

网络出版时间:2017-03-07 11:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.04.004

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170307.1116.008.html>

獭兔肠黏膜乳杆菌的分离鉴定及其体外益生特性研究

李 晶, 沈雪梅, 刘丽慧, 胡如久, 崔宏晓, 姚军虎, 徐秀容

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】分离筛选适于在獭兔肠道中存活并定殖的高黏附性乳酸菌株。【方法】通过乳酸菌选择性培养基从 5 和 10 日龄哺乳獭兔肠黏膜中分离具有抑制大肠杆菌活性的菌株,经 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定,并检测其耐人工胃液、耐胆盐及黏附特性、表面疏水性等益生特性。【结果】分离筛选出 3 株具有较强抑制大肠杆菌活性的菌株,分别鉴定为短乳杆菌(L1)、植物乳杆菌(L2)、干酪乳杆菌(L3),其抑菌活性大小为 $L3 > L2 > L1$ 。3 株菌株均能耐受 $\text{pH}=4.0$ 的人工胃液;在 $\text{pH}=3.0$ 人工胃液中,L2 和 L3 的活菌含量未出现明显变化($P > 0.05$),而 L1 的活菌含量显著下降($P < 0.05$);3 株菌株在 $\text{pH}=2.0$ 和 $\text{pH}=1.8$ 人工胃液中的活菌含量均显著降低($P < 0.01$)。L1 和 L2 均能耐受 2.0 g/L 胆盐;虽然 L1 和 L2 在 3.0 g/L 胆盐中的活菌量出现极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$)下降,但二者仍保留较高活菌含量;胆盐对 L3 的存活有明显抑制作用,随着胆盐含量的升高,L3 的活菌含量极显著降低($P < 0.01$)。L2 和 L3 对黏蛋白的黏附率无显著差异($P > 0.05$),均显著高于 L1($P < 0.05$)。L3 的表面疏水性最高,L2 次之,二者之间无显著差异($P > 0.05$);L1 的表面疏水性低于 L2($P = 0.092$),显著低于 L3($P < 0.05$)。【结论】分离所获得的 3 株乳杆菌均具备益生菌特性,其中以植物乳杆菌 L2 最佳。

【关键词】 乳杆菌;人工胃液;胆盐;獭兔

【中图分类号】 S816.73

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2017)04-0024-07

Identification and *in vitro* probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from small intestinal mucosa of Rex rabbit

LI Jing, SHEN Xuemei, LIU Lihui, HU Rujiu, CUI Hongxiao, YAO Junhu, XU Xiurong

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed at isolating and screening *Lactobacillus* strains with high adhesion rate from intestinal tracts of Rex rabbit. 【Method】 *Lactobacillus* strains that could inhibit *Escherichia coli* were isolated and screened from small intestinal mucosa of 5 and 10 day-old Rex rabbits using *Lactobacillus* selective medium. They were identified by 16S rRNA sequence analysis, and the probiotic properties including tolerances to artificial gastric juice and bile salts, adhesion rates to small intestinal mucin, and hydrophobicity were evaluated. 【Results】 Three *Lactobacillus* strains that could inhibit *E. coli* K88 were isolated and screened, and were identified as *Lactobacillus brevis* (L1), *Lactobacillus plantarum* (L2) and *Lactobacillus casei* (L3). Their antimicrobial properties were in the order of $L3 > L2 > L1$. The three strains showed great resistance to simulated gastric juice with pH of 4.0. In the simulated gastric juice with pH of 3.0, the viable counts of L2 and L3 appeared insignificant changes ($P > 0.05$), while that of L1 dropped significantly ($P < 0.05$). The viable counts of all strains decreased extremely significantly ($P <$

【收稿日期】 2016-01-21

【基金项目】 陕西省科技攻关项目“家兔特定益生菌开发及益生菌分阶段添加技术研究”(2013K02-18)

