

# 蜂蜜中艾皮斯乳杆菌A9 (*Lactobacillus apis* A9) 的分离鉴定及其对铅的吸附作用

沈文权<sup>1</sup>, 高西贝<sup>2</sup>, 胡浩<sup>1</sup>, 乔江涛<sup>1</sup>, 张红城<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 北京 100093)

(2. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150000)

**摘要:** 为了探究蜂蜜中乳酸菌的益生特性, 从蜂蜜中分离纯化出一株革兰氏阳性菌, 结合菌落和菌体特征、生理生化反应以及 16S rDNA 测序技术分析, 鉴定该菌为艾皮斯乳杆菌 (*Lactobacillus apis*)。安全性实验表明, 该菌株 A9 不溶血, 不水解明胶, 不还原硝酸, 无氨基酸脱羧能力, 对青霉素等 9 种抗生素敏感。益生实验结果显示该菌有较高自聚集率 (93.37%) 和较高的疏水率 (48.71%), pH 值 3 的环境下培养 3 h 存活率为 43.67%, 在 1 wt.% 胆酸钠溶液、6 wt.% NaCl 溶液、25 wt.% 葡萄糖溶液中分别培养 24 h 后, 存活率分别为 96.48%、68.27%、88.57%。表明该菌具有很强的耐酸耐胆盐和耐高渗能力。该菌吸附重金属铅的结果显示, 对 Pb<sup>2+</sup> 的吸附率高达 55.53%。铅占菌体表面的元素百分比为 5.90%。红外结果表明, 菌体表面的羟基、氨基与铅离子发生了相互作用, 造成菌体蛋白的  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  转角增加,  $\beta$  折叠减少。结果表明, 从蜂蜜中筛选出的 *Lactobacillus apis* A9 具有良好的安全性、益生功能及良好的重金属铅吸附能力, 为蜂蜜中乳酸菌的开发利用, 提供了新的思路。

**关键词:** 蜂蜜; 艾皮斯乳杆菌 A9; 益生功能; 重金属; 铅

文章编号: 1673-9078(2024)12-98-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1429

## Identification of *Lactobacillus apis* A9 Isolated from Honey and Quantitation of Its Lead Adsorption

SHEN Wenquan<sup>1</sup>, GAO Xibei<sup>2</sup>, HU Hao<sup>1</sup>, QIAO Jiangtao<sup>1</sup>, ZHANG Hongcheng<sup>1\*</sup>

(1.State Key Laboratory of Resource Insects, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China) (2.School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150000, China)

**Abstract:** In an investigation of the probiotic properties of lactic acid bacteria in honey, a gram-positive bacterium was isolated from honey and purified. Based on its colony and cell morphology, physiological and biochemical responses, and 16S rDNA sequencing analysis, the bacterium was identified as *Lactobacillus apis* A9. This strain was found to be negative for hemolysis, gelatin hydrolysis, nitrate reduction, and amino acid decarboxylation, and susceptible to nine antibiotics, including penicillin. In probiotic experiments the bacterium displayed a high self-aggregation rate (93.37%) and a relatively

引文格式:

沈文权,高西贝,胡浩,等.蜂蜜中艾皮斯乳杆菌A9 (*Lactobacillus apis* A9) 的分离鉴定及其对铅的吸附作用[J].现代食品科技,2024,40(12):98-109.

SHEN Wenquan, GAO Xibei, HU Hao, et al. Identification of *Lactobacillus apis* A9 isolated from honey and quantitation of its lead adsorption [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 98-109.

收稿日期: 2023-11-29

基金项目: 国家蜂产业技术体系项目 (CARS-44-KXJ19); 中国农业科学院创新工程 (CAAS-ASTIP-2019-IAR)

作者简介: 沈文权 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1253826373@qq.com

通讯作者: 张红城 (1967-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 460414874@qq.com

high hydrophobicity rate (48.71%). It exhibited 43.67% survival after incubation for 3 h at pH 3.0. After 24 h of incubation in solutions of 1 wt.% sodium deoxycholate, 6 wt.% sodium chloride, and 25 wt.% glucose, the survival rates of the bacterium were 96.48%, 68.27%, and 88.57%, respectively. These results indicate that strain A9 possesses strong resistance to acid, bile salts, and hyperosmotic stress. The bacterium displayed a lead ( $Pb^{2+}$ ) absorption rate of 55.53%. Lead accounted for 5.90% of the bacterium's surface-displayed elements. Infrared results revealed that hydroxyl and amino groups on the bacterium's surface interact with lead ions, leading to an increase in  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -turns in the bacterium's proteins and a decrease in  $\beta$ -sheets. In summary, *L. apis* A9 isolated from honey exhibits good safety, probiotic function, and lead adsorption capacity. This study provides new insights into the development and utilization of lactobacilli in honey.

**Key words:** honey; *Lactobacillus apis* A9; probiotic function; heavy metal; lead

乳酸菌 (Lactic Acid Bacteria) 是一类发酵糖类生成大量乳酸的革兰氏阳性细菌。一般为0.5~1.0  $\mu\text{m}$  宽, 2.0~10.0  $\mu\text{m}$  长, 是肠道微生物菌群的重要成员<sup>[1]</sup>, 可通过产生短链脂肪酸, 促进肠道健康。对宿主新陈代谢、免疫能力以及神经发育等健康方面具有至关重要的作用<sup>[2]</sup>。2020年国际微生物学会将乳杆菌属重新分为25个属, 共有261个种<sup>[3]</sup>。

近年来, 许多研究表明, 蜂蜜是益生菌的潜在来源之一。艾皮斯乳杆菌 (*Lactobacillus apis*) 是来自蜜蜂和蜂蜜的一种特有的乳酸菌, 该菌也被称作 Firm-5<sup>[4]</sup>。它能够参与调节蜜蜂的肠道健康, 维持肠道的微生态平衡, 并且有助于改善蜜蜂的学习记忆力, 提高蜜蜂的抗病能力<sup>[5]</sup>。艾皮斯乳杆菌与酿酒酵母和植物乳植杆菌相比, 对发酵麦麸的抗氧化活性、植酸降解、营养价值和风味特性具有很好的改善作用<sup>[6]</sup>。

重金属铅是一种两性重金属, 分布广泛, 对环境和人类健康危害极大。对神经系统、骨髓造血功能和生长发育危害极大。目前, 常用的方法是通过物理、化学或生物富集法对重金属进行减量处理。研究表明乳酸菌在吸附重金属方面发挥出显著优势, 如 Pakdel 等<sup>[7]</sup>报道植物乳植杆菌 PTCC 1896 的活细胞和死细胞都能有效吸附铅, 减少水中的重金属污染; Tian 等<sup>[8]</sup>发现植物乳植杆菌 CCFM8661 在治疗小鼠铅中毒方面有显著的效果。相同的是, 现有研究都是筛选于特殊自然环境的乳杆菌具有吸附重金属铅的效果, 来源于食物且具有重金属吸附功能的乳杆菌研究相对较少。

本次研究从蜂蜜中筛选出一株乳酸杆菌, 结合菌落菌体形态学、生理生化实验和分子生物学鉴定方法对分离出的菌株进行属种鉴定, 评价其生长特性、安全性与益生功能。通过电感耦合等离子体光谱仪 (ICP)、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 以及扫

描电镜 -X 射线能谱 (SEM-EDS) 检测结果, 评价该菌株吸附重金属铅的能力。本研究为蜂蜜中特有乳杆菌作为潜在益生菌的开发利用, 提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蜂蜜: 中国农业科学院蜜蜂研究所养蜂基地。

