述悬液中吸取 100 μ L 加入到 900 μ L 生理盐水中, 依次进行 10 倍系列稀释, 选取 10^4 、 10^5 、 10^6 稀释度的菌液各 100 μ L 涂布于 MRS 固体培养基 (15.0 g 琼脂, 10.0 g 蛋白胨, 20.0 g 葡萄糖, 5.0 g 牛肉粉, 2.0 g $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 4.0 g 酵母粉, 5.0 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, 2.0 g 柠檬酸三铵, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 1.0 mL 吐温 80, 1 000 mL 蒸馏水, pH 值 6.2 ± 0.2), $37^\circ C$ 厌氧孵育 24 h; 观察菌落形态、进行革兰氏染色并从每个平板上挑取 3 个可疑单菌落进行三次传代培养, 随后挑取纯化后的单菌落接种于 MRS 液体培养基, $37^\circ C$ 孵育 24 h, 取 1 mL 加入到 1 mL 20% 甘油管中混匀, $-80^\circ C$ 冻存备用。

1.2.2 菌株鉴定

1.2.2.1 16S rRNA 鉴定

DNA 模板的提取: 取分离纯化的液体培养物 1.0 mL, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 400 μ L 0.9% 的生理盐水, 涡旋混匀, $100^\circ C$ 金属浴 5 min, 随后 12 000 r/min 离心 3 min, 上清液即为所需 DNA 模板。

PCR 扩增: 反应体系 20 μ L, 组成为: 2 \times pro Taq Master mix 10 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'), DNA 模板 1 μ L, 无菌无酶水 7 μ L; PCR 扩增反应条件: $95^\circ C$ 预变性 2 min, $95^\circ C$ 变性 1 min, $55^\circ C$ 退火 30 s, $72^\circ C$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; $72^\circ C$ 再延伸 4 min^[16]。扩增得到的产物进行琼脂糖 ($m=0.8\%$) 凝胶电泳, 工作电压 150 V, 时间 20 min, 预计产物在 1.5 kb。PCR 扩增产物样本由生工公司进行测序。

1.2.2.2 构建系统发育树

登录 NCBI 官网, 将测序结果在数据库中进行

BLAST 分析, 并采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 确定种属间同源关系。

1.2.3 溶血实验

活化菌株: $-80^\circ C$ 冰箱取出冻存菌液, 待其恢复至室温后, 接种于 BHI 琼脂平板^[5], $37^\circ C$ 孵育 24 h; 挑取单菌落接种于哥伦比亚血平板, $37^\circ C$ 恒温孵育 24 h, 根据菌落周围颜色、形态判断溶血情况。结果判定: 以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为阳性参照菌株, 若菌落周围出现清晰的透明圈即判断为阳性。

1.2.4 药敏实验

采用纸片扩散法 (K-B 法) 对分离的 16 株粪肠球菌进行抗生素药物敏感试验。直接菌落法制备接种菌悬液: 从活化后的 BHI 平板上挑取 3~5 个形态一致的单菌落, 转移至 4 mL 灭菌生理盐水中, 充分涡旋, 浊度仪校正菌液浓度至 0.5 麦氏浓度 (约 1.5×10^8 CFU/mL); 无菌棉签蘸取菌悬液涂布于 MHA 平板 (42.0 g Mueller-Hinton 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水), 室温干燥 3~5 min, 用灭菌的镊子将抗菌药物纸片贴于平板, 并倒置于培养箱中 $37^\circ C$ 孵育 18 h; 根据抑菌圈直径进行药敏结果判断。本试验选择 7 种常见抗生素药物, 以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为质量控制菌株, 每组试验重复三次, 结果判断参考 CLSI M100《抗微生物药物敏感性试验的执行标准》2020 年版本标准^[17], 详见表 1。

