

# 婴儿源益生性双歧杆菌的筛选及肠道定殖性研究

韩俊燕, 赵国忠, 杨波, 刘小鸣, 张灏, 陈卫

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 本研究旨在从婴儿粪便中筛选出具有潜在益生特性的双歧杆菌, 并探究其肠道定殖情况, 为双歧杆菌的产品开发提供优良的菌株。采用 MRS 培养基对样品进行分离纯化, 菌株经 F6PPK 检测及 16S rDNA 测序鉴定, 之后进行模拟胃肠液、胆盐耐受性、对食源性致病菌(大肠杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌等)的抑制及对 HT-29 细胞的粘附能力测定, 将筛选出的菌株进行动物实验, 测定其肠道定殖能力。分离到的 27 株双歧杆菌, 经分子生物学鉴定为 7 个不同的种: *Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium pseudocatenulatum*、*Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium animalis* 和 *Bifidobacterium adolescentis*。体外实验表明, *B. longum* A9、*B. breve* A4、*B. bifidum* B6、*B. longum* C6、*B. adolescentis* F8 和 *B. infantis* H6 等具有较强的潜在益生特性; 动物实验表明, *B. infantis* H6 和 *B. longum* C6 具有较强的肠道定殖能力。*B. longum* C6 和 *B. infantis* H6 有望作为优良的益生性菌株, 应用于双歧杆菌的产品开发。

**关键词:** 益生特性; 双歧杆菌; 筛选; 定殖

文章编号: 1673-9078(2016)10-14-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.003

## Screening of Probiotic *Bifidobacterium* Strains from Infants and Study of Their Intestinal Colonization Ability

HAN Jun-yan, ZHAO Guo-zhong, YANG Bo, LIU Xiao-ming, ZHANG Hao, CHEN Wei

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

**Abstract:** *Bifidobacterium* strains with potential probiotic properties were screened from infant feces and their colonization ability in the intestine was explored, to provide potential probiotic strains for the development of *Bifidobacterium* products. De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium was used to isolate and purify the samples, and detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) and analysis of 16S rDNA sequences were performed on the strains. The probiotic properties of the strains, including tolerance to simulated gastrointestinal fluids and bile salts, inhibition of foodborne pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, etc.) and adhesion capacity to HT-29 cells were determined. The screened *Bifidobacterium* strains with potential probiotic properties were used in animal experiments to measure their intestinal colonization ability. After isolation, 27 *Bifidobacterium* strains were identified from seven *Bifidobacterium* species using molecular biology: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis*, and *Bifidobacterium adolescentis*. *In vitro* experiments showed that *B. longum* A9, *B. breve* A4, *B. bifidum* B6, *B. longum* C6, *B. adolescentis* F8, and *B. infantis* H6 had stronger potential probiotic properties. The animal experiments showed that *B. infantis* H6 and *B. longum* C6 had stronger gut colonization ability. The results demonstrate that *B. infantis* H6 and *B. longum* C6 have potential as good probiotic *Bifidobacterium* strains that can be applied to the development of *Bifidobacterium* products.

**Key words:** probiotic properties; *Bifidobacterium*; screening; colonization

双歧杆菌是存在于人和其它动物肠道内的一类有益菌, 是属于放线菌门的革兰氏阳性菌<sup>[1]</sup>。人体肠道内双歧杆菌的数量, 在婴幼儿时期含量最为丰富,

收稿日期: 2015-11-12

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31401682); 中国博士后科学基金第八批特别资助(2015T80498)

作者简介: 韩俊燕(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 赵国忠(1983-), 男, 硕士生导师, 研究方向: 食品微生物学、

功能基因组学等

随着年龄的增长, 比例逐渐缩小<sup>[2]</sup>。定殖于人体肠道内的双歧杆菌, 在抵抗微生物感染、缓解腹泻及乳糖不耐、调节炎症、减轻炎症性肠病甚至缓解癌症等方面都发挥着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。众所周知, 耐受肠道内环境并能够在肠道内定殖是益生菌发挥作用的前提条件, 而能否耐受模拟胃肠液和胆盐等常作为益生菌筛选的重要指标<sup>[5]</sup>。

文献调研显示, 国内外学者一致认可双歧杆菌对人体的益生作用, 并且富含双歧杆菌的产品也逐渐面

世,被消费者所接受。然而,纵观整个市场,成功用于乳制品生产的双歧杆菌菌株寥寥无几,仅仅包括用于达能碧悠酸奶中拥有法国专利的乳双歧杆菌 DN-173010 以及源自科汉森被美国 FDA 认证为 GRAS 的乳品发酵剂菌株乳双歧杆菌 BB-12 等少数几株。鉴于对双歧杆菌的科学研究及应用远远不足的现状,筛选出来源于健康人体肠道并且具有潜在益生特性的双歧杆菌菌株,进而开发出具有自主知识产权的双歧杆菌产品,将具有广泛而深远的理论及现实意义。