MRS 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; API50CHL 乳杆菌属生化鉴定盒, 法国梅里埃公司; 哥伦比亚血平板, 广东环凯微生物科技有限公司; 磁珠保存管, 青岛海博生物技术有限公司; 乙酸, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 乙酸铅, 北京博凝生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

ICP6000 电感耦合等离子体发射光谱仪、Scientific Hera cell 150 恒温培养箱, 美国赛默飞世尔公司; CX31 光学显微镜, 日本奥林巴斯有限公司; Synergy neo2 multi-mode reader 酶标仪, 美国伯滕仪器有限公司; Hitachi S4800-EDS 扫描电镜 -X 射线能谱仪, 日本日立公司; VERTEX 70V-HYPERION2000-RAM II 傅立叶变换红外光谱仪, 美国珀金埃尔默股份有限公司; 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; SW-CJ-1FD 型超净工作台, 江苏净安泰空气技术有限公司; LGJ-18S 真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; AL104 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌株的分离纯化与保存

取 1 g 蜂蜜充分溶解于 9 g 无菌水, 随后梯度稀释  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  倍, 充分混匀, 吸取 200  $\mu\text{L}$  菌悬液, 分别涂布于 MRS 固体培养基中

(含质量分数为1%的碳酸钙), 37℃下恒温培养48 h, 同时以空白平板作对照, 观察菌落。平板中挑取外表呈乳白色、光滑且周围具有透明溶钙圈的菌落进行再次划线分离, 直至纯化出单个菌落。选取革兰氏阳性的杆状产酸菌, 划线于MRS琼脂培养基斜面上培养24 h, 随即保存于4℃冰箱待鉴定, 挑取剩余菌落接入磁珠冻存管, 放置于-80℃超低温冰箱冷冻保藏。

### 1.3.2 菌株生化鉴定

将斜面保存的菌种划线于MRS琼脂培养皿上, 37℃下复壮培养24 h, 按Cox等<sup>[9]</sup>的方法接种适量纯化菌进入API50 CHL乳酸菌属鉴定发酵管, 通过发酵49种碳水化合物, 引起指示剂变色, 观察颜色变化, 查询系统编码, 确定菌株属种。

### 1.3.3 16S rDNA测序

将菌体接种于MRS液体培养基中扩大培养24 h, 在4 000 r/min条件下离心20 min, 获取菌体沉淀物, Nanodrop检测样品质量, 取30 ng, 根据表1反应体系和表2反应条件, 使用引物338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行16S rDNA基因扩增。

表1 16S rDNA扩增反应体系

Table 1 16S rDNA amplification reaction system (50  $\mu$ L)

试剂成分	体积
DNA 样品	X (30 ng)
Forward Primer (5 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
Reverse Primer (5 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
BSA (2 ng/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L
2xTaq Plus Master Mix	12.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	7.5-X $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

表2 16S rDNA基因序列PCR扩增反应条件

Table 2 Conditions for PCR amplification of 16S rDNA gene sequence

温度/℃	时间	循环
94	5 min	30 Cycles
94	30 s	
50	30 s	
72	60 s	
72	7 min	
4	end	

扩增完成, 使用质量分数为1%的琼脂糖凝胶, 170 V电压下电泳30 min, 检测PCR产物, 收集并记录扩增成功的PCR产物并进行双向测序分析(北京奥维森基因科技有限公司), 得到16S rDNA基因序列, 随后将所测得的序列与GenBank中的序列进行BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 比对, 把同源性最高的序列作为参考, 绘制目标菌株的系统发育树<sup>[10]</sup>。

### 1.3.4 生理生化特性检测

最适生长条件测定: 将菌液混匀调至麦氏浊度为1.00 (约 $1 \times 10^8$  CFU/mL) 吸取1 mL菌悬液接种于50 mL的MRS液体培养基中, 设置不同温度(20、25、30、35、37、40、45、55℃) 恒温培养24 h, 测出OD<sub>600</sub>值以确定菌株的最适生长温度; 最适温度下, 控制培养基的不同pH值(2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5), 培养24 h后测定OD<sub>600</sub>值, 确定菌株生长的最适pH值。随后在最适温度与最适pH值条件下培养菌株, 每隔两小时充分摇匀后测一次OD<sub>600</sub>值和pH值, 并绘制生长曲线与产酸曲线。

### 1.3.5 安全性测定

溶血性<sup>[11]</sup>: 将菌株接种划线于哥伦比亚血琼脂培养基, 最适培养条件下恒温培养24 h, 观察菌落周围颜色是否变化, 是否有溶血圈出现。

明胶酶水解: 在明胶水解试剂盒中接入适量菌体, 37℃恒温培养24 h, 随后转移至4℃环境低温放置30 min, 观察是否溶解明胶。

硝酸盐还原: 挑取适量复壮后的菌体, 接种于硝酸盐生化鉴定管恒温培养, 24 h后观察颜色变化。

氨基酸脱羧实验<sup>[12]</sup>: 挑取适量复壮后的菌体, 接入氨基酸脱羧鉴定管。最适温度下培养24 h, 观察并记录鉴定管中颜色变化情况。

抗生素敏感性: 参考Samedi等<sup>[13]</sup>的方法, 采用K-B (药敏纸片琼脂扩散法) 进行药敏试验。吸取OD<sub>600</sub>为1.00的菌液100  $\mu$ L, 均匀涂布在MRS琼脂培养皿表面, 待干燥后随即用镊子将药敏纸片分别平贴于培养皿, 以灭菌的MRS空白培养基和空白滤纸片作为对照。恒温培养24 h, 测量抗生素药敏试纸的抑菌圈直径。抗生素有青霉素、氯霉素、红霉素、头孢曲松、氨苄西林、林可霉素、复方新诺明、庆大霉素、环丙沙星、四环素等10种常用抗生素。

### 1.3.6 益生特性

自聚集<sup>[14]</sup>: 将菌液调至OD<sub>600</sub>=1.00 (约 $1 \times 10^8$  CFU/mL), 最适生长条件下恒温培养24 h后, 摇匀后测定其麦氏浊度B, 按式(1)计算自聚集能



力。自聚集能力通常被分为3个等级：X>50%为高等；35%~50%为中等；16%~35%则判定为低等。

$$X = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

X——自聚集（疏水性）率，%；

B——24 h后实验组 OD<sub>600</sub> 值；

A——初始 OD<sub>600</sub> 值。

疏水性<sup>[15]</sup>：将菌悬液调至 OD<sub>600</sub>=1.00，加入等体积的二甲苯，混匀后室温培养 15 min，涡旋震荡 3 min 混合均匀，放置通风处，保持静止 1 h 后使之分层，随后除去有机相，测定其水相 OD<sub>600</sub>，按式（1）计算其表面疏水性。

耐酸实验<sup>[16]</sup>：在 MRS 液体培养基加入盐酸调节 pH 值 2、pH 值 2.5、pH 值 3，将麦氏浊度为 OD<sub>600</sub>=1.0（约 1×10<sup>8</sup> CFU/mL）的菌悬液接种于 MRS 液体培养基，在最适温度 37 °C 下恒温培育 3 h，测定 OD<sub>600</sub> 值 B。按式（2）计算存活率：

$$X = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

X——存活率，%；

B——培育后实验组 OD<sub>600</sub> 值；

A——初始 OD<sub>600</sub> 值。

耐胆盐性<sup>[16]</sup>：称取适量胆汁酸盐，以 MRS 液体培养基为溶液，分别配置 0.3%、0.5%、1%（质量百分数）的胆汁酸盐溶液，接种麦氏浊度为 OD<sub>600</sub>=1.0（约 1×10<sup>8</sup> CFU/mL）的菌悬液于培养基中，37 °C 恒温培育 24 h，测定 OD<sub>600</sub> 值 B，按式（2）计算存活率。