【作者简介】 李 晶(1991—),女,甘肃庆阳人,在读硕士,主要从事动物肠道健康研究。E-mail:jljyy_09116@163.com

【通信作者】 徐秀容(1969—),女,湖北英山人,副教授,硕士生导师,主要从事动物肠道健康研究。

E-mail: xuxiurong@nwsuaf.edu.cn

0.01) when pH decreased to 2.0 and 1.8. L1 and L2 showed great resistance to 2.0 g/L bile salt. Although the viable counts of L1 and L2 showed extremely significant ($P<0.01$) and significant ($P<0.05$) reduction in 3.0 g/L bile salt, both of them remained high viable bacterium counts. Bile salts showed inhibitory effect against L2. The viable counts of L3 reduced extremely significantly ($P<0.01$) with the increase of bile salts content. There were no significant differences between adhesion rates of L2 and L3 ($P>0.05$), and adhesion rates of L2 and L3 were significantly higher than that of L1 ($P<0.05$). L3 showed the highest hydrophobicity, followed by L2 without significant difference ($P>0.05$). L1 had significantly lower hydrophobicity than the other two strains ($P<0.05$).【Conclusion】All the three obtained strains had probiotic properties and L2 was the best.

Key words: *Lactobacillus*; simulated gastric juice; bile; Rex rabbit

由于免疫系统和消化系统发育不完善,断奶仔兔很容易发生腹泻并导致死亡^[1]。研究认为,部分有益菌在动物肠道的定殖尤其是早期的定殖,可促进肠道免疫系统和消化系统的发育^[2],且这种促进作用具有持久性^[3]。因此,研究和开发对兔肠道系统早期发育有促进作用的益生菌,将为兔消化道疾病的预防提供新思路。在猪等单胃动物的研究中证实,乳杆菌能够降低肠道 pH 值,拮抗致病菌,增强机体免疫力,是最具有代表性的益生菌^[4]。与其他单胃动物不同,乳酸菌不是成年兔肠道中的优势菌,但研究发现,幼龄兔肠道中乳酸菌的比例较大且随年龄的增长而降低^[5]。但目前鲜有关于幼龄兔肠道乳酸菌及其对兔肠道免疫、消化系统发育是否具有促进作用的研究报道。乳杆菌在动物肠道中的定殖能力与菌株来源有很大关系^[6]。Kelly 等^[7]研究表明,同源性乳杆菌对宿主的益生效果优于异源菌株。而且,理想的益生菌种还应该具有良好的黏附定殖能力^[8]。因此,对兔源乳杆菌的黏附性能进行评价和筛选,是研究其在幼兔肠道内益生效果的重要内容和前提。目前,国内外已研制出多种猪、禽用乳杆菌益生菌剂,但还没有幼兔乳杆菌分离及黏附性能评价等的研究报道。本试验从幼龄獭兔肠道黏膜中分离出能够在獭兔肠道中存活并定殖的乳杆菌,并在体外研究其益生特性,筛选出高效定殖的兔源乳杆菌,为进一步研究其对獭兔肠道免疫及消化系统发育的促进作用以及后续开发利用提供研究材料。

1 材料与方法

1.1 试验动物、菌株及培养基

试验动物为 2 只 5 日龄和 4 只 10 日龄健康獭兔,由陕西杨凌天鑫养兔场提供。病原指示菌为大肠杆菌 K88 (*Escherichia coli* IVDCC83901),购自中国兽医微生物保藏中心。MRS 液体培养基、

MRS 平板培养基、肉汤培养基,参照董晓丽等^[9]的方法配制。

1.2 菌株的分离

将供试獭兔屠宰后,用无菌载玻片轻轻刮取其小肠黏膜,静置 5 min 后取上清与无菌生理盐水倍比稀释成 10^{-2} , 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释液,取各稀释液 100 μL 均匀涂布于 MRS 平板培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 48 h。无菌挑取含有融钙圈且形态、大小、颜色、光泽、透明度各异的疑似乳酸菌单菌落,接种于 MRS 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养过夜,然后用接种环进行 MRS 固体划线培养 24 h。重复上述步骤 4 次以获得纯菌落,革兰氏染色、镜检。选取革兰氏阳性的单菌落,接种至 MRS 斜面培养基,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 分离菌株的抑菌活性检测

