

乳酸菌益生菌表面粘附能力的检测

Detection of Surface Adhesion Ability of Lactic Acid Bacteria

李琴心¹, 陈雨薇¹, 齐益宁¹, 尹佳^{1*}

¹ 动物肠道功能调控湖南省重点实验室, 生命科学学院, 湖南师范大学, 长沙, 湖南省

*通讯作者邮箱: jiayin@hunnu.edu.cn

摘要: 乳酸菌定植在人类胃肠道的过程中, 第一步是细菌对宿主组织的粘附。细胞疏水性决定了细菌粘附能力, 这是益生菌能否在动物肠道繁殖的关键。此外, 细菌的自聚集能力对细菌与肠道细胞的粘附有重要影响, 而共聚集通过防止病原体附着在宿主组织上来消除胃肠道病原菌的定植。本文介绍了如何在体外通过疏水和凝集实验初步检测乳酸菌的表面粘附能力。

关键词: 乳酸菌, 疏水性, 凝集能力, 体外

材料与试剂

1. 离心管 (1.5 ml, 5 ml)
2. 记号笔
3. 胰蛋白胨 (生工, A505250)
4. 酵母提取物 (生工, A515245)
5. 氯化钠 (上海沪试)
6. 琼脂 (生工, A505255)
7. LB 肉汤培养基 (生工, A507002)
8. MRS 肉汤培养基 (赛默飞, CM1175)
9. 十二烷 (国药, TD096801)
10. 二甲苯 (国药, 10023418)
11. 氯仿 (国药, 10006818)
12. PBS 缓冲液 (国药, HYSH3025601)
13. LB 固体培养基 (见溶液配方)
14. MRS 固体培养基 (见溶液配方)

31 15. LB 液体培养基 (见溶液配方)

32 16. MRS 液体培养基 (见溶液配方)

33

34 仪器设备

35 1. 量筒

36 2. 玻璃棒

37 3. 离心机 (艾本德 5424)

38 4. 紫外分光光度计 (北京普析)

39 5. 90 mm 塑料培养皿 (biosharp, BS-90-D)

40 6. 纯水制备仪 (ELGA PURELAB 系列)

41 7. 移液枪

42 8. 吸头 (生工, F601227)

43 9. 烘箱 (天津泰斯特 101-0AB 型电热鼓风干燥箱)

44 10. 厌氧培养箱 (Whitley, DG250)

45 11. 超净工作台 (天津泰斯特, CJ-2D)

46 12. 接种环 (生工, F619312)

47 13. 高压灭菌锅 (上海庆开, GI54TW)

48 14. 冰箱 (美菱)

49 15. 摇床 (Eppendorf ThermoMixer C 恒温混匀仪)

50

51 软件

52 1. Excel

53

54 实验步骤

55 1. 制备一定浓度的乳酸菌悬液

56 1.1 菌的复苏

57 将菌保从 - 80 °C 冰箱取出置于冰上, 用接种环以平板划线的方式将菌种接种到
58 MRS 固体培养基, 37 °C 恒温箱倒置培养过夜。

59 注: 菌保拿出后要及时放回去, 以免损失菌的活性。

1.2 接种

用灭菌的枪头或牙签挑取平板上由单个菌生长成的单菌落，置于装有 1 ml MRS 培养基的 1.5 ml 或者 2.0 ml 的微型离心管里，混匀并标记。将离心管置于 37 °C，摇床培养 18 h。