耐高渗实验<sup>[17]</sup>：称取适量氯化钠，以 MRS 液体培养基作溶液，分别配置 2%、4%、6%（质量百分数）的氯化钠溶液，同耐胆盐实验方法接种培养并测定 OD<sub>600</sub> 值 B，按式（2）计算存活率。

耐高糖实验：称取适量葡萄糖，以 MRS 液体培养基作溶液，分别配置 15%、20%、25%（质量百分数）的葡萄糖溶液，同耐胆盐实验方法接种培养并测定 OD<sub>600</sub> 值 B，按式（2）计算存活率。

### 1.3.7 重金属吸附

参照 Tian 等<sup>[8]</sup>植物乳植杆菌 CCFM8661 对铅吸附方法，将活化完成后的菌株 37 °C 培养 24 h，4 000 r/min 离心 20 min 得到菌体，使用生理盐水对离心得到的菌体进行清洗。重复上述离心、清洗过

程三次，得到乳酸菌菌体。称取醋酸铅，分别用超纯水配制成 Pb<sup>2+</sup> 浓度为 0.062 5、0.125、0.25、0.5、0.75 mmol/L 的乙酸铅溶液，随后称取离心所得的菌体重悬于上述溶液中，使其中的乳酸菌菌体质量浓度达到 1 g/L。在 37 °C 条件下恒温振荡培育 1 h，4 000 r/min 离心 10 min，用 ICP 测得上清液的铅浓度，菌体备用。乳酸菌对铅离子的吸附效率按式（3）计算：

$$W = \frac{C_0 - C_1}{C_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

W——离子吸附效率，%；

C<sub>0</sub>——初始溶液铅离子浓度，mmol/L；

C<sub>1</sub>——吸附后溶液铅离子浓度，mmol/L。

### 1.3.8 傅里叶变换红外及扫描电镜-X射线能谱扫描

按照 1.3.7 进行菌体吸附重金属铅后，将离心所得的菌体置于 -80 °C 条件下冷冻 12 h，随后用 LGJ-18S 型的冷冻干燥机进行冷冻干燥 48 h。按照 1:50 的比例将样品压入 KBr 颗粒中，在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 范围内对样品扫描 50 次获得红外扫描结果，未进行吸附的空白对照菌也作如上处理。

准备另一部分菌（吸附前和吸附后），用无菌生理盐水进行彻底洗涤，按照 Ge 等<sup>[18]</sup>的方法处理菌体，使用 SEM-EDS 扫描并记录显微图像。

### 1.3.9 数据分析

采用软件 MEGA 7.0 进行序列比对分析；软件 Excel 2019、OriginPro 2018 进行数据统计分析与图表制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落及菌体形态特征

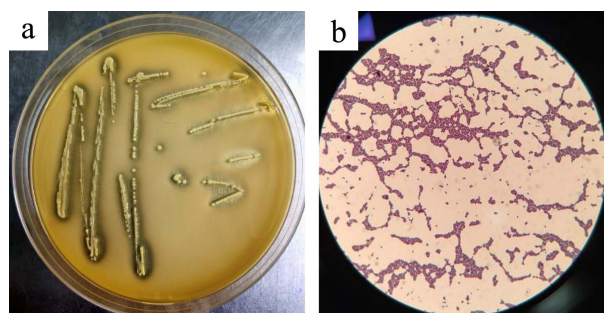


图 1 分离纯化菌株的菌落形态和显微形态特征

Fig.1 The colony morphology and micromorphology of the purified strains were isolated

注：a 为菌落形态，b 为菌体形态（放大倍数：10×100）。

从蜂蜜中分离出3个具有透明溶钙圈的菌落,挑取划线分离得到一株杆状的产酸菌。菌落形态如图1所示,呈乳白色圆形,表面光滑细密,中间凸起,边缘规则,直径约2 mm。显微镜下观察发现,菌体呈紫色,即革兰氏阳性,圆端直杆状,短链或成对状排列,无芽孢,无鞭毛,不运动。

## 2.2 API50 CHL 乳酸菌属鉴定结果

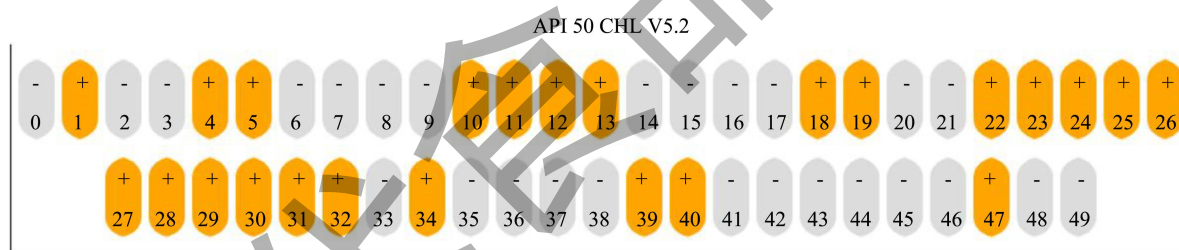
该菌碳水化合物发酵结果见图2。平行两组培养发酵48 h后,该菌株可利用 L-阿拉伯糖、D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露醇、甘露醇、山梨醇、N-乙酰葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶灵、水杨苷、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-乳糖、D-蜜二糖、D-蔗糖、D-海藻糖、D-松三糖、D-龙胆二糖、D-土伦糖和葡萄糖酸钾等23种糖;利用丙三醇的能力较弱;不利用赤藻糖醇、D-阿拉伯糖、D-木糖、L-木糖、D-核糖醇、甲基-β-D吡喃木糖苷、L-山梨糖、L-鼠李糖、卫矛醇、肌醇、甲基-β-D-吡喃甘露糖苷、甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷、菊粉、D-棉子糖、淀粉、糖原、木糖醇、D-来苏糖、D-塔格糖、D-岩藻糖、L-岩藻糖、D-阿拉

伯醇、L-阿拉伯醇、2-酮基葡萄糖酸钾、5-酮基葡萄糖酸钾。参照API鉴定系统<sup>[9]</sup>,初步判断该菌株属于乳杆菌属。本研究筛选出的乳杆菌对49种糖的利用能力优于柳青等<sup>[19]</sup>从摩洛哥自然发酵驼乳中分离出的菌株 IMAU98054 和 IMAU98084,说明不同来源的菌株对环境的适应性存在很大差异,为进一步开发其特定功能奠定了基础。



图2 菌株碳水化合物发酵结果

Fig.2 Carbohydrate fermentation results of strains



可疑的生化谱			
日期	18-1-2024		
试验条	API 50 CHL V5.2		
生化谱	-+--+--++-----+--++++-----+-----+-----+		
注			
有意义的分类单位	% ID	T 值	不一致的试验
戊糖乳杆菌	55.3	0.71	DXYL 100% MLZ 25% RAF 75%
植物乳杆菌1	44.6	0.75	GLY 1%
下一分类单位	% ID	T 值	不一致的试验
短乳杆菌1	0.1	0.41	GLY 0% SOR 14% MLZ 14% TUR 14%

图3 API 50CHL 鉴定结果

Fig.3 API 50CHL identification results

菌株的API 50CHL 鉴定中,%ID 值越接近于100%,T 值越接近于1,说明鉴定结果越准确。筛出的菌株 A9 的鉴定结果如图3所示,%ID 值相对较低,55.3% 接近于戊糖片球菌,44.6% 接近于植

物乳杆菌1。没有直接鉴定出 *Lactobacillus apis*, 可能的原因是从蜂蜜中新筛分出来的菌种在鉴定库里的参考数值有待进一步完善。由此,对该菌进行进一步鉴定。