采用琼脂扩散法筛选具有抑菌活力的菌株。取 20 μL (细菌含量为 10^8 CFU/mL) 新鲜大肠杆菌 K88 悬液,加入 20 mL 含有琼脂的肉汤培养基,混匀倒入培养皿,室温下静置 15 min 使其凝固。在培养基表面挖直径为 6 mm 的孔,再用 1 滴未凝固的肉汤琼脂培养基封底。取 80 μL 分离菌株培养上清液加入孔内,无菌静置 2 h,以使上清液扩散到琼脂内部,37 $^{\circ}\text{C}$ 有氧培养 18 h。用 MRS 液体培养基作阴性对照(CK),筛选出具有抑菌活性的菌株,并通过观察抑菌圈的大小比较菌株的抑菌活性。

1.4 分离菌株的分子生物学鉴定与系统发育树构建

采用菌落 PCR 法扩增 16S rRNA 基因,引物为原核生物 16S rRNA 基因通用引物:27F. 5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R. 5'-TACCTT-GTTACGACTT-3',引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 反应体系:2 $\times$ Mix 12.5 μL , DNA 模板(单菌落)1 μL ,上游引物 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),下游引物 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),ddH₂O 10.5 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95

℃ 30 s, 55 ℃ 90 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 2 min; 4 ℃ 保存。试验设空白对照, 以 ddH₂O 代替模板进行扩增。PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Axygen 核酸纯化试剂盒纯化回收, 送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

将 16S rRNA 基因测序结果提交到 GenBank, 使用 Blast 程序与 GenBank 数据库中的乳酸菌 16S rRNA 序列进行同源性比较和菌种鉴定。用 MEGA 5.10 软件分析所测菌株序列和其他与乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 同源性较高菌种的 16S rRNA 基因序列, 构建系统发育树。

1.5 分离菌株对人工胃液和胆盐的耐受性检测

分离菌株的人工胃液 (SES) 耐受性检测参考 García-Ruiz 等^[10]的方法进行。取细菌含量为 10⁸ ~ 10⁹ CFU/mL 的各菌株新鲜悬浮液与含 6 g/L 胃蛋白酶的无菌电解质溶液 (0.44 g/L CaCl₂, 12.4 g/L NaCl, 4.4 g/L KCl, 2.4 g/L NaHCO₃) 等体积混合。为模拟菌株从食管入胃的环境特点, 各菌株每培养 20 min 后立即用 1 mol/L HCl 调整混合培养液的 pH 值, 由起始 pH=6.2 逐步降低为 5.0, 4.0, 3.0, 2.0; 最后调整混合培养液 pH 值为 1.8, 培养 30 min。分别在培养 20, 40, 60, 80, 100 和 130 min 采集各菌株培养液, 用平板计数法测定各菌株在连续不同 pH 值培养条件下的活菌含量。

将各分离菌株的新鲜悬浮液 (菌含量为 10⁸ ~ 10⁹ CFU/mL) 分别接种到胆盐含量为 0.0 (CK), 2.0, 3.0 和 5.0 g/L 的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧培养 24 h 后采集各菌株的培养液, 用平板计数法测定各菌株在不同胆盐含量下的活菌含量。

1.6 分离菌株的黏附特性评价

肠黏液黏蛋白模型是评价益生菌黏附能力的常用试验模型之一^[11-12]。本研究采用荧光标记法测定所获得菌株及大肠杆菌的黏附能力。采用异硫氰酸荧光素法标记菌株, 参照 Dogi 等^[13]的方法进行。

黏液蛋白的制备: 黏液来自 3 只健康 10 日龄獭兔小肠, 参照 Carasi 等^[11]的方法制备。用考马斯亮蓝法测定黏蛋白含量, 用 50 mmol/L、pH=9.7 的 Na₂CO₃ 溶液调整黏蛋白质量浓度为 1 mg/mL, -20 ℃ 保存备用。

黏附试验: 参照 Carasi 等^[11]和 Valeriano 等^[12]的方法并加以改进。黏液 4 ℃ 解冻后, 加入 96 孔全黑微量滴定板, 每孔 100 μL, 4 ℃ 静置过夜; 再次添加黏液 37 ℃ 孵育 2 h, 用 200 μL 无菌 PBS 缓冲液洗涤每孔 4 次, 除去未固定黏蛋白; 每孔加 200 μL