本研究从采集自无锡地区的健康婴儿粪便中进行双歧杆菌的分离,经分子生物学鉴定得到不同种类的双歧杆菌菌株。然后筛选出肠道耐受性好、能抵抗食源性致病菌、肠道粘附性强并且具有肠道定殖能力的双歧杆菌菌株,为益生菌类产品提供优良的菌株。得到的婴儿双歧杆菌 H6 和长双歧杆菌 C6 有望作为潜在的益生菌,在乳制品、保健食品等领域得到广泛的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验样品

10 份采集自无锡地区出生一个月之内的婴儿新鲜粪便,编号为 A-J。

#### 1.1.2 实验细胞、菌株及动物

人结肠癌细胞系 HT-29 细胞株,购自中国科学院上海细胞库;大肠杆菌 CCFM138,沙门氏菌 CCFM629,单增李斯特菌 CCFM19,动物双歧杆菌 CCFM0224,来自于江南大学食品学院食品微生物保藏中心;实验小鼠 SPF 级雌性 BALB/c (6 周龄),购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

#### 1.1.3 主要试剂及仪器

试剂: L-Cysteine (沪试);低聚果糖 ( $\geq 98\%$ , 上海鼎杰生物技术有限公司); D-果糖-6-磷酸二钠盐 (上海百灵威化学技术有限公司); Tris-饱和酚 (上海生工生物技术有限公司); 2×Taq MasterMix (苏州达麦迪生物医学科技有限公司); 胃蛋白酶 (沪试,  $\geq 1200$  U/g); 胰蛋白酶 (沪试,  $\geq 50000$  U/g); 牛胆盐 (北京索宝生物技术有限公司); RPMI-1640 基础培养基 (苏州英杰生物技术有限公司); 瑞士-姬姆萨染液 (南京建成悦浩科技有限公司); Fast DNA kit for soil 试剂盒 (MPBIO, 北京联立信生物技术有限公司); Gene Clean Turbo 胶回收试剂盒 (MP Biomedicals, 上海安倍医疗器械贸易有限公司); 40% 去离子甲酰胺, 丙烯酰胺 (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺=37.5:1) (上海生工生

物有限公司); Gel-red 染料 (上海开放生物技术有限公司) 等。

小鼠饲料: 商业鼠饲料, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

仪器: 厌氧工作站 (Whitley, DG 250); 微型冷冻离心机 (Eppendorf, 5424 R); PCR 仪 (Bio-Rad, T 100 thermal cycler), 核酸电泳系统 (Bio-Rad), 凝胶成像仪 (Bio-Rad, Universal hood II); 二氧化碳培养箱 (Thermo, 3111); 立体显微镜 (Leica, M205C); SF 2000 三按键电子数显卡尺 (桂林广陆数字测控股份有限公司); 变性梯度凝胶电泳系统 (DGGE, Dcode system, BIO-RAD) 等。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品采集

用一次性无菌取便器采集新鲜粪便样品 10 g 左右,迅速置于冰盒中,于 1 h 之内带到实验室,备用。

### 1.2.2 双歧杆菌的富集及分离纯化

取大约 2 g 的粪便样品,置于以低聚果糖<sup>[6]</sup>为碳源的 MRS+0.5‰ (m/V) L-Cysteine 的液体试管中,于 37 °C 厌氧工作站内培养 12 h;之后,用 0.85% 的生理盐水进行梯度稀释,涂布于添加 0.02% (m/V) 溴甲酚紫的 MRS 固体平板上,厌氧培养 24~48 h;选取菌落数量适中的平板,挑取变色圈明显的菌落进行划线分离 2~3 次,得到纯化的单菌落。

MRS 培养基配方 (1 L): 牛肉膏, 10 g; 胰蛋白胨, 10 g; 酵母粉, 5 g; 葡萄糖, 20 g; 乙酸钠, 5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.05 g; 柠檬酸氢二铵, 2 g;  $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ , 2.61 g; 吐温 80, 1 mL。pH 为  $6.8 \pm 0.2$ 。

### 1.2.3 双歧杆菌的定性鉴定

将得到的单菌落进行革兰氏染色,镜检。双歧杆菌为革兰氏阳性菌,选出革兰氏染色为阳性 (紫色) 的菌株。果糖-6-磷酸磷酸酮解酶 (F6PPK) 是双歧杆菌属细菌所特有的糖类代谢的酶,参照 Scardovi 等<sup>[7]</sup>提出的 F6PPK 酶活测定法进行双歧杆菌的初步鉴定,分别采用大肠杆菌 CCFM138 和动物双歧杆菌 CCFM0224 作为阴性和阳性对照菌株。