### 2.3 16S rDNA基因序列分析

菌株 16S rDNA 片段 PCR 扩增产物的凝胶电泳结果如图 4，将序列测得的结果与 National Center for Biotechnology Information 中基因序列进行 BLAST 比对结果如图 5，结果表明该菌株与艾皮斯乳杆菌 (*Lactobacillus apis*) 的基因序列同源性高达 100%。结合生理生化特性结果将该菌株归类为艾皮斯乳杆菌并命名为艾皮斯乳杆菌 A9 (*Lactobacillus apis* A9)。

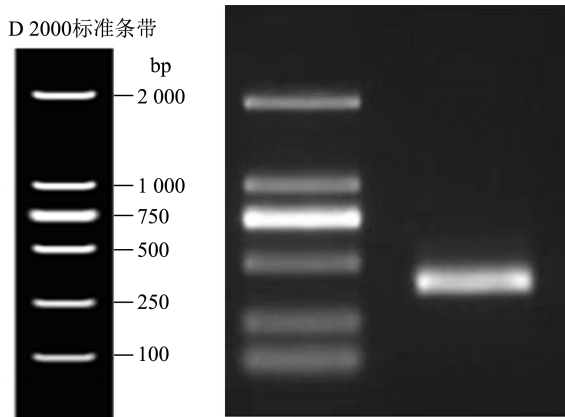


图 4 *Lactobacillus apis* A9 的 16S rDNA 片段 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig.4 Gel electrophoresis of 16S rDNA fragment PCR amplification product of *Lactobacillus apis* A9



图 5 *Lactobacillus apis* A9 与其他蜜蜂源乳酸菌 16S rDNA 系统发育进化树

Fig.5 Phylogenetic evolutionary tree of *Lactobacillus apis* A9 and other bee-derived *Lactobacillus* 16S rDNA

### 2.4 菌株生长特性的研究

#### 2.4.1 最适温度和最适 pH 值生长条件

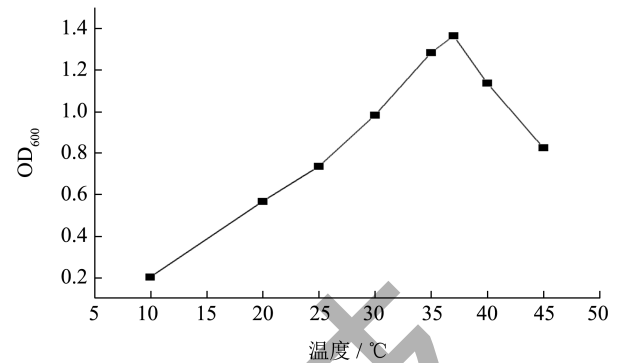


图 6 不同温度对 *Lactobacillus apis* A9 生长的影响

Fig.6 Effects of different temperatures on the growth of *Lactobacillus apis* A9

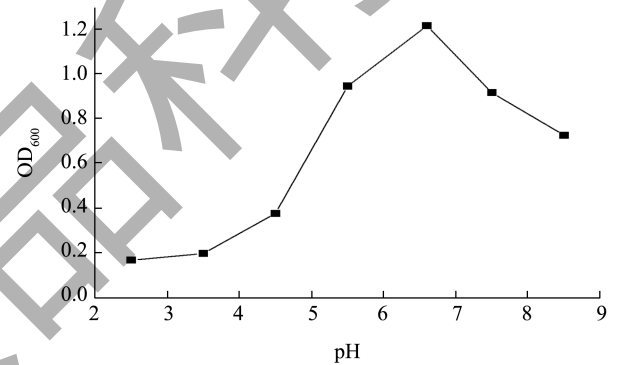


图 7 不同 pH 值对 *Lactobacillus apis* A9 生长的影响

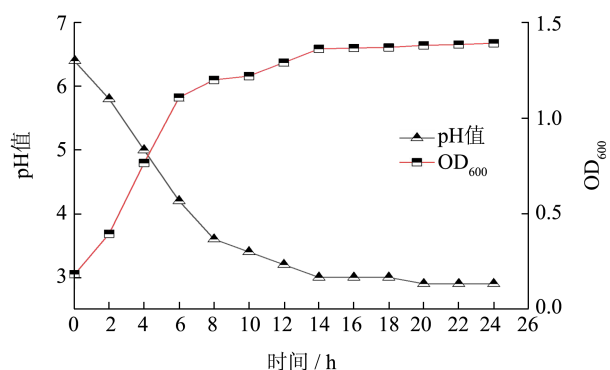
Fig.7 Effects of different pH conditions on the growth of *Lactobacillus apis* A9

分别控制不同温度，不同初始 pH 值，恒温培养 24 h 之后测定 OD<sub>600</sub>，根据菌株生长情况确定该菌株最适生长温度与最适生长酸碱度。结果表明，*Lactobacillus apis* A9 的最适生长温度为 37 °C (如图 6)，最适 pH 值为 6.5 (如图 7)。

#### 2.4.2 *Lactobacillus apis* A9 的生长曲线和产酸能力曲线

该菌生长曲线呈“S”曲线，最适温度下培养 2 h 后生长速率最高，进入对数生长期，培养 16 h 后生长速率明显放缓，进入稳定生长期 (图 8)。在 2~16 h 的生长时间内，菌悬液的 pH 值呈持续降低趋势，说明 *Lactobacillus apis* A9 在对数生长周期内，其产酸量与培养时间呈正相关，培养 16 h 后，菌悬液 pH 值降至 3.36，随着菌株生长进入稳定期，菌悬液的 pH 值变化逐渐趋于稳定，说明菌株在培养到 16 h 后，细菌总数达到最高水平。



图8 *Lactobacillus apis* A9 的生长曲线和产酸能力曲线Fig.8 Growth curve and acid-producing capacity curve of *Lactobacillus apis* A9

## 2.5 安全性评价

### 2.5.1 抗生素敏感性

*Lactobacillus apis* A9 对青霉素的敏感度最高, 氨苄西林和头孢曲松次之; 对环丙沙星的敏感度最低, 没有抑菌圈出现(表3), 说明青霉素对该菌抑制的效果最好, 其次是氨苄西林和头孢曲松, 环丙沙星则对该菌株无抑制作用。

表3 *Lactobacillus apis* A9 的抗生素抑菌直径Table 3 Antibiotic inhibitory diameter of *Lactobacillus apis* A9

测试指标	抑制圈直径/mm	测试指标	抑制圈直径/mm
氯霉素	34.62	林可霉素	13.46
红霉素	34.32	头孢曲松	38.80
氨苄西林	39.85	庆大霉素	11.60
复方新诺明	26.96	四环素	9.14
青霉素	40.38	环丙沙星	0

### 2.5.2 溶血性

细菌分泌溶血素使细胞溶解的现象即溶血性能<sup>[20]</sup>。若菌落周围出现草绿色区域则为 $\alpha$ -溶血型, 也称不完全溶血, 往往属于条件致病菌; 菌落周围出现透明区域为 $\beta$ -溶血型, 也称完全溶血, 具有致病性; 若菌落周围没有变色区域则为 $\gamma$ -溶血型, 即不引起溶血, 无致病性<sup>[21]</sup>。将 *Lactobacillus apis* A9 划线于哥伦比亚血平板恒温培养 24 h, 观察菌落周围颜色变化如图 9, 没有草绿色和透明区域出现在菌落周围, 说明该菌株的溶血型为 $\gamma$ -溶血, 即不会引起溶血, 无致病性。Nath 等<sup>[18]</sup>从发酵乳制品筛选出一株植物乳植杆菌, 通过溶血活性实验检测, 菌落周围无溶血现象。达菊庆等<sup>[22]</sup>对新疆昌吉奶疙瘩中的乳酸菌进行溶血性检测, 结果表明其同样无溶