表 1 药敏纸片判别标准

Table 1 Criteria for determination of drug sensitive paper

药敏纸片名称	纸片含药量	抑菌圈直径判断标准 /mm			金黄色葡萄球菌 ATCC25923
		敏感 (S)	中介 (I)	耐药 (R)	
红霉素	15 μ g	≥ 23	14~22	≤ 13	22~30
四环素	30 μ g	≥ 19	15~18	≤ 14	24~30
青霉素	10 U	≥ 15	—	≤ 14	26~37
万古霉素	30 μ g	≥ 17	15~16	≤ 14	17~21
替考拉宁	30 μ g	≥ 14	11~13	≤ 10	15~21
氟康唑	30 μ g	≥ 18	13~17	≤ 12	29~37
环丙沙星	5 μ g	≥ 21	16~20	≤ 15	22~30

1.2.5 毒力基因检测实验

引物设计: 根据 GenBank 上的目的基因序列, 采用在线设计软件 Primer-Blast 设计 6 种粪肠球菌的毒力基因 (*ace*、*asal*、*efaA*、*cylA*、*gelE*、*esp*) 检测引物, 引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列信息详见表 2。

表 2 引物序列相关信息

Table 2 Related information of primer

基因	毒力因子	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
<i>ace</i>	胶原结合蛋白黏附素	F: GAGGCAAGCGGCAATCAAAA R: TTTCTCTTGCGCCGTTCTCT	283
<i>asal</i>	聚集物质	F: GCCAACAGAAGTTGCACCAG R: TCAGCACCAGCCTTCTTTGT	813
<i>efaA</i>	心内膜炎抗原	F: AGGCGGAAATGGCTGGTTTA R: TGTCTTGACCGGCACTTGT	120
<i>cylA</i>	细胞溶血素	F: TGCAGGAGGATATGGTGACA R: AGCTGCGCTTACTTCTGGAG	175
<i>gelE</i>	明胶酶	F: CCCTGTGTTATCCGTTCCGT R: AAGATGCGTGGGGGATGAAG	482

模板 DNA 的制备方法详见 1.2.2, 粪肠球菌毒力基因 PCR 扩增的反应体系同 1.2.2, 反应条件: 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。

琼脂糖凝胶电泳: 用 50×TAE 电泳缓冲液配制不同浓度琼脂糖溶液 (*asal* 为 $m=0.5\%$ 、*ace* 和 *gelE* 为 $m=1.0\%$ 、*cylA* 和 *esp* 为 $m=1.2\%$ 、*efaA* 为 $m=1.5\%$), 加热煮沸至透明, 冷却至 70 °C 后, 加入 Goldview 核酸染料, 制得胶块; 吸取 5 μL 扩增产物点样, 电压值 150 V, 工作时间 20 min。以粪肠球菌 ATCC 29212 的基因组 DNA 作对照, 无菌无酶水为阴性对照。

1.2.6 菌株的生长曲线与产酸性能测定

将筛选出的粪肠球菌分别接种于含 MRS 液体培养基 (校正初始 pH 值 6.50) 的 96 孔板中, 37 °C 孵育 24 h, 酶标仪测定其生长过程的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值, 同时每隔 2 h 取样测定菌株 24 h 内的 pH 变化情况, 并绘制细菌生长曲线与产酸曲线。

1.3 数据处理

实验均为三次生物学重复, 采用 Excel 进行数据汇总, 数据表示为“均值 \pm 标准差”, 多组间均值比较采用方差分析, 采用 GraphPad Prism 8.0.2 分析绘图。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离与鉴定结果

来自于 125 例健康婴儿粪便样品, 稀释涂布后, 37 °C 厌氧培养, 可疑菌在 MRS 琼脂平板上为乳白

色、光滑球状菌落, 最终分离出 269 株革兰氏阳性菌; 对可疑菌进行 PCR 扩增, 产物经过 $m=0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳得到的目的片段大小约为 1 450 bp (图 1 为部分结果), 符合预期。

