

## 植物乳杆菌 C10 的分离鉴定及其对重金属铅的吸附作用

高西贝<sup>1,2</sup>, 沈文权<sup>2</sup>, 张羽<sup>3</sup>, 张红城<sup>1,2</sup>, 张根生<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>哈尔滨商业大学食品工程学院 哈尔滨 150000

<sup>2</sup>资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093

<sup>3</sup>江苏蜂奥生物科技有限公司 江苏泰州 225300)

**摘要** 目的:从蜂蜜中分离纯化出对重金属铅具有高吸附率并可食用的益生乳杆菌。方法:对分离纯化的菌株做生理生化试验,并基于 16s rDNA 建立系统发育树进行分类学鉴定。通过溶血、明胶酶活性、硝酸盐还原及氨基酸脱羧酶、自聚集及疏水性、耐酸耐胆盐、抗菌药物敏感性评估菌株的益生特性。采用电感耦合等离子体发射光谱测定吸附前、后溶液中 Pb<sup>2+</sup>含量。探讨菌株吸附重金属的能力。使用扫描电镜-X 射线能谱观察吸附前、后菌体吸附 Pb<sup>2+</sup>情况。使用傅里叶变换红外光谱仪测定菌体吸附 Pb<sup>2+</sup>和蛋白结构的变化。结果:从蜂蜜中筛出的菌株 C10 被鉴定为植物乳杆菌,无溶血和明胶酶活性;不能还原硝酸盐且不会脱羧产胺;自聚集和疏水性分别达到 85.33%和 35.50%;在酸和胆盐条件下的存活率分别为 39.39%和 98.79%;对氯霉素、红霉素、氨苄西林和复方新诺明有较强的敏感性。植物乳杆菌 C10 在 2 h 内对重金属的吸附率达 65.82%。扫描电镜-X 射线能谱检测表明,铅元素占元素百分比为 9.69%。傅里叶变换红外光谱分析表明,在吸附 Pb<sup>2+</sup>后菌体表面蛋白的二级结构发生明显变化。结论:植物乳杆菌 C10 具有很好的益生特性,能够有效吸附 Pb<sup>2+</sup>,具有预防重金属中毒的作用。

**关键词** 植物乳杆菌; 鉴定; 益生; 铅; 吸附

**文章编号** 1009-7848(2024)12-0094-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.009

近年来,重金属污染对人们健康造成极大的影响<sup>[1]</sup>。重金属被植物吸收后,经食物链转移至人体内富集<sup>[2]</sup>。重金属的过量吸收,将导致血液系统、神经系统等产生不可逆的损伤<sup>[3]</sup>。有效吸附、清除重金属,降低其对人们健康的影响至关重要。

重金属污染可以通过物理沉积<sup>[4]</sup>、化学处理<sup>[5]</sup>和生物吸附<sup>[6]</sup>等方法去除。许多研究表明微生物可吸附重金属,具有高效、环保、经济等优点,引起越来越多的关注<sup>[7-8]</sup>。Zhang 等<sup>[9]</sup>分离出的发酵乳杆菌 HNU312,减轻了铅对大脑的毒性作用。Daisley 等<sup>[10]</sup>分离的鼠李糖乳杆菌 GR-1,减少了铅在肠上皮中的吸收。Bhakta 等<sup>[11]</sup>从重金属污染的淤泥样品中分离出罗伊氏乳杆菌 Pb71-1,对铅的吸附率达 59%。Pakdel 等<sup>[12]</sup>发现植物乳杆菌 PTCC 1896 的活细胞和死细胞都是有效的铅生物吸附剂,可减少水介质中的重金属污染。目前虽然发现许多

能够吸附重金属的微生物,但是它们大多无法应用于食品行业<sup>[13]</sup>。本研究从蜂蜜中筛选出 1 株对重金属铅具有高吸附率并可食用的益生乳杆菌,为其今后的应用提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料采集