### 1.2.4 双歧杆菌的 16S rDNA 鉴定

采用酚-氯仿抽提法提取细菌的基因组 DNA。先用 SDS 裂解菌体,再用 tris 饱和酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 进行抽提,用冰乙醇浓缩后将 DNA 溶于 ddH<sub>2</sub>O 中。采用细菌的通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增出菌株的 16S rDNA 片段,将产物进行琼脂糖凝胶电泳验证后,送至华大基因研究院进行测序,

测序结果用 DNAMAN 软件进行拼接后在 NCBI 上进行 Blast, 确定其种属。

### 1.2.5 双歧杆菌对模拟胃、肠液及胆盐的耐受性

参照 W.P.Charteris 等<sup>[8]</sup>和 Valérie Andriantsoanirina 等<sup>[9]</sup>的方法并作适当修改。其中, 模拟胃液: PBS+0.3% 胃蛋白酶, pH=2.0; 模拟肠液: PBS+1%胰蛋白酶, pH=8.0; 胆盐: PBS+0.3%牛胆盐。双歧杆菌的接种量为 4%, 模拟胃、肠液作用时间为 2 h, 胆盐作用时间为 3 h, 耐受性用存活率(公式如下)表示。

$$\text{菌株存活率}(\%) = \lg N_1 / \lg N_2 \times 100\%$$

其中,  $N_1$ 、 $N_2$  分别表示菌株处理之后和初始的活菌数, 单位为 cfu/mL。

### 1.2.6 双歧杆菌对致病菌的抑制

参照 Schillinger 等<sup>[10]</sup>的直接点种法测定双歧杆菌对大肠杆菌、沙门氏菌和单增李斯特菌的抑制作用强弱。双歧杆菌在固体 MRS 平板上的菌悬液点样量为 2  $\mu$ L, 厌氧培养 4 h 后, 将培养过夜的指示菌接种于相应的半固体培养基(大肠杆菌、沙门氏菌用 LB 培养基、单增李斯特菌用 BHI 培养基)上, 混匀后迅速倾倒在双歧杆菌的固体平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 用电子数显卡尺测量抑菌圈的大小。

### 1.2.7 双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附能力

HT-29 细胞是一种易于体外培养的人结肠腺癌细胞, 其细胞形态、粘附能力等与人的肠道上皮细胞类似, 常用来作为体外粘附试验的模型细胞<sup>[11]</sup>。实验步骤: 将冻存管中的 HT-29 细胞用 RPMI-1640 完全培养基(RPMI-1640 基础培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素)进行复苏, 之后传 3~4 代。PBS 清洗, 胰酶消化后用血球计数板进行细胞计数, 调节细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL。将此细胞悬液在二氧化碳培养箱内静置培养 6 h, 使细胞贴壁, 倾去细胞培养液。将培养过夜的双歧杆菌菌悬液用 RPMI-1640 基础培养基调整菌悬液浓度为  $10^7$  cfu/mL, 与 HT-29 细胞共培养 2 h。之后用 PBS 洗去未粘附的双歧杆菌, 甲醇固定后用瑞士-姬姆萨染液进行染色。用 PBS 洗去染液, 自然干燥后用油镜进行观察, 随机选取 20 个视野进行计数。细菌数低于 40 说明不粘附, 在 40~100 之间说明粘附能力较弱, 大于 100 说明粘附能力很强<sup>[12]</sup>。

### 1.2.8 动物实验

基于伦理及安全性等方面的考虑, 益生菌的定殖作用无法直接在人体内进行试验。而小鼠作为一种生物实验中广泛应用的模式动物, 其肠道微生物与人体肠道微生物存在一定程度的相似性, 因此常用小鼠来进行关于肠道微生物方面的研究<sup>[13]</sup>。本试验也采用了

小鼠模型。动物实验方案: SPF 级雌性 BALB/c (6 周龄) 小鼠, 摄入的菌为几株(根据菌的益生特性测定结果进行的选择)不同种的双歧杆菌菌株。实验周期为六周, 分为适应期、灌胃期和恢复期三个阶段, 每个阶段各两周。在灌胃期, 每天收集双歧杆菌的新鲜菌体, 用生理盐水调整菌悬液的浓度为  $10^9$  cfu/mL, 灌胃量为 200  $\mu$ L, 确保每种菌的摄入量为  $10^8$  cfu/d, 对照组灌胃等量的生理盐水。收集小鼠在不同实验阶段的粪便, 置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