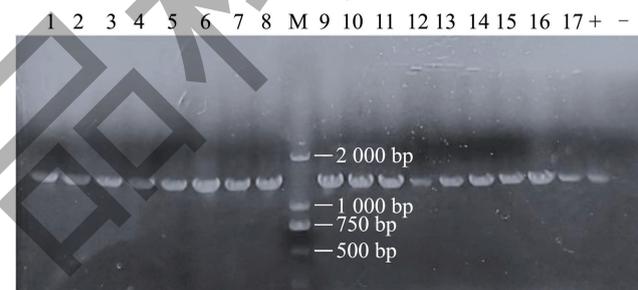


图 1 分离得到的部分菌株 16S rRNA 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 The agarose gel electrophoresis results of the 16S rRNA PCR amplification products

注: 1~17: 实验菌株; M: Marker DL2000; +: 粪肠球菌 ATCC 29212; -: 无菌无酶水。

2.2 系统发育树

分离菌株的测序结果在 NCBI 官网中进行 BLAST 比对, 共有 68 株菌初步判定为粪肠球菌; 本研究选择其中的 16 株菌株 (编号为: LX12、LX13、LX28、LX29、LX31、LX33、LX36、LX37、LX38、LX39、LX40、LX41、LX45、LX50、LX51、LX52) 进行进一步分析验证。16 株菌株与 GenBank 中粪肠球菌参考序列的同源关系在 96.01%~99.36%, 选择肠球菌科其它属的菌株 (*Enterococcus columbae*) 作为外群, 构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 其中 LX13 与 *E. faecalis* (MT597566.1) 亲缘关系最近, LX51 与 *E. faecalis* (ON778624.1) 亲缘关系最近。

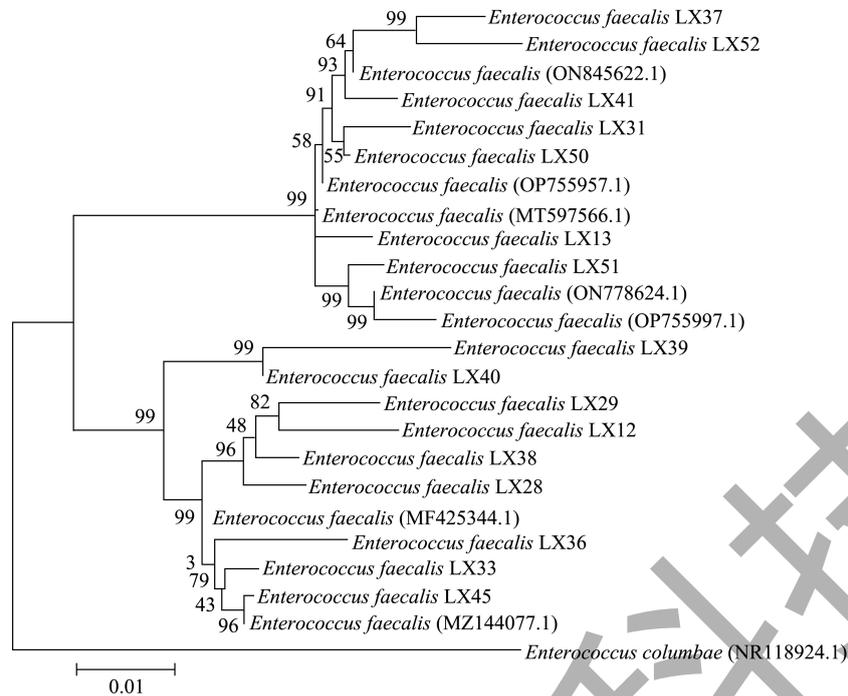


图2 菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of strain

2.3 溶血实验结果

肠球菌溶血素是一种与致病作用相关的外毒素，临床上约 60% 的肠球菌分离菌株会分泌此类毒素^[18]，另外 FAO/WHO《食品益生菌评价指南》指出若所用的益生菌所属菌种具有溶血活性，则应对被评估的菌株行溶血试验^[19]，因此粪肠球菌的溶血性检测是其体外安全性评价的重要环节之一。溶血实验结果如图 3 所示，阳性对照菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 周围出现浅黄色透明圈，为 β-溶血（图 3a，右），阴性对照菌株 *Enterococcus faecalis* ATCC29212 周围无透明圈与草绿色环，为 γ-溶血（图 3a，左）；16 株粪肠球菌均为 γ-溶血（图 3b~3e），说明 16 株菌均无溶血活性。