荧光标记的菌悬液 (10⁸ CFU/mL), 用多功能微孔板检测仪测定初始菌悬液的荧光强度, 然后 37 ℃ 孵育 2 h; 洗弃多菌液, 用无菌 PBS 缓冲液洗涤 6 次以除去未黏附的菌; 每孔加 200 μL 100 g/L SDS, 60 ℃ 处理 1 h, 测定荧光强度。荧光检测条件: 激发波长 485 nm, 发射波长 528 nm, 狭缝宽 2.5 nm。黏附率按如下公式计算:

黏附率 = $\frac{\text{黏附菌株的荧光强度}}{\text{初始菌株的荧光强度}} \times 100\%$ 。

1.7 分离菌株的表面疏水性测定

采用微生物黏着碳烃化合物法评价菌株表面疏水性。菌株于 37 ℃ 厌氧培养 24 h, 菌液 5 000 g 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体沉淀。菌体用灭菌 PBS (pH 7.2) 溶液洗涤 3 次后重悬, 调整菌悬液的吸光度 OD₆₀₀=0.4±0.02 (A₀)。取菌悬液 3 mL 和 1 mL 二甲苯混合, 漩涡振荡 1 min 后静置 20 min (此时形成两相体系)。小心吸取水相, 检测其在 600 nm 下的吸光度 (A₁)。细胞表面疏水性按下式计算:

表面疏水性 = $(1 - A_1/A_0) \times 100\%$ 。

1.8 统计分析

试验数据均为 3 个平行的平均值 (每个平行测定 3 次), 表中数据均以“平均值±标准差”表示, 采用 IBM SPSS 21.0 软件中的 ANOVA 进行方差分析, 差异显著者用 Duncan’s 法进行多重比较, 以 P<0.05 和 P<0.01 分别作为差异显著和极显著的判断标准。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

试验共分离获得 3 株具有较强抑菌活性的菌株, 分别编号 L1、L2 (分离自 10 日龄獭兔) 和 L3 (分离自 5 日龄獭兔)。通过比较抑菌圈大小可知, 菌株的抑菌活性大小为 L3>L2>L1 (图 1)。

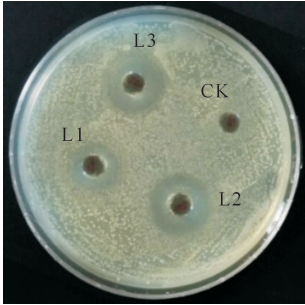


图 1 分离所获 3 株菌对大肠杆菌 K88 的抑制特性
Fig. 1 Antimicrobial property of the three isolated strains against *E. coli* K88

2.2 分离菌株 16S rRNA 基因序列分析与系统发育树

分离获得 3 株菌的 16S rRNA 基因,经通用引物 PCR 扩增后产物的电泳结果如图 2 所示。

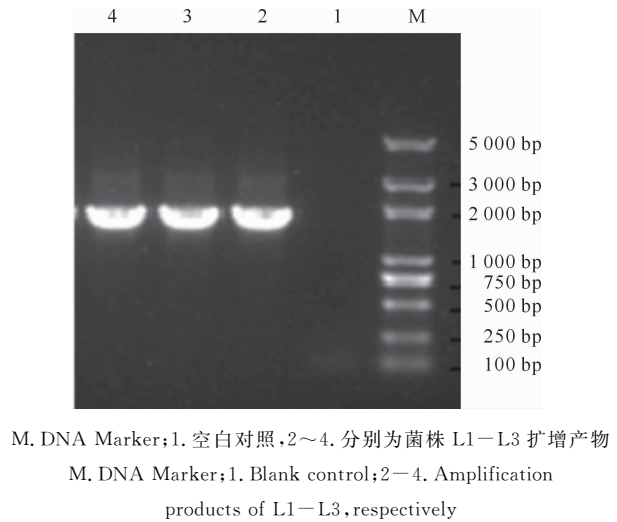


图 2 分离所获 3 株菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 2 Electrophoregram of PCR amplification products of 16S rRNA gene of the three isolated strains'

由图 2 可知,空白对照未见条带,3 株菌的条带单一且明亮,未见杂带或引物二聚体,与预定片段大小(约1.5 kb)一致,表明扩增产物纯度较高、DNA 完整性好,符合测序要求。