蜂蜜:中国农业科学院蜜蜂研究所蜂场。

#### 1.2 培养基及试剂

MRS 液体培养基、MRS 琼脂培养基、0.85%生理盐水、1 mol/L 盐酸、胆酸钠、革兰氏染液,北京索莱宝科技有限公司;乙酸铅,北京博凝生物科技有限公司;植物乳杆菌 Lp6003,哈尔滨商业大学微生物室;细菌微量生化反应管,杭州微生物试剂有限公司;API 50CHL 乳杆菌属鉴定系统,生物梅里埃中国有限公司;瓷珠菌种保存管,青岛海博生物技术有限公司;麦氏比浊管,温州市康泰生物科技有限公司;哥伦比亚血平板,广东环凯微生物科技有限公司;抗菌药物药敏纸片,常德比克曼生物科技有限公司;厌氧袋,日本三菱瓦斯化学株式会社。

收稿日期:2023-12-25

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

第一作者:高西贝,男,硕士

通信作者:张根生 E-mail: zhanggsh@163.com

改良 MRS 琼脂培养基的配制 1 L: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、牛肉浸粉 5 g、乙酸钠 5 g、酵母浸粉 4 g、吐温 1 mL、柠檬酸三铵 2 g、磷酸氢二钾 2 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、碳酸钙 10 g。

### 1.3 仪器与设备

垂直净化工作台 SW-CJ-1D, 苏州天创净化设备有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 LS-50HD, 江阴滨江医疗设备有限公司; pH 酸度计 S20, 梅特勒-托利多国际有限公司; 恒温培养箱 HERA-cell150, 赛默飞世尔科技公司; 酶标仪 Synergy neo2, 美国伯腾仪器有限公司; 离心机 TDL-5-A, 上海安亭科学仪器厂; 真空冷冻干燥机 LGJ-18S, 北京松源华兴科技发展有限公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪 ICP6000, 赛默飞世尔科技公司; 扫描电镜-X 射线能谱仪 Hitachi S4800-EDS, 日本日立公司; 傅里叶变换红外光谱仪 VERTEX, 美国珀金埃尔默公司。

### 1.4 试验方法

1.4.1 菌株的分离纯化与保存 在无菌环境下, 取 2% 蜂蜜加入到灭菌后的 MRS 液体培养基, 37 °C 恒温厌氧培养 48 h 后, 将得到的悬浊液用 0.85% 生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 选取稀释度为  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-7}$  的 3 种稀释液 20  $\mu$ L, 涂布在改良 MRS 琼脂培养基上, 37 °C 恒温厌氧培养 48 h 后。基于 Liu 等<sup>[14]</sup>的方法, 挑取有溶钙圈, 且有光泽、乳白色、圆形的单个菌落做革兰氏染色, 挑取革兰氏阳性且过氧化氢酶阴性的杆菌, 在 MRS 琼脂培养基上三区划线分离培养 3 次以上, 直至获得菌落形态特征一致的单菌株。将分离纯化出来的菌株用瓷珠菌种保存管于 -80 °C 冷冻保存。

1.4.2 生理生化鉴定 将保存的菌株在 MRS 液体培养基传代 2 次后接种于 MRS 琼脂培养基, 厌氧条件下 37 °C 培养 24 h。

首先参考《伯杰氏细菌鉴定手册》进行鉴定。包括接触酶、氧化酶、明胶、硫化氢、硝酸盐还原、乙酰甲基甲醇(V-P)、糖酵解(O-F)、精氨酸双水解酶、吲哚、赖氨酸、鸟氨酸、ONPG、尿素、七叶苷、苦杏仁苷、水杨苷、甘油、柠檬酸盐、肌醇、山梨醇、甘露醇、甘露糖、木糖、纤维二糖、阿拉伯糖、葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、蜜二糖、松三糖、棉子糖、蔗

糖、果糖、乳糖、海藻糖、鼠李糖。

进一步使用乳杆菌鉴定试剂盒 API 50CHL 进行鉴定。从 MRS 琼脂培养基上收集菌株, 加到 2 mL 悬浮液中, 制成高浓度菌悬液; 将高浓度菌悬液加入到 5 mL 0.85% 生理盐水中, 制成浊度相当于麦氏浊度 2.0 的菌悬液, 记录滴数  $n$ ; 向 50 CHL 培养基安瓿瓶中加入  $2n$  滴菌悬液, 备用。将菌悬液加入到试条上试孔中, 于 37 °C 培养 48 h, 结果使用 API web 鉴定软件鉴定。