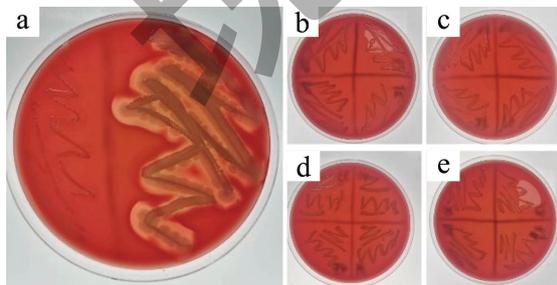


图3 溶血活性检测结果

Fig.3 Detection result of hemolysis test

2.4 药敏实验结果

粪肠球菌被认为是引起医院内感染的机会病原

体，致病因素之一就是对抗生素的耐药性，尤其是耐万古霉素肠球菌（Vancomycin Resistant Enterococcus, VRE），已在全球范围内的医院中造成影响^[6]。本研究选择 7 种抗生素进行细菌耐药性分析，实验结果如图 4（部分结果）和表 3 所示，16 株粪肠球菌对四环素、红霉素、青霉素、环丙沙星和氯霉素的耐药率分别为 56.25%、43.75%、37.50%、31.25%、12.50%；未发现对万古霉素和替考拉宁耐受菌株。16 株分离菌中多重耐药菌（Multidrug Resistance, MDR）占比 50.00%；3 耐及 3 耐以上有 5 株（LX12、LX36、LX38、LX40、LX45）；2 耐有 3 株（LX33、LX51、LX52）。

李金鑫等^[20]对健康犬来源的 32 株粪肠球菌进行药敏实验，发现菌株对四环素和红霉素的耐药率 > 50.00%，对氯霉素和青霉素也存在耐药现象，无 VRE 发现，MDR 占比 75.10%；Gołaś-Prądyńska 等^[21]从羊奶和奶酪中分离出 63 株粪肠球菌，结果发现有 63.00% 的菌株对四环素耐药，同时 MDR 占比 19.70%。先前研究表明，大多数分离的粪肠球菌对四环素和红霉素耐药率较高，同时存在多重耐药的情况，与本研究结果相似。综合溶血和药敏实验结果，可初步认定 8 株菌（LX13、LX28、LX29、LX31、LX37、LX39、LX41、LX50）为相对安全菌株，用于后续实验研究。

表 3 药敏实验结果及耐药性判断

Table 3 The results of drug susceptibility test and the judgment of drug resistance