### 1.2.9 DNA 提取, PCR-DGGE 检测双歧杆菌在小鼠肠道中的定殖

称取 100 mg 小鼠粪便, 按照 Fast DNA kit for soil 试剂盒说明书提取粪便中细菌的总 DNA。同时, 采用酚-氯仿法提取摄入的双歧杆菌的 DNA。之后, 分别以粪便中细菌的总 DNA 和双歧杆菌的 DNA 为模板, 采用细菌的通用引物 338f-GC (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG) 和 518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG) 扩增其 16S rDNA V3 区。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}$ C、5 min; 94  $^{\circ}$ C、45 s; 65  $^{\circ}$ C、45 s (每个循环降 0.5  $^{\circ}$ C); 72  $^{\circ}$ C、30 s; 20 个循环, 94  $^{\circ}$ C、50 s; 55  $^{\circ}$ C、55 s; 72  $^{\circ}$ C、30 s (15 个循环); 72  $^{\circ}$ C、10 min。产物用琼脂糖凝胶电泳验证后用 GeneClean Turbo 胶纯化试剂盒回收。

DGGE: 首先, 配制 30%~70%的丙烯酰胺变性胶, 缓冲液为 1 $\times$ TAE, 按照 Decode system (Bio-Rad Laboratories, Inc.)的说明书步骤进行操作。将 PCR 产物用 NanoDrop 2000 测定浓度后调整上样量为 1000 ng, 与 Loading buffer 混合后点样。程序为: 120 V, 10 min; 80 V, 12 h。缓冲液的温度为 60  $^{\circ}$ C。电泳结束后, 用 Gel-red 染料进行染色 30 min, 水洗, 之后用凝胶成像仪拍照。

## 1.3 数据分析

用 SPSS 17.0 对实验数据进行分析, Origin 8.0 进行绘图, 用 Image Lab 3.0 软件对 DGGE 图谱来分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 双歧杆菌的定性鉴定

10 份样品经分离纯化后共得到 284 个单菌落, 经革兰氏染色后, 得到 215 株革兰氏阳性菌, 部分结果如图 1a 所示。经 F6PPK 酶测定后, 共得到 104 株 F6PPK 酶阳性菌, 部分结果如图 1b 所示。由此可知, 婴儿粪便中细菌种类繁多, 使用乳酸菌选择性培养基

MRS 进行分离后,除了能分离到可能的目标双歧杆菌菌株外,还可能分离到一些乳杆菌和肠杆菌等<sup>[14-15]</sup>。

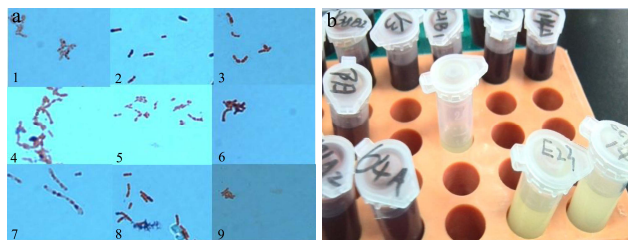


图1 细菌革兰氏染色 (a) 和 F6PPK 酶测定 (b) 结果

Fig.1 Bacterial Gram staining (a) and F6PPK enzyme assay (b)

results

注: 革兰氏染色阳性 (紫色), 阴性 (红色); F6PPK 阳性 (红色), 阴性 (无色)。

## 2.2 双歧杆菌的 16S rDNA 鉴定

104 株双歧杆菌的 16S rDNA 两端测定序列用 DNAMAN 软件进行拼接之后得到 1500 bp 左右的目的片段,通过 NCBI Blast 比对分析,再结合菌株的来源、菌落形态及菌体镜检形态,初步确定为 27 株不同的双歧杆菌,结果如表 1 所示。由结果可知,婴儿肠道中双歧杆菌种类颇多,并且长双歧杆菌含量丰富,与文献报道相一致<sup>[16-17]</sup>。

表 1 双歧杆菌的 16S rDNA 鉴定结果

Table 1 16S rDNA identification results of bifidobacteria

菌株编号	比对结果	相似度	菌株来源 (样品编号)
A1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	A
A4	<i>Bifidobacterium breve</i>	100	A
A6	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	99	A
A9	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99	A
B2	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	B
B6	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	100	B
C1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	C
C3	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	C
C6	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	C
C11	<i>Bifidobacterium breve</i>	100	C
C17	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	100	C
C20	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	99	C
C26	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	99	C
D1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	D
D4	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	D
E1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	E
E5	<i>Bifidobacterium breve</i>	100	E
E9	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	100	E
E12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	99	E
F2	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	F
F8	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	100	F
F11	<i>Bifidobacterium breve</i>	100	F
G1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	G
G8	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	99	G
H1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	H
H6	<i>Bifidobacterium infantis</i>	99	H
I1	<i>Bifidobacterium longum</i>	100	I