菌株 L1、L2、L3 的 16S rRNA 基因测序后提交到 GenBank,获得序列登录号分别为 KT378455、KT378454、KT944253。将测得的序列在 GenBank 数据库中进行序列比对,与 L1 相似度最高的菌株为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) ATCC367 (GenBank 登录号: NR_075024.1),相似度达 99%;与 L2 相似度最高的菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) JCM1149 (GenBank 登录号: NR_115605.1),相似度达 99%;与 L3 相似度最高的菌株为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) ATCC334 (GenBank 登录号: NR_095032.1),相似度达 99%。利用 MEGA 5.10 构建菌株系统发育树,确定各菌株的进化地位,结果(图 3)显示,L1 与短乳杆菌处于同一支,L2 与植物乳杆菌处于同一支,L3 与干酪乳杆菌处于同一支。因此鉴定 L1 为短乳杆菌,L2 为植物乳杆菌,L3 为干酪乳杆菌。

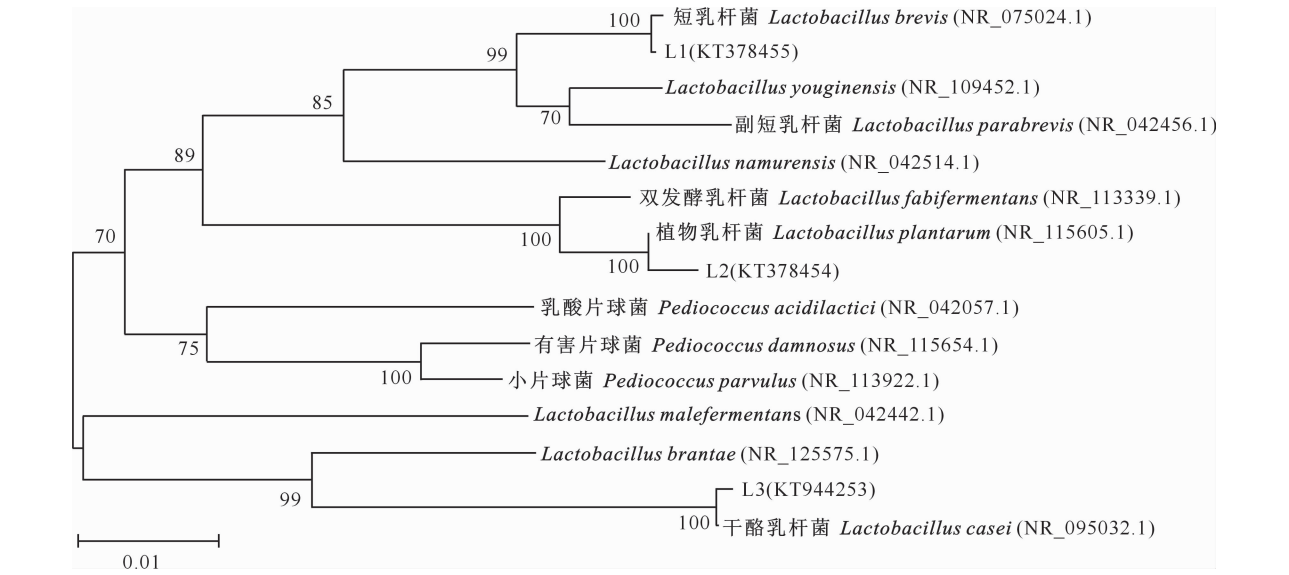


图 3 分离所获 3 株菌 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the three isolated strains based on 16S rRNA sequence

2.3 分离菌株对人工胃液和胆盐的耐受性

由表 1 可知,当人工胃液的 pH 值由 6.2 降为 4.0 时,各菌株的活力未发生显著变化($P>0.05$);当人工胃液 pH 降为 3.0 时,短乳杆菌 L1 的活菌含量极显著下降($P<0.01$),而植物乳杆菌 L2 和干酪乳杆菌 L3 的活菌含量仍无显著变化($P>0.05$);当人工胃液 pH 降为 2.0 和 1.8 时,与 pH 3.0 相比,3