血活性。本研究中 *Lactobacillus apis* A9 溶血试验结果与文献中报道的结果一致。

图9 *Lactobacillus apis* A9 的溶血测定Fig.9 Hemolysis of *Lactobacillus apis* A9

### 2.5.3 硝酸盐还原、氨基酸脱羧

硝酸还原酶将硝酸盐中的氮氧化物还原成氮气或亚硝酸盐, 与磺胺盐发生反应, 生成呈红色、粉红色或橙色的化合物, 菌株若能产生硝酸盐还原酶, 将菌株接入含磺胺盐的鉴定管恒温培养 24 h, 若有如上颜色变换则可以判断为阳性, 若试管中没有出现明显的颜色变化, 则判断为阴性, 即细菌不具备还原硝酸盐的能力。实验结果显示(图10), 鉴定体系没有出现颜色变化, 说明 *Lactobacillus apis* A9 不具备还原硝酸盐的能力。

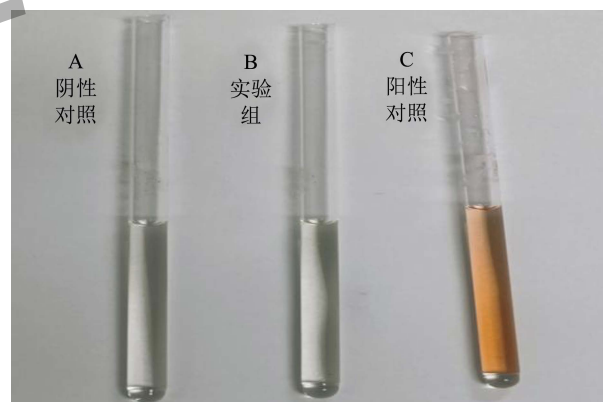


图10 硝酸盐还原实验结果

Fig.10 Results of nitrate reduction experiment

氨基酸脱羧酶能够分解氨基酸使其脱羧, 生成胺和二氧化碳使培养基变为碱性。接入细菌培养后观察培养基, 若细菌能产生氨基酸脱羧酶, 结果呈紫色(指示剂为溴甲酚紫)即为阳性, 若鉴定管呈现黄色则为阴性, 可以判断该菌株没有氨基酸脱羧能力。本研究结果(图11)显示检测结果显示黄色, 即 *Lactobacillus apis* A9 不产生氨基酸脱羧酶, 没有氨基酸脱羧能力。

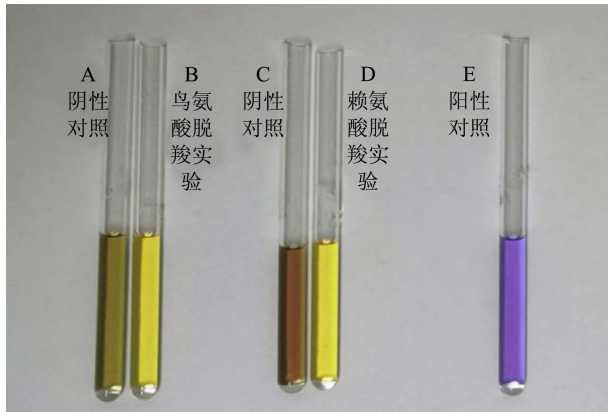


图 11 氨基酸脱羧实验结果

Fig. 11 Experimental results of amino acid decarboxylation

### 2.5.4 明胶液化实验

明胶是由胶原蛋白经水解产生的蛋白质，微生物可产生明胶酶水解这种蛋白质，而使明胶液化。本实验中，明胶没有出现液化现象（如图 12），即 *Lactobacillus apis* A9 不产生明胶酶。与 Liu 等<sup>[23]</sup>从酸菜中分离的乳酸菌、万倩等<sup>[24]</sup>从发酵乳制品中分离的乳酸菌液化明胶能力（结果为阴）报道相似。

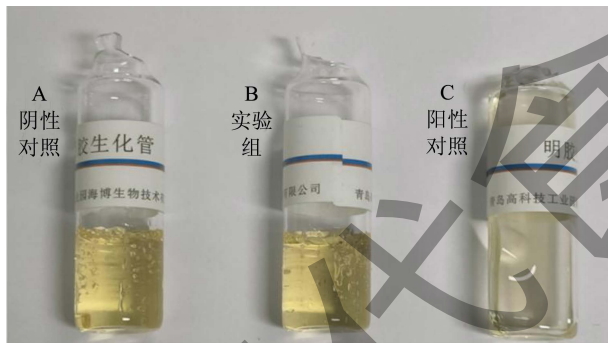


图 12 明胶液化实验结果

Fig.12 Results of gelatin liquefaction experiment

## 2.6 益生实验

### 2.6.1 自聚集率与疏水率

具有较高自聚集能力的菌株在肠道里更易于汇集，一定程度上消除肠道蠕动带来的影响；具有较好的疏水性，有助于提高菌体对宿主胃肠道上皮细胞的黏附，即有利于定殖。结果（图 13、14）显示该菌株自聚集率和表面疏水率分别为 93.37% 和 48.71%，均优于郑琦锴等<sup>[20]</sup>从泡菜中分离的植物乳杆菌 JT1-16 的 66.13% 和 44.19%。参考吴雨晗等<sup>[25]</sup>分级标准，*Lactobacillus apis* A9 具有高度自聚集性和中度疏水性，说明 *Lactobacillus apis* A9 具有较好的肠道定殖能力。

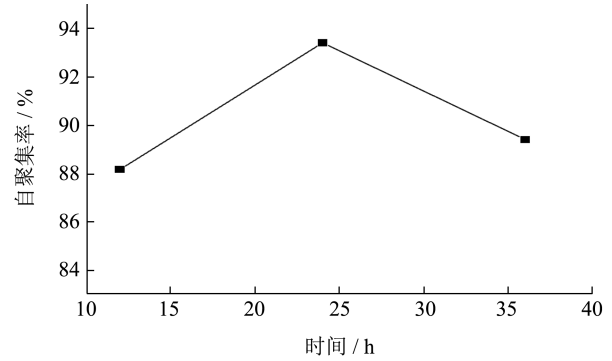


图 13 自聚集实验结果

Fig.13 Self-aggregation experiment results

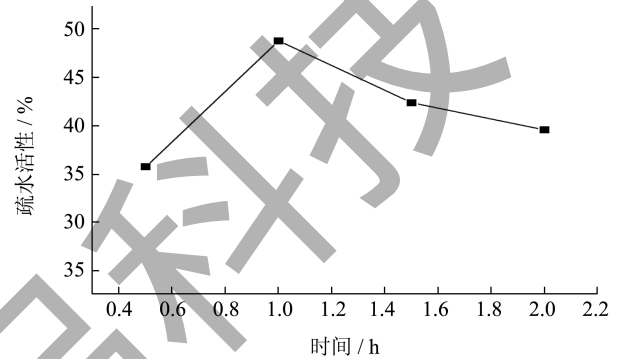


图 14 疏水性实验结果

Fig.14 Results of hydrophobicity experiment

### 2.6.2 酸耐受结果

胃肠道的环境一般为酸性，人体胃肠道 pH 值在 2.5~3.0。肠道益生菌只有顺利通过酸性环境的消化道后才能在宿主体内发挥益生作用。耐酸结果（图 15）显示，在 pH 值 2.0 时，菌株存活率为 24.33%；在 pH 值 2.5 时，菌株存活率为 37.84%；在 pH 值 3.0 时，菌株存活率为 43.67%，高于吴雨晗等<sup>[25]</sup>报道的猪源约翰氏乳杆菌的存活率 12.1%、13.45% 和 32.01%。在模拟胃肠道的酸性环境中，*Lactobacillus apis* A9 的酸耐受能力表现为中等水平，可以适应于肠道的酸性环境。