## 2.3 双歧杆菌对模拟胃、肠液、胆盐的耐受性

以及对致病菌的抑制

良好的耐酸性,是双歧杆菌能够在宿主体内发生作用的前提条件。同时,耐胆盐、抑菌等也是双歧杆菌能够在人体肠道内存活的重要性质。

如表 2 所示, 28 株双歧杆菌 (27 株分离得到的

+1 株对照菌株 (CCFM0224) 对模拟胃、肠液、胆盐的耐受性以及致病菌 (大肠杆菌、沙门氏菌和单增李斯特菌) 的抑制作用有较大的差异, 存在明显的菌株特异性。其中, 从种的水平上讲, 动物双歧杆菌 D4 和 CCFM0224 对模拟胃液的耐受性最强, 可能与动物

双歧内存在能够耐酸的蛋白质有关<sup>[18]</sup>。综合考虑, 其中对模拟胃、肠液、胆盐的耐受性以及致病菌的抑制作用较强的菌株有 A4、A9、B6、C6、C17、D4、F8、H6 和 CCFM0224。

表 2 28 株双歧杆菌对模拟胃、肠液、胆盐的耐受性以及致病菌的抑制

Table 2 Simulated gastric, intestinal, and bile salt tolerances of 28 *Bifidobacterium* strains and their inhibitory effects on pathogenic bacteria

菌株编号	耐受性 <sup>a</sup>			抑菌 <sup>b</sup>		
	胃液	肠液	胆盐	大肠杆菌	沙门氏菌	单增李斯特菌
A1	-	-	-	+	-	-
A4	+	+	+	-	+	-
A6	-	-	-	+	-	-
A9	+	+	+	++	++	++
B2	-	-	-	+	-	-
B6	+	+	+	+	+	-
C1	+	-	-	+	-	-
C3	-	-	-	+	-	-
C6	+	+	++	+	-	-
C11	+	-	-	-	+	-
C17	+	+	+	+	-	-
C20	-	-	-	-	-	-
C26	+	-	-	+	++	+
D1	-	-	-	-	-	-
D4	++	+	+	-	-	-
E1	-	-	-	-	-	-
E5	-	-	+	-	+	-
E9	-	-	-	+	-	-
E12	+	-	-	-	-	-
F2	-	+	+	-	-	-
F8	+	+	++	+	+	+
F11	-	-	-	-	+	-
G1	-	-	-	-	-	-
G8	+	+	-	-	-	-
H1	-	-	-	-	-	-
H6	+	+	+	-	-	+
I1	-	+	-	+	-	-
CCFM0224	++	+	+	+	+	+

注: <sup>a</sup>, 存活率低于 1%; +, 1% < 存活率 < 10%; ++, 存活率高于 10%; <sup>b</sup>, 抑菌圈直径 < 1 mm; +, 1 mm < 抑菌圈直径 < 5 mm; ++, 抑菌圈直径 > 5 mm。

### 2.4 双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附能力

采用双歧杆菌与细胞共培养的方法测定了 A4、A9、B6、C6、C17、D4、F8、H6 和 CCFM0224 共 9 株双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附能力强弱, 显微镜观

察结果如图 2a 所示。为了更直观地比较每株菌的粘附能力强弱, 将实验结果表示为图 2b 所示。结果显示, 菌株的粘附能力存在显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 菌株 C17 (粘附数  $14 \pm 2$ ) 无粘附能力, 菌株 A4、D4、H6 的粘附能力较弱, 菌株 A9、B6、C6、F8、CCFM0224 有

很强的粘附能力,并且菌株 B6 (粘附数 1242±86) 的粘附能力最强。

微生物粘附到肠粘膜的表面常被认为是其肠道定殖的前提条件,因此粘附能力也常作为益生菌筛选的主要指标。而不同种类的双歧杆菌,其肠道粘附能力差别很大<sup>[19]</sup>,与本文所得结果相一致。