1.4.3 16S rDNA 鉴定 将样品在冰上融化后, 离心并充分混匀, 取 30 ng 进行 PCR 扩增。采用上游引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和下游引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对分离菌株的 16S rDNA 基因序列进行 PCR 扩增。

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环, 72 °C 修复延伸 7 min, 于 4 °C 终止反应。PCR 扩增体系: 引物 FP、RP 各 1  $\mu$ L, 模板 3  $\mu$ L, 反应混合物 12.5  $\mu$ L, 重蒸水(ddH<sub>2</sub>O) 7.5  $\mu$ L。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测合格后委托奥维森基因科技有限公司进行测序。

将测序结果在美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)的 GenBank 数据库中, 采用基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)与已知序列进行同源比对, 使用 MEGA 7 软件构建系统发育树。

1.4.4 生长特性及产酸特性 将菌液按 2% (体积分数) 的接种量接种于 100 mL 的 MRS 液体培养基中, 放入恒温厌氧箱中 37 °C 培养 24 h。从 0 h 起, 每 2 h 测 1 次细菌的吸光值(OD<sub>600nm</sub>)和 pH 值, 连续测 24 h。以时间为横坐标, 绘制菌株的生长曲线和 pH 值变化曲线。

1.4.5 溶血试验 根据 Deng 等<sup>[15]</sup>的方法。将菌株平板划线至哥伦比亚血平板培养基上, 37 °C 培养 24 h, 观察菌落周围是否出现溶血现象。菌落周围出现草绿色区域为  $\alpha$ -溶血; 菌落周围出现透明区域为  $\beta$ -溶血; 菌落周围无现象为  $\gamma$ -溶血。

1.4.6 明胶酶活性 按照 Akamine 等<sup>[16]</sup>的方法进行修改, 用培养 24 h 的菌体接种至明胶生化管

中,于37℃培养48h,培养结束后,将生化管置于4℃环境中30min后,观察明胶是否液化。

1.4.7 硝酸盐还原及脱羧酶实验 根据许喜林等<sup>[17]</sup>的方法进行修改,用培养24h的菌体接种至硝酸盐还原及鸟氨酸、赖氨酸脱羧酶生化管中,充分混匀在37℃培养24h,观察颜色变化。

1.4.8 抗菌药物敏感性试验 根据Liu等<sup>[18]</sup>的方法,使用纸片扩散法进行抗菌药物敏感性试验。将麦氏浊度0.5的菌悬液涂布至MRS琼脂培养基。室温下干燥3~5min后,用无菌镊子将抗菌药物药敏纸片紧贴培养基表面,各纸片中心相聚≥24mm。培养16~18h后测量抑菌圈直径。

1.4.9 自聚集及疏水性 将菌液调至麦氏浊度0.5,在600nm测定OD<sub>0</sub>,在37℃培养24h后,测定上清液OD<sub>1</sub>。根据公式(1)计算自聚集能力。

向2mL麦氏浊度为0.5的菌液(OD<sub>0</sub>)中加入2mL的二甲苯,剧烈振荡混合5min,37℃培养1h后,测定水相的OD<sub>1</sub>,根据公式(1)计算疏水性能力。

$$\text{自聚集、疏水性}(\%) = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_1}{\text{OD}_0} \times 100 \quad (1)$$

1.4.10 耐酸、耐胆盐试验 在MRS液体培养基中培养菌株,37℃培养24h。分别接种于pH值为2.0,2.5,3.0的MRS液体培养基中,使溶液麦氏浊度为0.5,在600nm处测定初始OD<sub>0</sub>值。37℃培养2h后,测出菌液OD<sub>1</sub>值。另外接种于MRS液体培养基中作为对照试验,记录初始OD对0和2h后的OD对1。根据公式(2)计算菌株的存活率。