菌株 编号	抑菌圈直径/mm						
	红霉素	四环素	青霉素	万古霉素	替考拉宁	氯霉素	环丙沙星
LX51	18.50±0.47(I)	6.00±0.00(R)	15.50±0.82(S)	18.00±0.00(S)	17.00±0.00(S)	12.00±0.00(R)	20.50±0.47(S)
LX28	10.33±0.47(R)	27.33±0.47(S)	15.00±0.94(S)	23.00±0.00(S)	18.50±0.47(S)	23.00±0.00(S)	20.50±0.47(S)
LX33	9.67±0.47(R)	27.33±0.47(S)	9.00±1.41(R)	21.50±0.47(S)	17.00±0.00(S)	23.00±0.47(S)	19.00±0.82(I)
LX40	11.00±0.00(R)	25.00±0.82(S)	6.00±0.00(R)	27.00±0.00(S)	21.00±0.94(S)	20.00±0.00(S)	6.00±0.00(R)
LX12	10.33±0.47(R)	27.00±0.82(S)	6.00±0.00(R)	25.50±0.47(S)	18.50±0.82(S)	20.50±0.47(S)	6.00±0.00(R)
LX31	24.50±0.50(S)	22.50±0.50(S)	17.50±0.50(S)	17.00±0.00(S)	16.00±0.00(S)	21.50±0.50(S)	18.50±0.50(I)
LX36	6.00±0.00(R)	6.00±0.00(R)	6.00±0.00(R)	20.00±0.00(S)	18.50±0.50(S)	20.50±0.50(S)	11.00±0.00(R)
LX37	20.50±0.50(I)	6.00±0.00(R)	18.00±0.00(S)	18.00±0.00(S)	19.00±0.00(S)	20.50±0.50(S)	21.50±0.50(S)
LX50	19.50±0.50(I)	6.00±0.00(R)	17.50±0.50(S)	17.50±0.50(S)	18.50±0.50(S)	17.50±0.50(I)	22.50±0.50(S)
LX38	6.00±0.00(R)	6.00±0.00(R)	6.00±0.00(R)	22.00±0.00(S)	21.50±0.50(S)	19.50±0.50(S)	12.00±0.00(R)
LX52	20.50±0.50(I)	6.00±0.00(R)	19.50±0.50(S)	17.00±1.00(S)	17.00±0.00(S)	6.00±0.00(R)	22.50±0.50(S)
LX45	15.50±0.50(I)	6.00±0.00(R)	6.00±0.00(R)	21.50±0.50(S)	17.50±0.50(S)	24.50±0.50(S)	6.00±0.00(R)
LX29	12.50±0.50(R)	27.50±0.50(S)	16.50±0.50(S)	21.00±0.00(S)	17.50±0.50(S)	25.00±0.00(S)	25.50±0.50(S)
LX13	22.50±0.50(I)	24.00±0.00(S)	18.00±0.00(S)	16.50±0.50(I)	16.00±0.00(S)	23.00±0.00(S)	17.50±0.50(I)
LX41	18.50±0.50(I)	8.00±0.00(R)	20.00±0.00(S)	18.50±0.50(S)	18.00±0.00(S)	22.50±0.50(S)	22.00±0.00(S)
LX39	14.50±0.50(I)	11.00±0.00(R)	18.50±0.50(S)	20.00±0.00(S)	17.50±0.50(S)	21.00±1.00(S)	16.50±0.50(I)

注：括号内为敏感程度，S 敏感，I 中介，R 耐药；质控菌 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 的抑菌圈直径在质控范围内。

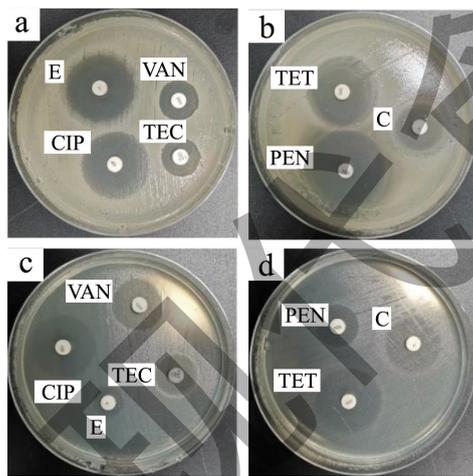


图 4 药敏实验结果

Fig.4 Detection result of antimicrobial susceptibility test

注：药敏纸片直径 6.00 mm。图 ab 测试菌株为金黄色葡萄球菌，图 cd 测试菌株为 LX29 E：红霉素，VAN：万古霉素，CIP：环丙沙星，TEC：替考拉宁，TET：四环素，C：氯霉素，PEN：青霉素。