株菌株的活菌数均极显著降低($P<0.01$)。由表 2 可知,胆盐对 L3 的存活有明显的抑制作用,随着胆盐含量的升高,L3 的活菌含量极显著降低($P<0.01$)。L1 和 L2 在胆盐含量为 2.0 g/L 时均可正常生长,与对照组(CK)差异不显著($P>0.05$);当胆盐含量增至 3.0 g/L 时,与 CK 相比,L1 的活菌含量极显著下降($P<0.01$),L2 的活菌含量

显著下降($P<0.05$),但二者仍保留较高活菌数;当胆盐含量增至 5.0 g/L 时,与 CK 相比,L1 和 L2 的活菌含量均极显著降低($P<0.01$)。

表 1 不同 pH 下人工胃液对 3 株乳杆菌活菌含量的影响

人工胃液 pH pH of smulated gastric juice	活菌密度(CFU/mL)常用对数值 Common logarithm value of viable bacterium density (CFU/mL)		
	L1	L2	L3
6.2	8.12±0.08 aA	8.11±0.04 aA	8.15±0.08 aA
5.0	8.05±0.06 aAB	8.08±0.05 aA	8.09±0.06 aA
4.0	8.11±0.06 aA	8.06±0.10 aA	8.21±0.03 aA
3.0	7.93±0.03 bB	8.05±0.05 aA	8.09±0.02 aA
2.0	7.59±0.05 cC	6.21±0.03 bB	7.93±0.03 bB
1.8	7.10±0.10 dD	5.06±0.02 cC	7.29±0.04 cC

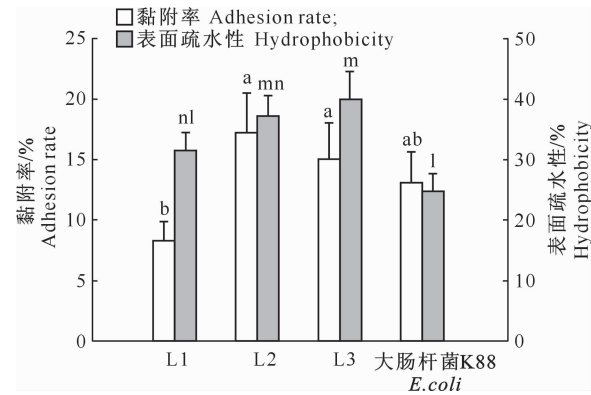
注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。表 2 同。
Note: Different lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$), and different capital letters mean extremely significant difference ($P<0.01$). The same for Table 2.

表 2 胆盐含量对 3 株乳杆菌活菌含量的影响

胆盐含量/(g·L ⁻¹) Bile salt concentrations	活菌密度(CFU/mL)常用对数值 Common logarithm value of viable bacterium density (CFU/mL)		
	L1	L2	L3
0.0(CK)	8.89±0.15 aA	8.92±0.06 aA	8.84±0.04 aA
2.0	8.54±0.26 aA	8.86±0.34 abA	6.60±0.09 bB
3.0	7.49±0.21 bB	8.56±0.09 bA	6.32±0.07 cC
5.0	6.80±0.07 cC	6.31±0.05 cB	5.83±0.05 dD

2.4 分离菌株的黏附特性和表面疏水特性

分离菌株的黏附能力和表面疏水特性的检测结果如图 4 所示。



同一指标不同菌株相比,柱上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)
Comparison among different strains for the same index, the different lowercase letters on recengles mean significant difference ($P<0.05$)

图 4 大肠杆菌 K88 和分离所获 3 株菌的表面疏水性及对獭兔肠黏膜黏液蛋白的黏附率
Fig. 4 Adhesion rate to small intestinal mucin and hydrophobicity of *E. coli* K88 and the three isolated strains from Rex rabbit

L2 与 L3 对獭兔肠黏蛋白的黏附能力无显著差异($P>0.05$),二者稍高于大肠杆菌($P>0.05$),显

著高于 L1($P<0.05$)。L1 的黏附能力稍低于大肠杆菌,但差异不显著($P>0.05$)。

L3 的表面疏水性最高,L2 次之,二者之间无显著差异($P>0.05$)。L1 的表面疏水性稍低于 L2 ($P>0.05$),显著低于 L3($P<0.05$),但稍高于大肠杆菌($P>0.05$)。