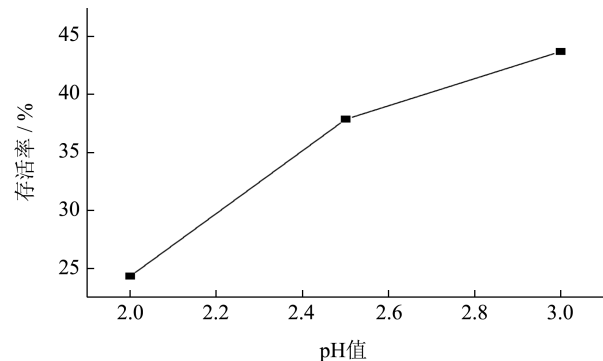


图 15 酸耐受实验结果

Fig.15 Acid tolerance test results



### 2.6.3 胆盐耐受能力

菌株进入胃肠道后，若该菌株对胆盐无耐受能力，进入肠道便无法耐受胆盐环境而不能定殖存活。肠道内胆汁浓度一般约在 0.1%~0.3%。胆盐耐受结果（图 16）显示，胆盐质量分数为 0.1% 时菌株的存活率 97.01%；质量分数为 0.2% 时存活率 96.32%；质量分数 0.3% 时存活率 96.48%。因此，*Lactobacillus apis* A9 具有较高的胆盐耐受力，说明能够在肠道中定殖存活。

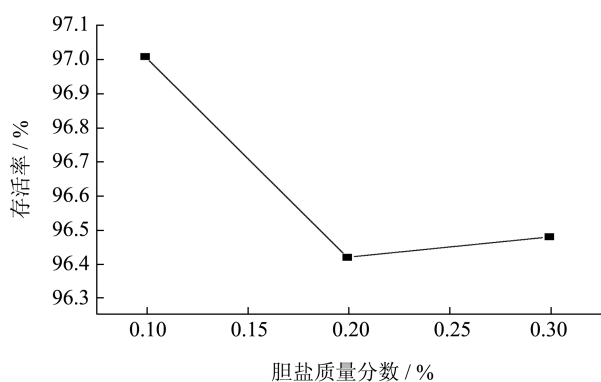


图 16 胆盐耐受实验结果

Fig.16 Results of bile salt tolerance test

### 2.6.4 高渗耐受结果

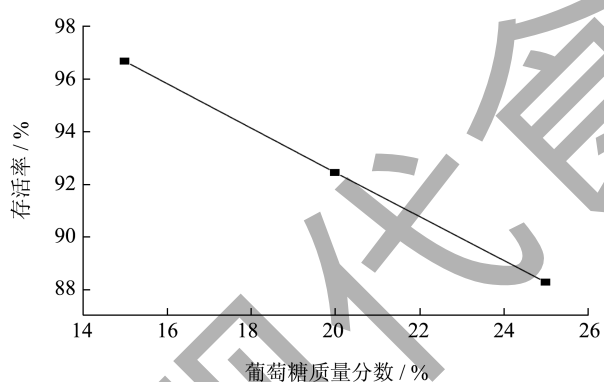


图 17 葡萄糖耐受实验结果

Fig.17 Results of glucose tolerance test

乳酸菌在高盐和高糖渗透压环境下生长会受到限制，从而影响菌体生长。若渗透压超过其耐受极限，则会严重影响微生物细胞的渗透压，限制其生长发育，甚至导致死亡。*Lactobacillus apis* A9 在质量分数为 2% 的 NaCl 环境中的存活率为 95.67%；质量分数为 4% 的 NaCl 环境中的存活率为 89.44%；质量分数为 6% 的 NaCl 环境中的存活率为 78.27%。在质量分数为 15% 的葡萄糖环境中存活率为 96.67%；质量分数为 20% 的葡萄糖环境下存活率 92.44%；质量分数为 30% 的葡萄糖环境下存活率 88.27%。随着溶液浓度的增加，存活率下

降，但都具有较高存活率（图 17、18）。由此可知，*Lactobacillus apis* A9 具有良好的耐高渗能力。

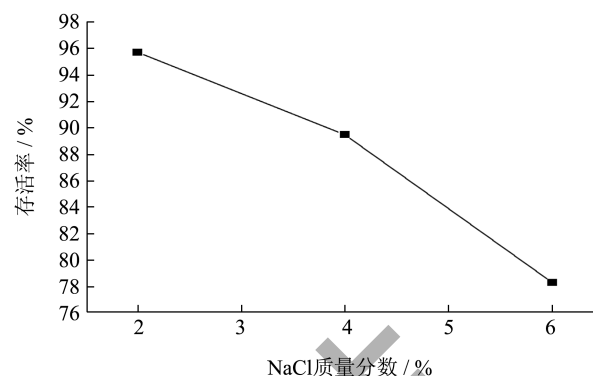


图 18 NaCl 耐受实验结果

Fig.18 Results of NaCl tolerance experiment

## 2.7 吸附重金属铅的能力

### 2.7.1 重金属 Pb<sup>2+</sup> 的吸附率

随着重金属离子浓度从 0.062 5 mmol/L 到 0.25 mmol/L，吸附率呈现上升趋势，在重金属 Pb<sup>2+</sup> 的浓度为 0.25 mmol/L 时达到最大吸附率 55.53%，之后随浓度的升高吸附率降低。这可能是因为菌体与重金属接触后，低浓度条件下菌体的表面与重金属的结合位点相对宽裕，结合位点比金属离子的量相对较高，因此吸附率逐渐升高；当金属离子相对较高的量之后，菌体表面与重金属的结合的位点逐渐饱和，随后菌体对重金属离子的吸附率逐渐降低。*Lactobacillus apis* A9 对铅的吸附率 55.53%，低于 Tian 等<sup>[8]</sup>报道的植物乳植杆菌 CCFM8661 对铅离子吸附率 73.79%，接近于 Halttunen 等<sup>[26]</sup>研究的 *Lactobacillus rhamnosus* GG 的吸附率 60.1% 和 *Lactobacillus rhamnosus* LC705 的吸附率 45%，高于张奕吉等<sup>[27]</sup>报道的植物乳植杆菌 X7021 的吸附率 38%，远高于李冉等<sup>[28]</sup>报道的源于矿区泡菜样品中的植物乳植杆菌对铅去除率 5%。由此可知，本研究分离出的 *Lactobacillus apis* A9 对重金属铅的吸附效果表现优异。

表 4 *Lactobacillus apis* A9 对不同浓度 Pb<sup>2+</sup> 的吸附率

Table 4 Adsorption rates of Pb<sup>2+</sup> with different concentrations of *Lactobacillus apis* A9

样品	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
吸附前 Pb <sup>2+</sup> 质量浓度 (mg/L)	23.69	47.42	94.84	189.66	284.50
吸附后 Pb <sup>2+</sup> 质量浓度 (mg/L)	16.44	26.03	42.18	105.81	182.42
A9 的吸附率 / %	30.60	45.10	55.53	44.21	35.88

### 2.7.2 扫描电镜-X射线能谱分析

乳杆菌表面的胞外多糖富含酸性官能团，能够结合重金属  $Pb^{2+}$ [29]。实验结果表明，实验组菌体表面出现褶皱（图 19），测得其附着有重金属铅，扫描菌体表明，铅元素质量百分比达到 5.90%，空白组则没有检测到铅元素（表 5 和图 19），说明 *Lactobacillus apis* A9 菌体吸附  $Pb^{2+}$  效果良好。

表 5 *Lactobacillus apis* A9对 $Pb^{2+}$ 的吸附质量百分比  
Table 5 Percentage of  $Pb^{2+}$  adsorption by weight with *Lactobacillus apis* A9