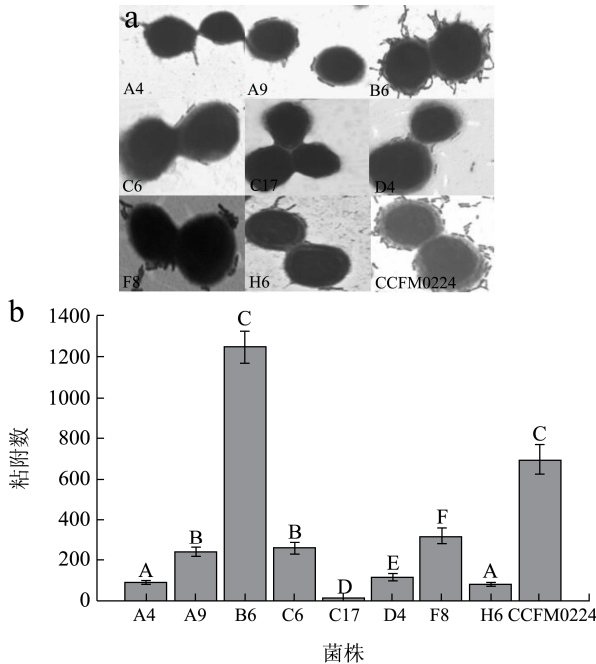


图2 双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附

Fig.2 Adhesion capacity of *Bifidobacterium* strains to HT-29 cells

注: (a) 双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附,显微镜观察结果 (1000×); (b) 双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附结果,平均值±标准差。不同字母表示差异性显著 ( $p < 0.05$ )。

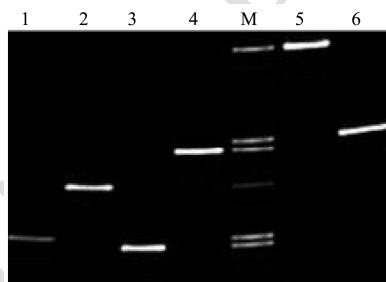


图3 双歧杆菌 16S rDNA 区 V3 PCR-DGGE Marker

Fig.3 PCR-DGGE fingerprint patterns of *Bifidobacterium* markers using the V3 region of 16S rDNA

注: 1, *B. animalis* CCFM0224; 2, *B. bifidum* B6; 3, *B. adolescentis* F8; 4, *B. infantis* H6; 5, *B. breve* A4; 6, *B. longum* C6; M, 6 菌株的混合条带。

## 2.5 双歧杆菌在小鼠肠道内的定殖

根据双歧杆菌的益生特性测定结果,选取了不同的 6 株 (短双歧杆菌 A4、长双歧杆菌 C6、婴儿双

歧杆菌 H6、两歧双歧杆菌 B6、动物双歧杆菌 CCFM0224、青春双歧杆菌 F8) 双歧杆菌进行动物实验,研究它们在小鼠体内的定殖情况。

### 2.5.1 双歧杆菌 Marker 指纹图谱的建立

以 6 株双歧杆菌 16S V3 区的 PCR 产物的混合物作为 Marker,与单株菌的 PCR 产物同时进行 DGGE,以建立双歧杆菌 Marker 指纹图谱。如图 3 所示,6 株双歧杆菌的 16S V3 区的 PCR 产物在泳道内迁移的位置不同,可以完全地分离开来,并且混合后的 PCR 产物条带之间也彼此不受影响。

### 2.5.2 6 株双歧杆菌在小鼠肠道内的定殖

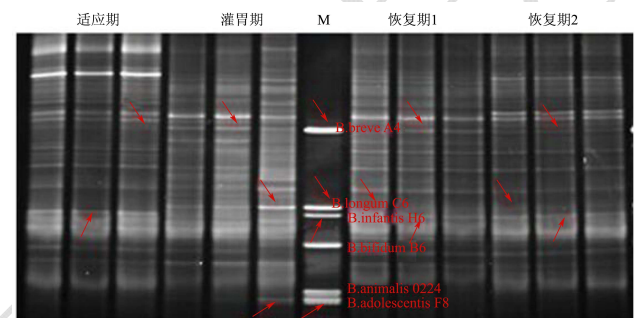


图4 不同时期小鼠粪便基因组 16S rDNA V3 区 DGGE 图谱

Fig.4 DGGE fingerprint of the V3 region of 16S rDNA from mouse fecal DNA in different periods