2.5 毒力基因检测结果

毒力因子在肠球菌中普遍存在，是引发众多感染性疾病的主要原因之一。采用 PCR 法对前述 8 株粪肠球菌的胶原蛋白黏附素 (*ace*)、聚集物质

(*asal*)、心内膜炎抗原 (*efaA*)、细胞溶血素 (*cylA*)、明胶酶 (*gelE*) 和肠球菌表面蛋白 (*esp*) 等 6 种毒力基因片段进行扩增，8 株试验菌和对照菌检测出了 5 种毒力基因：*ace* (283 bp)、*asal* (813 bp)、*efaA* (120 bp)、*cylA* (175 bp)、*gelE* (482 bp)，扩增产物大小均符合预期。如表 4 所示，毒力基因在粪肠球菌中普遍存在，所有菌株至少存在 2 种毒力基因，以 *ace*⁺ *efaA*⁺ *gelE*⁺ 为主，存在 3 株 *cylA*⁺ 菌株 (LX28、LX37、LX39)，综合评价后选择含有毒力基因少的菌株 (LX29、LX31、LX41、LX50) 作为安全的候选菌株。

cylA 为溶血素激活基因，对红细胞具有毒性，而本研究中 3 株 *cylA*⁺ 菌在哥伦比亚血平板上未表现溶血活性，这与黎满香^[22]、马立艳等^[18]的报道的情况类似，存在基因型与表型不一致现象，说明溶血素基因可能在某些情况下处于基因沉默状态；*esp* 基因编码肠球菌表面蛋白，能逃避宿主免疫反应，本研究未检出该基因；*gelE* 基因编码明胶酶，能够水解明胶、胶原蛋白、酪蛋白、血红蛋白和其它多肽，是肠球菌中最常见的毒力因子^[23]，参与定植的毒力因子包括编码聚集物质的 *asal* 基因、几乎所有粪肠球菌都存在的心内膜炎特异性抗原 *efaA* 基因^[24] 以及编码胶原结合蛋白的 *ace* 基因，本研究的菌株

中 *gelE*、*asal*、*efaA* 和 *ace* 基因普遍存在, Mishra 等^[25]和 Cebrián 等^[26]筛选出的益生菌也同样携带相关基因, 并指出这些基因并非真正的毒力因素, 而与菌株的定植、粘附、生物膜形成等益生特性相关, 这点在 Popović 等^[11]对肠球菌毒力因子与益生特性关系研究中也得到了证实; 此外, 芮会会等^[27]分离的 2 株 *efaA*⁺ 粪肠球菌通过动物急性毒性试验考察后, 被认定为安全菌株。根据前人研究结果, 体外实验检测出毒力基因, 并非判断危险菌株唯一重要标准, 后续有必要对携带“毒力基因”的菌株通过动物实验进一步对其安全性进行综合评价。

表 4 毒力基因统计结果

Table 4 Statistics of virulence genes

毒力基因	菌株编号							
	LX13	LX28	LX29	LX31	LX37	LX39	LX41	LX50
<i>ace</i>	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>asal</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>efaA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cylA</i>	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>gelE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>esp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
合计	4	3	2	3	4	3	3	3

2.6 筛选菌株的生长曲线与产酸曲线

4 株筛选的粪肠球菌生长曲线如图 5 所示, 粪肠球菌 LX29、LX31、LX41、LX50 的生长趋势大体相似, 在 1~8 h 内处于对数生长期, 8 h 后趋于平缓, 进入稳定期, 其中菌株 LX29 的生长速率与进入稳定期后的菌体量显著高于另外 3 株菌; 从图 6 的产酸曲线可得出, 4 株粪肠球菌的产酸速率与生长趋势呈正相关, 对数生长期内的 pH 变化幅度较为明显, 14 h 后趋于稳定, 菌株 LX29 最终发酵液 pH 值接近 3.70, 另外 3 株菌的发酵液 pH 值接近 3.96。