	元素	百分比	
		质量	原子
空白对照组	C K	47.34	54.35
	N K	10.61	10.45
	O K	39.67	34.19
	P K	1.98	0.88
	S K	0.14	0.06
	Mn K	0.26	0.07
A9 处理组	C K	44.28	53.93
	N K	12.16	12.70
	O K	34.37	31.43
	Na K	0.36	0.23
	P K	2.49	1.18
	Mn K	0.44	0.12
	Pb M	5.90	0.42
总量	100.00		

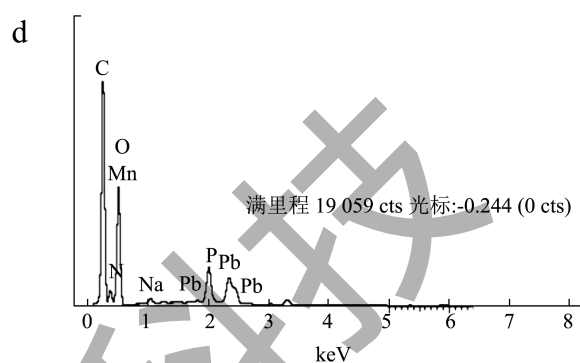
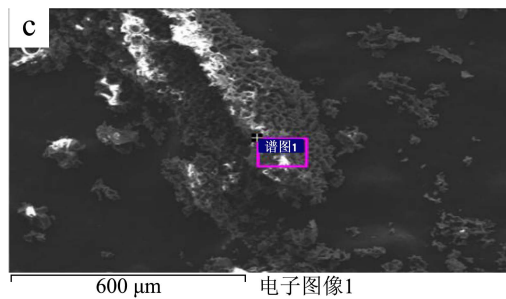
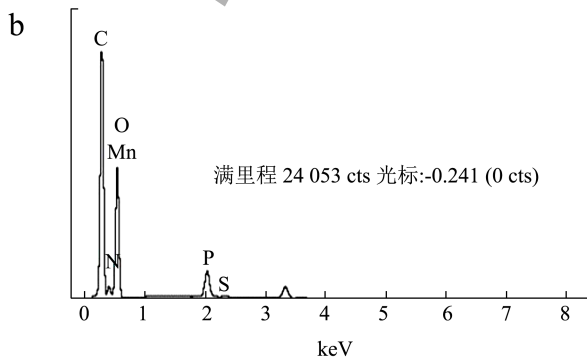
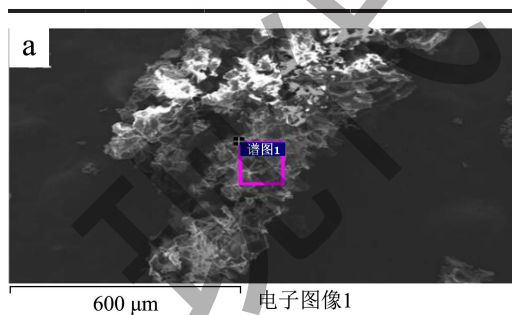


图 19 *Lactobacillus apis* A9 吸收  $Pb^{2+}$  的扫描电镜谱图

Fig.19 SEM spectra of  $Pb^{2+}$  absorption by *Lactobacillus apis* A9

注：(a) 未吸附前菌体扫描电镜图，(b) 未吸附前菌体扫描能谱图，(c) *Lactobacillus apis* A9 吸附  $Pb^{2+}$  后扫描电镜图，(d) *Lactobacillus apis* A9 吸附  $Pb^{2+}$  后扫描能谱图。

### 2.7.3 傅里叶变换红外

傅里叶变换红外光谱结果显示，吸附铅离子后菌体与空白菌体的红外光谱相比，红外光谱图出现了以下三点变化：

(1) 在  $3300\sim3500\text{ cm}^{-1}$  范围内， $3301\text{ cm}^{-1}$  的峰变得更宽阔（图 20，曲线 A 和 B），在  $1641\text{ cm}^{-1}$  处的峰为羰基（ $-C=O$ ）的拉伸振动，这证实了 *Lactobacillus apis* A9 菌体吸附铅离子后，表面的羟基或氨基基团与铅离子发生了明显相互作用；

(2) 酰胺 I 带（ $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ ）包含了  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角、无规则卷曲结构等蛋白质丰富的二级结构信息[30]。对照组的酰胺 I 带在  $1670\text{ cm}^{-1}$ 、 $1683\text{ cm}^{-1}$  有两处  $\beta$  转角、 $1639\text{ cm}^{-1}$  处有无规则卷曲结构；经过  $Pb^{2+}$  处理后（图 21），酰胺 I 带中增加了  $1652\text{ cm}^{-1}$  和  $1658\text{ cm}^{-1}$  的峰，表明增加了  $\alpha$  螺旋结构；同时，增加了  $1670\text{ cm}^{-1}$ 、 $1675\text{ cm}^{-1}$  和  $1688\text{ cm}^{-1}$  三处的峰，表明增强了  $\beta$  转角； $1643\text{ cm}^{-1}$  峰，表明具有无规则卷曲结构；

(3) 酰胺 III 带（ $1220\sim1330\text{ cm}^{-1}$ ）是酰胺 I 带的补充，可以区分蛋白质二级结构中的  $\alpha$  螺旋与无

规则卷曲结构。由图 21 可知, 对照组酰胺 III 带  $\beta$  折叠在  $1\ 224\ \text{cm}^{-1}$  处; 当用  $\text{Pb}^{2+}$  处理后, 酰胺 III 带无  $\beta$  折叠结构。

因此, 红外光谱分析表明, *Lactobacillus apis* A9 菌体通过吸附  $\text{Pb}^{2+}$ , 使得菌体表面的蛋白质二级结构发生变化, 在吸附过程中羟基和氨基发挥主要作用。

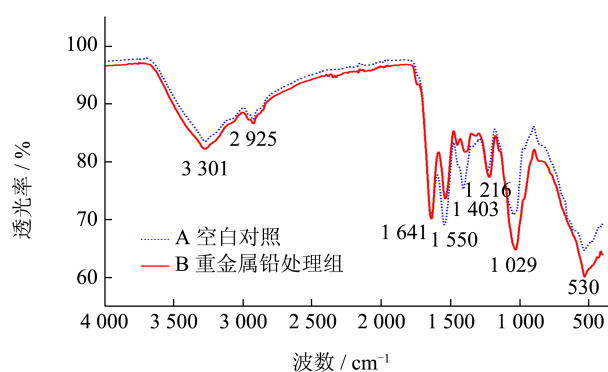


图 20 *Lactobacillus apis* A9 吸收  $\text{Pb}^{2+}$  前后的红外光谱图  
Fig.20 Infrared spectra of *Lactobacillus apis* A9 before and after absorption of  $\text{Pb}^{2+}$