1.3 菌种活化

取 100 µl 培养 18 h 的菌液转移至另一个含 900 µL MRS 液体培养基的微型离心管中继续培养 18 h，重复此操作两次。目的是提高乳酸菌活性。

1.4 扩大培养

将在微型离心管中培养的菌液转入装有 50 ml MRS 液体培养基的灭菌小锥形瓶中，37 °C 培养箱培养 18 h。

注：以上过程都要在超净工作台上进行，需要严格无菌操作。

1.5 离心

将培养了 18 h 的乳酸菌菌液以 3,000 g 的速度离心 10 分钟，弃去上清液。

1.6 洗涤

加入等量灭菌后的 PBS 缓冲液，重悬混匀，以 3,000 g 的速度离心 10 min，重复此步骤 2-3 次。加入少量 PBS 缓冲液并重悬混匀。

1.7 调节浓度

以一定比例将乳酸菌菌液与 PBS 缓冲液混合，使混合溶液在 600 nm 的波长下 OD 值在 0.8 左右，记为 A_0 。

2. 测定细胞疏水性

2.1 将 1 ml 的疏水剂 (十二烷、二甲苯或氯仿等) 分别加入到 3 ml 的乳酸菌悬液中，充分混匀。每种疏水剂至少设立三个平行组。

2.2 室温下静置 20 min，使有机相和水相分离。

2.3 去除有机相，以 PBS 缓冲液为对照在 600 nm 下测定水相的 OD 值，记为 A_t 。

2.4 重复实验至少三次并计算。Hydrophobicity (%) = $[(A_0 - A_t) / A_0] \times 100\%$ ；(疏水性分为低：0~29%、中：30%~59%和高：60~100%) (Niederle. *et al.*, 2019)

3. 测定细胞自凝集能力

取 4 ml 调节浓度后的乳酸菌悬液充分混匀，室温孵育 5 h。吸取 1 ml 菌悬液，以 PBS 缓冲液作为对照在 600 nm 下测定 OD 值，记为 A_t 。

实验重复三次并计算: $\text{Auto-aggregation (\%)} = 1 - A_t / A_0 \times 100\%$ (Del Re. *et al.*, 2000)

注: 孵育 5 h 后取菌悬液时, 取表面菌液, 禁止吹打, 保持菌液静止。

4. 测定细胞共凝集能力

4.1 制备病原菌的菌悬液

1) 将病原菌 (如 *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* ATCC 14028, 和 *L. monocytogenes* ATCC 19113) 在 LB 液体培养基中 37 °C 培养 18 h。

2) 离心

将培养了 18 h 的菌液以 3,000 g 的速度离心十分钟, 弃去上清液。

3) 洗涤

加入等量灭菌后的 PBS 缓冲液, 重悬混匀, 3,000 g 离心 10 min, 重复此步骤 2-3 次。加入少量 PBS 缓冲液并重悬混匀。

4) 调节浓度

以一定比例将菌液与 PBS 缓冲液混合, 使混合溶液在 600 nm 的波长下 OD 值在 0.8 左右, 记为 A_0 。

4.2 将各乳酸菌悬浮液和致病菌悬浮液等体积 (2 ml) 混合, 在室温下静置孵育 5 h。

在相同生长条件下培养含 4 ml 单菌悬液的对照组, 在 600 nm 下测定 OD 值。

实验重复三次并计算: $\text{Co-aggregation (\%)} = [(A_x + A_y) / 2 - A_{(x+y)}] / (A_x + A_y) \times 100\%$; (A_x 和 A_y 代表两个细菌悬液的吸光度, $A_{(x+y)}$ 意味着混合细菌悬液的吸光度。) (Xu. *et al.*, 2009)

结果与分析

1. 疏水

表 1.4 株乳酸菌疏水性质的检测 (Chen. *et al.*, 2020)

菌株名	疏水剂		
	十二烷	氯仿	二甲苯
HSM-1	97.8±0.6% ^a	82.5±5.5% ^b	92.6±1.2% ^a
HSM-10	97.9±1.4% ^a	84.5±4.0% ^b	94.6±1.0% ^a
HSM-14	97.1±0.7% ^a	75.0±7.1% ^b	93.4±1.5% ^a
HSM-18	86.8±3.8% ^b	97.1±0.7% ^a	84.8±1.9% ^b

注：数据为平均数±标准差 (n = 3) ， 同一行内不同上标字母的均值差异有统计学意义 (p < 0.05)。

细胞疏水性是益生菌通过清除肠道病原体，粘附肠道上皮细胞，定植胃肠道发挥益生菌有益作用的前提。疏水性分析表明，四株菌株均具有高疏水性 (表 1) 。 HSM-1, HSM-10 和 HSM-14 在十二烷和二甲苯的疏水性高于在氯仿中，但在氯仿中 HSM-18 的疏水性 (97.1±0.7%) 高于十二烷 (86.8±3.8%) 和二甲苯 (84.8±1.9%) 。因此，实验表明四株菌株均具有高疏水性，其中 HSM-10 具有最高的疏水性。