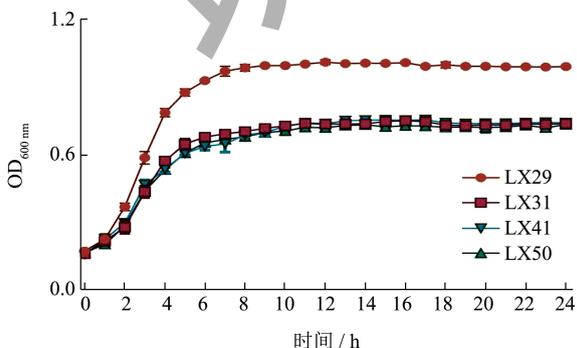


图 5 粪肠球菌的生长曲线

Fig.5 The growth curve of *Enterococcus faecalis*

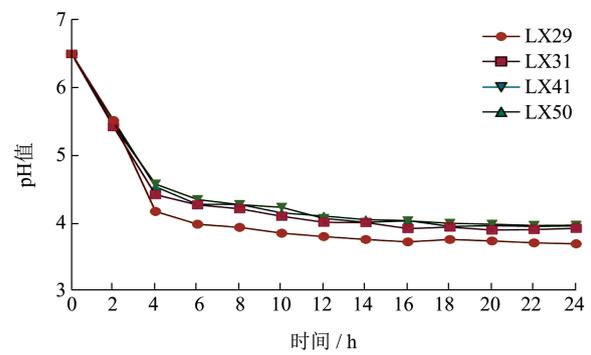


图 6 粪肠球菌的产酸曲线

Fig.6 The acid production curve of *Enterococcus faecalis*

上述结果表明, 4 株粪肠球菌几乎没有生长延迟期, 能迅速进入对数生长期, 8 h 之后达到最大菌体量, 因而可缩短发酵时间, 节约成本, 有利于益生菌的工业化生产; 菌株生长速率可反映出其对培养基中碳氮源等营养物质的利用情况, 本实验中菌株 LX29 能充分利用 MRS 培养基的营养物质, 繁殖能力强, 此外菌株间的生长特性存在差异, 菌株 LX31、LX41 和 LX50 可通过后续对其发酵培养基进行优化, 以期达到高密度培养的目标。粪肠球菌为兼性厌氧乳酸菌, 可进行发酵代谢, 形成酸性厌氧环境, 抑制病原菌生长, 同时促进有益乳酸菌的存活; 本研究中的 4 株菌的发酵液 pH 值在 14 h 内从 6.50 降到 4.00 左右, 产酸速率较快, 在食品发酵方面具有一定潜力。

3 结论

粪肠球菌由于具有诸多益生功效被广泛应用于食品、饲料、医药等领域。本研究从 125 例健康婴儿粪便样本中分离鉴定出 68 株粪肠球菌, 对其中 16 株菌进行体外安全性的初步评价。溶血实验结果发现 16 株菌在血平皿上未表现出溶血活性; 药敏实验结果显示所有菌株对红霉素 (56.25%) 和四环素 (43.75%) 耐药率较高, 未发现耐万古霉素肠球菌, 最终筛选出 8 株对常见抗生素敏感的菌株; 随后对这 8 株粪肠球菌进行毒力基因检测, 共检出 5 种毒力基因: *ace*、*asal*、*efaA*、*cylA*、*gelE*, 值得注意的是除危害较大的 *cylA* 基因外, 其余毒力基因携带菌株的安全性有待进一步研究; 综合评价后最终筛选出 4 株无溶血活性、对抗生素敏感以及含毒力基因少的菌株 (LX29、LX31、LX41、LX50), 为该菌株的后续的体内安全性评价、功能研究以及产品开发提供菌种资源。