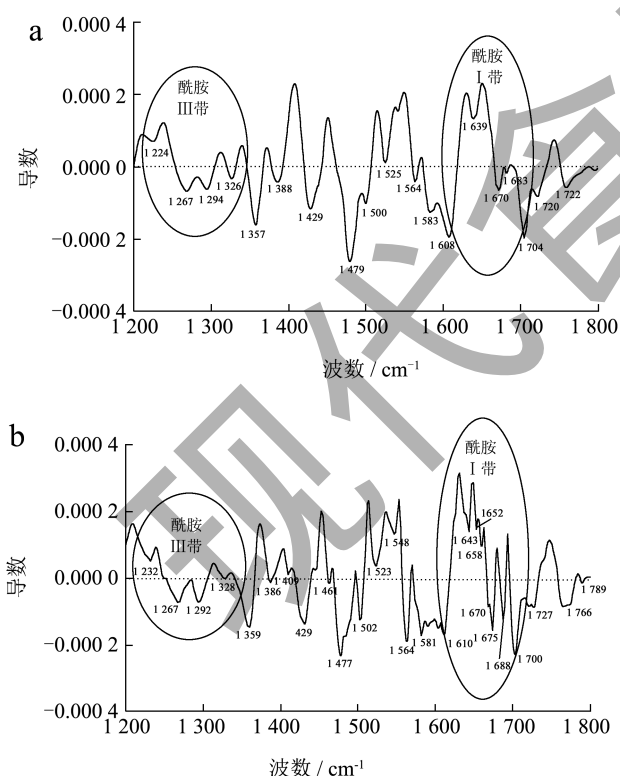


图 21 *Lactobacillus apis* A9 吸收  $\text{Pb}^{2+}$  前后的红外酰胺带分析图

Fig.21 Infrared amide band analysis of *Lactobacillus apis* A9 before and after absorption of  $\text{Pb}^{2+}$

注: a 为吸附前, b 为吸附后。

### 3 结论

乳酸菌在改善食品的营养、感官和以及延长货架期等方面发挥良好作用, 进入肠道后, 产生生物活性代谢物、调节肠道免疫、保护肠道机械屏障和调节肠道菌群, 维持宿主肠道菌群的稳态。近年来有很多研究者从矿区、泡菜等不同环境中筛选出具有吸附重金属功能的乳酸菌, 用于改善重金属的污染, 表现出环保、低成本、高效率等优点, 弥补了物理和化学方法去除食品中的重金属的成本高, 破坏食品营养成分等不足。

本研究从蜂蜜中分离出一株乳杆菌, 经系统鉴定命名为艾皮斯乳杆菌 A9 (*Lactobacillus apis* A9)。研究表明该菌具有良好的安全性和高自聚集性、较低疏水性, 以及耐酸、耐胆盐和耐高渗的益生特性。该菌具有很好的吸附重金属铅的能力, 吸附后菌体表面的铅占元素百分比为 5.9%。在铅吸附过程中, 菌体表面的羟基、氨基基团与铅离子发生了相互作用, 菌体蛋白质的二级结构增加了  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  转角, 减少了  $\beta$  折叠。

目前, 对 *Lactobacillus apis* A9 的安全性及益生功能研究仅限于体外实验, 下一步将利用该菌进行动物实验和人体实验, 探究其在体内吸附重金属铅的益生能力及其机制。未来可以将其作为食物来源益生菌的后备优质菌株, 为蜂蜜中乳杆菌的开发利用, 提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] SUISSA R, OVIED R, JANKELOWITZ G, et al. Molecular genetics for probiotic engineering: Dissecting lactic acid bacteria [J]. Trends in Microbiology, 2022, 30(3): 293-306.
- [2] MINJ J, CHANDRA P, PAUL C, et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(13): 2207-2224.
- [3] ZHENG J, WITTOUCK S, SALVETTI E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(4): 2782-2858.
- [4] 沈文权, 高西贝, 钱星宇, 等. 蜜蜂肠道中乳酸杆菌最新分类[J]. 中国蜂业, 2023, 74(5): 62-66.



- [5] LI L, CWYN S, FENG Z, et al. Gut microbiome drives individual memory variation in bumblebees [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6588-6588.
- [6] GHAMRY M, ZHAO W, LI L. Impact of *Lactobacillus apis* on the antioxidant activity, phytic acid degradation, nutraceutical value and flavor properties of fermented wheat bran, compared to *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Research International, 2023, 163: 112-142.
- [7] PAKDEL M, SOLEIMANIAN-ZAD S, AKBARI-ALAVIJEH S. Screening of lactic acid bacteria to detect potent biosorbents of lead and cadmium [J]. Food Control, 2019, 100: 144-150.
- [8] TIAN F, ZHAI Q, ZHAO J, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice [J]. Biological Trace Element Research, 2012, 150: 264-271.
- [9] COX R P, THOMSEN J K. Computer-aided identification of lactic acid bacteria using the API 50 CHL system [J]. Letters in Applied Microbiology, 1990, 10(6): 257-259.
- [10] HALL B G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(5): 1229-1235.
- [11] NAMI Y, BAKHSHAYESH R V, MANAFI M, et al. Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic *Lactobacillus plantarum* YS5 isolated from yogurt [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 876-882.
- [12] 李蕊婷, 卢士玲, 李开雄, 等. 新疆熏马肠中产氨基酸脱羧酶优势细菌的分离及鉴定[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 85-91.
- [13] SAMEDI L, CHARLES A L. Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding [J]. Annals of Agricultural Sciences, 2019, 64(1): 55-62.
- [14] SHEKH S L, DAVE J M, VYAS B R M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and  $\gamma$ -amino butyric acid production [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 234-241.
- [15] KOTZAMANIDIS C, KOURELIS A, LITOPOULOU T 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(2-3): 154-163.
- [16] 尹春媚, 李贞, 姜铁民, 等. 人母乳源乳酸菌的筛选、鉴定及其降血压能力的初步测定[J]. 食品科技, 2019, 44(8): 18-22.
- [17] 张岩, 李键, 刘鲁蜀, 等. 从藏区传统酸乳中筛选牦牛乳乳酪生产菌株及其生化鉴定[J]. 食品科技, 2016, 9: 18-24.
- [18] GE N, XU J, PENG B, et al. Adsorption mechanism of tenuazonic acid using inactivated lactic acid bacteria [J]. Food Control, 2017, 82: 274-282.
- [19] 柳青, 史迪, 刘文俊, 等. 摩洛哥自然发酵驼乳中乳酸菌分离鉴定及特性研究[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(4): 85-95.
- [20] 郑琦锴, 蔡常宇, 王临好, 等. 传统泡菜中高产产酸乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 96-105.
- [21] YULAH J, HYEMIN K, YEON J L, et al. The antioxidant, anti-diabetic, and anti-adipogenesis potential and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human and fermented foods [J]. Fermentation, 2021, 7(3): 123-123.
- [22] 达菊庆, 武运, 吴聪, 等. 新疆昌吉奶疙瘩中乳酸菌的分离鉴定及发酵杏酱性能分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 12(4): 1-11.
- [23] LIU A, LIU G, HUANG C, et al. The bacterial diversity of ripened Guang'yuan Suancai and *in vitro* evaluation of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from Suancai [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 85: 175-180.
- [24] 万倩, 李启明, 吴华星, 等. 传统发酵食品中乳酸菌的安全性评估[J]. 现代食品科技, 2021, 37(6): 276-286.
- [25] 吴雨晗, 吴婷, 涂健, 等. 一株安庆六白猪源乳酸菌的分离鉴定及生物特性研究[J]. 动物营养学报, 2022, 34(8): 5415-5425.
- [26] HALTTUNEN T, COLLADO M C, EI-NEZAMI H, et al. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution [J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(2): 160-165.
- [27] 张奕吉, 杜磊, 谢静莉, 等. 植物乳杆菌X7021吸附重金属和降解亚硝酸盐能力的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4786-4792.
- [28] 李冉, 欧杰, 代启虎, 等. 植物乳杆菌对重金属 $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ 和 $Cu^{2+}$ 的耐受性与吸附作用相关性比较[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(1): 52-58.
- [29] GERBINO E, MOBILIP, TYMCZYSZYN E, et al. FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus* kefir S-layers and metal ions [J]. Journal of Molecular Structure, 2011, 987(1-3): 186-192.
- [30] GHIMIRE H, GARLAPATI C, JANSSEN E A M, et al. Protein conformational changes in breast cancer sera using infrared spectroscopic analysis [J]. Cancers, 2020, 12(7): 1708.