2. 自凝集和与病原菌的共凝集

表 2.4 株乳酸菌自凝集与共凝集性质的检测 (Chen. et al., 2020)

菌株名	自凝集与共凝集			
	自凝集	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	李斯特菌
HSM-1	59.9±4.9% ^a	52.0±14.9% ^a	17.1±6.3% ^a	25.2±3.8% ^{ab}
HSM-10	63.5±13.1% ^a	35.7±2.3% ^a	16.2±4.2% ^a	37.6±8.1% ^{ab}
HSM-14	16.5±4.1% ^b	51.1±13.1% ^a	28.0±3.0% ^a	38.1±12.7% ^a
HSM-18	23.7±2.3% ^b	52.1±2.9% ^a	14.5±4.7% ^a	22.7±5.0% ^b

注：数据为平均数±标准差 (n = 3) ， 同一行内不同上标字母的均值差异有统计学意义 (p < 0.05) 。

潜在的益生菌应具有在肠道定植和阻止致病菌的定植的能力。细胞的自聚集能力对肠细胞的粘附和避免病原体的定植做出了重要贡献。而细菌的共聚集能力通过阻止它们粘附宿主组织来消除胃肠道病原体。

在 4 株检测的乳酸菌菌株中，HSM-1 和 HSM-10 的自凝集能力最好，分别为 59.9±4.9%和 63.5±13.1% (表 2) 。相对而言 HSM-14 和 HSM-18 的自凝集能力较低 (分别为 16.5±4.1%和 23.7±2.3%) 。

四株菌株对金黄色葡萄球菌均表现出较高的共凝集能力 (分别为 52.0±14.9%，35.7±2.3%，51.1±13.1%，52.1±2.9%) 。HSM-10 和 HSM-14 对李斯特菌具有高共凝集能力，其次是 HSM-1 和 HSM-18。而对于沙门氏菌，只有 HSM-14 表现出高的共凝集能力。

HSM-1、HSM-10、HSM-18 与金黄色葡萄球菌的共聚集均超过 50%，效果优于鼠伤寒和单核增生 L。

溶液配方

1. LB 固体培养基 1,000 ml

序号	试剂	质量/体积
1	LB培养基粉末	25 g
2	琼脂粉	12.5 g

2. MRS 固体培养基 1,000 ml

序号	试剂	质量/体积
1	MRS培养基粉末	52 g
2	琼脂粉	14.4 g

3. LB 液体培养基 1,000 ml

序号	试剂	质量/体积
1	LB培养基粉末	25 g

4. MRS 液体培养基 1,000 ml

序号	试剂	质量/体积
1	MRS培养基粉末	52 g

MRS 培养基灭菌温度为 115 °C、20 min，LB 培养基、锥形瓶等灭菌温度为 120 °C、20 min。

致谢

感谢国家自然科学基金青年项目 (31700004)，全国大学生平台创新和创业培训项目 (S202010542046)，湖南省科技厅创新人才与平台计划 (2019RS5001)，湖南创新型省份建设专项经费 (2019RS3022) 的支持。

参考文献

- Chen, T., Wang, L., Li, Q., Long, Y., Lin, Y., Yin, J., Zeng, Y., Huang, L., Yao, T., Abbasi, M. N., Yang, H., Wang, Q., Tang, C., Khan, T. A., Liu, Q., Yin, J., Tu, Q., & Yin, Y. (2020). [Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk.](#) *BMC microbiology*, 20(1), 228.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). [Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum.](#) *Letters in applied microbiology*, 31(6), 438–442.
- Niederle, M. V., Bosch, J., Ale, C. E., Nader-Macías, M. E., Aristimuño Ficooseco, C., Toledo, L. F., Valenzuela-Sánchez, A., Soto-Azat, C., & Pasteris, S. E. (2019). [Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of Batrachochytrium dendrobatidis.](#) *PloS one*, 14(9), e0223020.
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., & Ahn, J. (2009). [Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains.](#) *Letters in applied microbiology*, 49 (4), 434–442.