参考文献

- [1] HANCHI H, MOTTAWEA W, SEBEI K, et al. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-An update [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1791.
- [2] KRAWCZYK B, WITYK P, GAŁĘCKA M, et al. The many faces of *Enterococcus* spp.-commensal, probiotic and opportunistic pathogen [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1900.
- [3] AL-BALAWI M, MORSY F M. *Enterococcus faecalis* is a better competitor than other lactic acid bacteria in the initial colonization of colon of healthy newborn babies at first week of their life [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2017.
- [4] 周晓莉.粪肠球菌EF-ZA1107-06的益生性及高密度培养的研究[D].广州:华南理工大学,2021.
- [5] 张芬.婴儿源肠球菌的安全性评价及其体内外降胆固醇的益生功能和机制探究[D].南昌:南昌大学,2017.
- [6] FRANZ C M A P, HUCH M, ABRIOUEL H, et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(2): 125-140.
- [7] KIM Y, CHOI S-I, JEONG Y, et al. Evaluation of safety and probiotic potential of *Enterococcus faecalis* MG5206 and *Enterococcus faecium* MG5232 isolated from Kimchi, a Korean fermented cabbage [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2070.
- [8] GARCÍA-SOLACHE M, RICE L B. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00058-18.
- [9] 杨雨桐,杨晓波,王尚,等.信息素调控质粒介导的粪肠球菌耐药基因接合转移机制研究进展[J].*生态毒理学报*, 2021,16(5):160-167.
- [10] GRAHAM K, STACK H, REA R. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococci* for use in functional food applications-A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(22): 3836-3861.
- [11] POPOVIĆ N, DINIĆ M, TOLINAČKI M, et al. New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* spp. dairy isolates [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 78.
- [12] VELJOVIĆ K, POPOVIĆ N, MILJKOVIĆ M, et al. Novel aggregation promoting factor *aggE* contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGGO9-28 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1843.
- [13] ROMYASAMIT C, THATRIMONTRICHAI A, AROONKESORN A, et al. *Enterococcus faecalis* isolated from infant feces inhibits toxigenic clostridioides (clostridium) *difficile* [J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2020, 8: 572633.
- [14] WANG J, DA R, TUO X, et al. Probiotic and safety properties screening of *Enterococcus faecalis* from healthy Chinese infants [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, 12 (3): 1115-1125.
- [15] DAVOODABADI A, SOLTAN DALLAL M M, RAHIMI FOROUSHANI A, et al. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria [J]. *Anaerobe*, 2015, 34: 53-58.
- [16] 鲁曦,马雨哲,李国花,等.健康婴儿粪便样本中罗伊氏乳杆菌的分离鉴定与体外益生特性初步研究[J].*陕西科技大学学报*,2022,40(3):59-65.
- [17] 美国临床实验室标准化协会.抗菌药物敏感性实验执行标准M100(第30版)[S].
- [18] 马立艳,许淑珍,马纪平.肠球菌溶血素*cyI*基因原始、株、变异株在小鼠腹膜炎中的毒力差异[J].*中华检验医学杂志*,2005(5):529-532.
- [19] 吴蜀豫,冉陆. FAO/WHO《食品益生菌评价指南》[J].*中国食品卫生杂志*,2003,15(4):377-379.
- [20] 李金鑫,高一丁,娄银莹,等.北京地区腹泻犬、健康犬粪便粪肠球菌耐药性、毒力基因及多位点序列分型研究[J].*中国兽医杂志*,2020,56(5):11-15,133.
- [21] GOŁAŚ-PRĄDZYŃSKA M, ŁUSZCZYŃSKA M, ROLA J G. Dairy products: A potential source of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains [J]. *Foods*, 2022, 11 (24): 4116.
- [22] 黎满香.感染猪的粪肠球菌的分离鉴定及部分特性和诊断方法研究[D].长沙:湖南农业大学,2010.
- [23] DANIEL D S, LEE S M, GAN H M, et al. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia [J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2017, 10(5): 617-623.
- [24] Mariam S H. A sampling survey of enterococci within pasteurized, fermented dairy products and their virulence and antibiotic resistance properties [J]. *Plos One*, 2021, 16(7): e0254390.
- [25] MISHRA A K, GHOSH A R. 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.
- [26] CEBRIÁN R, BAÑOS A, VALDIVIA E, et al. Characterization of functional, safety and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain [J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(1): 59-67.
- [27] 芮会会.神农架金丝猴源肠道益生菌的筛选和鉴定[D].武汉:华中农业大学,2014.