如图 4 所示,通过比较泳道内条带与 Marker 条带的位置,可以定性确定每种双歧杆菌在小鼠肠道内的能否定殖以及定殖时间长短的情况。运用 Image Lab 软件分析 DGGE 图谱中各条带的相对含量,可以相对定量表示每种双歧杆菌在小鼠肠道内的定殖情况,结果如图 5 所示。由图可知, *B. breve* 在整个实验周期内均存在,在灌胃期含量显著增加 (由 0.60% 增加到 2.10%),而在恢复期又逐渐恢复到之前的水平,说明 *B. breve* A4 能够在小鼠体内积累,而并不能长期定殖。摄入 *B. longum* C6 后,在恢复期末期 *B. longum* 的含量仍能达到 2.00%,表明 *B. longum* C6 能够较好地小鼠体内定殖。*B. infantis* 的含量在恢复期呈现出增加的趋势 (由 8.30% 增加到 9.20%),说明 *B. infantis* H6 在小鼠体内具有较强的定殖能力。在恢复期,检测不到 *B. bifidum*、*B. animalis* 和 *B. adolescentis* F8 的条带,说明 *B. bifidum* B6、*B. animalis* CCFM0224 以及 *B. adolescentis* F8 都不能够在小鼠体内定殖。表明了灌胃期,出现了明显的 *B. longum* C6 和 *B. adolescentis* F8 的条带,说明其能够在小鼠肠道内存活下来<sup>[11]</sup>,与文中 C6、F8 具有较好的耐酸、耐胆盐的性质相符合。粘附能力最好的 *B. bifidum* B6,并没有表现出肠道定殖的能力,说明还有其他的因素影响到菌株的肠道定殖情况,可能与灌胃的混合菌株之间的相互作用以及菌株

与肠道固有菌群之间的相互作用等<sup>[20]</sup>有关。

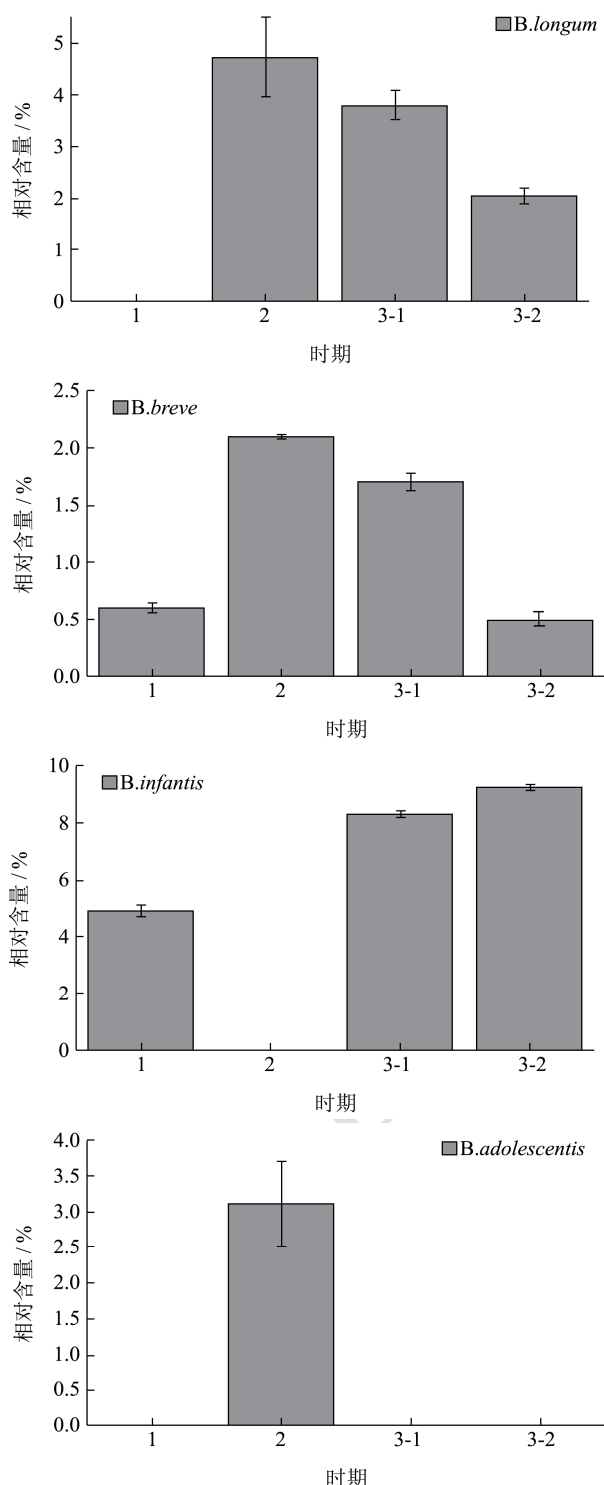


图5 不同时期小鼠粪便中双歧杆菌的含量变化

Fig.5 Content changes of *Bifidobacterium* species in mouse feces during the different periods