尽管 L2、L3 的黏附性与疏水性及 L1、大肠杆菌的黏附性与疏水性均出现了不一致的变化,但从数据变化的总趋势来看,菌株的黏附性与疏水性之间总体上具有一定的相关性。

3 讨论

随着分子生物学技术在肠道微生物检测上的应用,越来越多的研究证实,哺乳仔兔尤其是出生一周内的哺乳仔兔,肠道中存在着大量乳酸菌^[5],这预示乳酸菌对幼龄仔兔肠道健康可能有重要的作用。本研究从哺乳獭兔肠黏膜中分离并筛选出具有较强抑制大肠杆菌活性的 3 株乳杆菌 L1、L2、L3,通过 16S rRNA 基因序列分析分别鉴定为短乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌。

作为益生乳杆菌,首先要耐受胃内极端环境,才能保证其进入肠道发挥益生作用。通过人工胃液抗性试验可知,虽然各菌株对胃环境的敏感性存在差异,但在 pH=3.0 的人工胃液中生长仍能保持大量

活菌数,即筛选的3株乳杆菌均能够顺利通过幼龄仔兔胃环境。对胆盐的耐受性也是筛选益生菌的重要指标之一。正常小肠胆汁盐含量在0.3~3.0 g/L。研究表明,能够抵抗3.0 g/L胆盐含量的益生菌才能有效发挥益生作用^[14]。本研究中,尽管3株菌株间对胆盐的敏感性存在显著差异,但L1和L2在胆盐含量为3.0 g/L时仍能大量存活,表明其均可耐受动物体内胆盐等形成的高渗透压环境。

乳酸菌的黏附性对于其在肠道定殖、增加与机体的交互作用、竞争性排斥病原菌在肠道的定殖、提高机体的免疫力等方面具有重要作用^[15]。因此,黏附性被作为菌种筛选和质量控制的重要指标。由于直接做体内黏附试验比较困难,应用体外模拟体系来反映菌株的黏附性能已成为公认的模式^[11-12]。分布于肠黏膜上皮细胞表面的黏液糖蛋白是肠道微生物的一种靶受体。已有研究证明,黏液糖蛋白可作为受体模型来研究乳杆菌的黏附性能^[16]。本研究采用体外肠黏液黏蛋白模型,利用荧光素标记法检测了3株乳杆菌及大肠杆菌的黏附能力,结果显示,3株乳杆菌的黏附特性存在一定的差异,其中植物乳杆菌与干酪乳杆菌的黏附能力较佳。高巍等^[17]报道,乳杆菌对固定化小肠黏液蛋白的附着能力相对高于大肠杆菌,这与本试验中植物乳杆菌和干酪乳杆菌的黏附能力高于大肠杆菌的结果基本一致,但短乳杆菌的黏附能力低于大肠杆菌。本试验结果表明,乳杆菌的黏附能力存在菌种特异性。Ren等^[6]比较了不同乳杆菌与宿主黏蛋白的黏附性,结果发现不同菌种的黏附性差异很大,其中植物乳杆菌的黏附性最高,这与本研究结果类似。Jakava-Viljanen等^[18]研究发现,乳杆菌的黏附过程由多种成分参与,如表层蛋白、脂磷壁酸和完整肽聚糖等,但不同种属甚至同种的不同菌株参与黏附的成分存在一定的差异,这可能是造成乳杆菌黏附性能具有菌种乃至菌株特异性的主要原因。

益生菌在肠道中的黏附方式除了特异性结合(黏附素与受体),还包括非特异性结合(疏水相互作用)^[19]。有研究发现,细菌的表面疏水性与其黏附性具有正相关性,测定疏水性可间接获知黏附性的大小^[20]。但也有研究报道,表面疏水性与其黏附性不存在正相关关系^[21]。从本研究数据的总体变化趋势来看,4株菌株的黏附性与疏水性之间具有较高的相关性,但植物乳杆菌和干酪乳杆菌的黏附性与疏水性,以及短乳杆菌、大肠杆菌的黏附性与疏水性均偏向负相关,即不同菌株间黏附性与疏水性的