注: 横坐标 1 表示适应期; 2 表示灌胃期; 3-1 表示恢复期 1; 3-2 表示恢复期 2。

研究结果显示, 不同双歧杆菌的益生特性以及肠道定殖能力存在明显的差异性, 定殖能力可能与其耐受肠道内环境、粘附等性质具有一定的相关性。国内

外学者对双歧杆菌的研究大都集中在从不同来源的样品中分离鉴定双歧杆菌<sup>[21]</sup>或者研究双歧杆菌对肠道微生物的影响<sup>[22]</sup>等, 本文的研究思路, 与 C.N. Jacobsen 等<sup>[12]</sup>对乳杆菌的研究具有异曲同工之处, 但是本文先从婴儿粪便中分离出双歧杆菌再进一步研究其益生特性及定殖性, 内容完整丰富, 并且菌株的来源公认为安全, 因而具有潜在的实际应用价值。

### 3 结论

3.1 本文从 10 份出生一个月之内的婴儿新鲜粪便中共分离得到了 27 株双歧杆菌, A4、A9、B6、C6、C17、D4、F8、H6 和 CCFM0224 具有较好的对模拟胃、肠液及胆盐的耐受性以及对致病菌(大肠杆菌、沙门氏菌和单增李斯特菌)的抑制作用, 同时 A9、B6、C6、F8 和 CCFM0224 具有较强的对 HT-29 细胞的粘附能力。动物实验表明, *B. infantis* H6 和 *B. longum* C6 具有较好的肠道定殖能力。*B. infantis* H6 和 *B. longum* C6 有望作为益生菌株, 应用于双歧杆菌的产品开发。

3.2 体外实验与体内实验的研究表明, 多种因素会影响到双歧杆菌的肠道定殖能力, 具体机制有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Ventura M, Turrón F, van Sinderen D. Bifidobacteria of the human gut: our special friends [J]. *Diet-Microbe Interactions in the Gut*, 2015: 41-51
- [2] Collado M C, Sanz Y. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(3): 560-563
- [3] Leahy S C, Higgins D G, Fitzgerald G F, et al. Getting better with bifidobacteria [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(6): 1303-1315
- [4] Saez-Lara M J, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, et al. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials [J]. *Bio. Med. Research International*, 2015
- [5] González-Rodríguez I, Ruiz L, Gueimonde M, et al. Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 340(1): 1-10
- [6] Gibson G R, Beatty E R, Wang X, et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and

- inulin [J]. *Gastroenterology*, 1995, 108(4): 975-982
- [7] Scardovi V, Trovatielli L D. The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium* [J]. *Ann. Microbiol.*, 1965, 15: 19-29
- [8] Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, et al. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84(5): 759-768
- [9] Andriantsoanirina V, Allano S, Butel M J, et al. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen [J]. *Anaerobe*, 2013, 21: 39-42
- [10] Schillinger U, Lücke F K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 1901-1906
- [11] J Fogh. Human tumor cells *in vitro* [M]. New York: Springer Science & Business Media, 1975
- [12] Jacobsen C N, Nielsen V R, Hayford A E, et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 4949-4956
- [13] Nguyen T L A, Vieira-Silva S, Liston A, et al. How informative is the mouse for human gut microbiota research? [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2015, 8(1): 1-16
- [14] 韩彤妍,李在玲,叶鸿瑁.新生儿和婴儿肠道菌群的构成及影响因素[J].实用儿科临床杂志,2006,21(2):119-121  
HAN Tong-yan, LI Zai-ling, YE Hong-mao. Newborn and infant intestinal flora composition and influencing factors [J]. *Journal of Clinical Pediatrics*, 2006, 21(2): 119-121
- [15] Rubio R, Jofré A, Martín B, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages [J]. *Food Microbiology*, 2014, 38: 303-311
- [16] Turrone F, Peano C, Pass D A, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota [J]. *Plos One*, 2012, 7(5): e36957
- [17] Underwood, M A, German J B, Lebrilla C B, et al. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: Champion colonizer of the infant gut [J]. *Pediatric Research*, 2015, 77: 229-235
- [18] Sanchez B, Ruiz L, De Los Reyes-Gavilan C G, et al. Proteomics of stress response in *Bifidobacterium* [J]. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 2007, 13: 6905-6919
- [19] He F, Ouwehand A C, Isolauri E, et al. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants [J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2001, 30(1): 43-47
- [20] McNulty N P, Yatsunenkov T, Hsiao A, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins [J]. *Science Translational Medicine*, 2011, 3, 106
- [21] 高鹏飞,孙志宏,麻士卫,等.蒙古族儿童源益生特性双歧杆菌的筛选及鉴定[J].微生物学报,2009,49(2):210-216  
GAO Peng-fei, SUN Zhi-hong, MA Shi-wei, et al. Screening and identification of probiotic *Bifidobacterium* from Mongolian children [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(2): 210-216
- [22] Singh N, Arioli S, Wang A, et al. Impact of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 on mouse intestinal microorganisms [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 85(2): 369-375