比较结果存在差异。这提示,表面疏水性只能作为判断益生菌黏附性的一个参考指标,但不能替代黏附性试验。

综合黏附试验和表面疏水性试验的结果,植物乳杆菌、干酪乳杆菌的黏附性能和表面疏水性能均相对较高,显示其具有较好的益生效果。同时,针对目前有关益生菌筛选时较少评估黏附性的问题,本研究采用体外肠黏液黏蛋白模型筛选高黏附乳杆菌株,为进一步研究乳杆菌在动物胃肠道黏膜表面附着、定殖的机制和开发高效益生菌提供了一种很好的试验手段。

4 结 论

从哺乳獭兔肠黏膜分别筛选获得具有抑菌活性的短乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌各1株,其均具有良好的耐人工胃液和耐胆盐特性。植物乳杆菌和干酪乳杆菌的黏附性、表面疏水性及对大肠杆菌的抑菌活性均相对高于短乳杆菌,综合评价二者的益生特性又以植物乳杆菌较佳。

[参考文献]

- [1] Kritas S, Petridou E, Fortomaris P, et al. The effect of probiotics on microbiology, health and performance of fattening rabbits [J]. Journal of Animal Science, 2008, 21(9): 1312-1317.
- [2] Umesaki Y, Setoyae H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model [J]. Microbes and Infection, 2000, 2(11): 1343-1351.
- [3] Ege M J, Mayer M, Normand A C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma [J]. New England Journal of Medicine, 2011, 364(8): 701-709.
- [4] 章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 389-396.
Zhang W M, Wang H F, Liu J X. Mechanism of action of probiotic function of *Lactobacill* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(3): 389-396.
- [5] Kovacs M, Sendro Z, Milisits G, et al. Effect of nursing methods and faeces consumption on the development of the *Bacteroides*, *Lactobacillus* and *Coliform* flora in the caecum of the newborn rabbits [J]. Reproduction Nutrition Development, 2006, 46(2): 205-210.
- [6] Ren D, Li C, Qin Y, et al. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine [J]. Anaerobe, 2014, 30: 1-10.
- [7] Kelly D, King T, Aminov R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2007, 622(1/2): 58-69.

- [8] Kos B, Šušković J, Vuković S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 981-987.
- [9] 董晓丽, 张乃锋, 周 盟, 等. 一株乳酸菌 GF103 的分离鉴定及体外益生效果评价 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(9): 1832-1838.
- Dong X L, Zhang N F, Zhou M, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. GF103 and assess it as potential probiotics *in vitro* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(9): 1832-1838.
- [10] García-Ruiz A, de Llano D G, Esteban-Fernández A, et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine [J]. Food Microbiology, 2014, 44: 220-225.
- [11] Carasi P, Ambrosio N M, De Antoni G L, et al. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus [J]. Journal Dairy Research, 2014, 81(1): 16-23.
- [12] Valeriano V D, Parungao-Balolong M M, Kang D K. *In vitro* evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(2): 485-497.
- [13] Dogi C A, Perdigón G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria [J]. Journal Dairy Research, 2006, 73(3): 357-366.
- [14] Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi A H, et al. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61(2): 193-197.
- [15] Kotzamanidis C, Kourelis A, Litopoulou-Tzanetaki E, et al. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(2): 154-163.
- [16] Tuomola E M, Ouwehand A C, Salminen S J. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics [J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28(3): 159-163.
- [17] 高 巍, 孟庆翔. 乳杆菌、双歧杆菌和大肠杆菌附着固定化猪小肠粘液蛋白的研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 609-613.
- Gao W, Meng Q X. Study on the adhesion abilities of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Escherichia coli* to the immobilized mucosa of small intestine of piglets [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(4): 609-613.
- [18] Jakava-Viljanen M, Palva A. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(3): 264-273.
- [19] Lönnermark E, Nowrouzian F, Adlerberth I, et al. Oral and faecal *Lactobacilli* and their expression of mannose-specific adhesins in individuals with and without IgA deficiency [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2012, 302(1): 53-60.
- [20] Zago M, Fornasari M E, Carminati D, et al. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses [J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 1033-1040.
- [21] Schillinger U, Guigas C, Holzapfel W H. *In vitro* adherence and other properties of *Lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(12): 1289-1297.