将菌液分别接种于含0.3%,0.5%,1.0%胆盐的MRS液体培养基中,使溶液麦氏浊度为0.5,记录初始OD<sub>0</sub>值。37℃培养24h,测出菌液OD<sub>1</sub>值,另外接种于MRS液体培养基中作为对照试验,记录初始OD<sub>对0</sub>和24h后的OD<sub>对1</sub>。根据公式(2)计算C10存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_0}{\text{OD}_{对1} - \text{OD}_{对0}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.11 菌体制备 将菌株接种在MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,挑取单菌落接种到MRS液体培养基中,37℃培养16h,5000×g离心10min后,收集菌体,用已灭菌超纯水洗涤,洗涤3次,得到备用的菌体。

1.4.12 重金属离子浓度对吸附的影响 本试验参照刘亚东等<sup>[19]</sup>的报道,修改后进行。配制Pb<sup>2+</sup>浓度为0.125,0.25,0.5,1.0,1.5mmol/L的乙酸铅溶液。分别加入备用的菌体,使菌悬液终浓度为2g/L。在37℃条件下振荡培养2h后,于5000×g离心10min,取上清液测定其离子浓度。

1.4.13 吸附率测定 使用电感耦合等离子体发射光谱仪测定铅离子浓度,吸取吸附后的上清液注入光谱仪中,平行测定3次。按公式(3)计算铅的生物吸附率<sup>[20]</sup>:

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

式中:C<sub>0</sub>为金属离子初始质量浓度,mg/L;C<sub>1</sub>为吸附后重金属离子最终质量浓度,mg/L。

1.4.14 扫描电镜-X射线能谱分析 样品的制备根据Teemu等<sup>[21]</sup>修改后的方法,按照1.4.12节中方法进行植物乳杆菌C10吸附铅离子的试验,Pb<sup>2+</sup>浓度为0.5mmol/L。植物乳杆菌C10对铅离子吸附前后的生物量用去离子水彻底洗涤,然后用2.5%戊二醛0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.0)中固定3h,再用缓冲液漂洗后用不同浓度乙醇梯度脱水。加入等体积的乙酸异戊酯,置换样品中多余乙醇,冷冻干燥48h后,使用扫描电镜Hitachi S4800观察样品中菌体细胞形态的变化,并用与之相连的X射线能谱仪(EDS)分析元素的组成,所有经过分析的元素已归一化,重复5次。

1.4.15 傅里叶变换红外光谱仪分析 本试验参照Huang等<sup>[22]</sup>的报道,修改后进行。按照1.4.12节中方法进行植物乳杆菌C10吸附铅离子的试验,Pb<sup>2+</sup>浓度为0.5mmol/L。将离心所得的菌体置于-80℃条件下冷冻1h,随后用真空冷冻干燥机进行冷冻干燥,24h后即得到所用的样品。然后按照1:50的比例将样品压入KBr颗粒中,将仪器的分辨率调整至4cm<sup>-1</sup>,在4000~400cm<sup>-1</sup>的波数范围内对样品扫描32次得到最终结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落及菌体形态学鉴定

经改良MRS固体培养基37℃恒温厌氧培养24h后,并且多次分离纯化,从蜂蜜样品中共获得4个菌株,菌落周围有白色透明的溶钙圈,菌落形

态呈白色或淡黄色。选择有浓烈发酵酸味、单一菌落较大、生长性能较好的 C10 进行下一步试验。菌株 C10 菌落呈光滑、圆形、凸起、细密、白色;革兰氏阳性,镜下直杆状,单个、成对或短链(图 1)。

## 2.2 生理生化鉴定

菌株 C10 的生理生化鉴定结果如表 1 所示,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[21]</sup>,初步判定该菌株为植物乳杆菌。

进一步通过乳杆菌鉴定手册 API 50CHL 鉴定,鉴定值越接近 100%, $T$  值越接近 1,鉴定结果越好。结果如图 2、图 3 所示,菌株 C10 为植物乳杆菌,鉴定值为 99.9%, $T=0.96$ 。

## 2.3 16S rDNA 鉴定

采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,结果如图 4 所示。PCR 产物送奥维森基因科技有限公司测序,将 16S rDNA 的测序结果在 NCBI 数据库中寻找相近序列,与植物乳杆菌同源性达到 100%,使用 MEGA 7 构建系统发育树,如图 5 所示,根据亲缘关系分析鉴定得出菌株 C10 为植

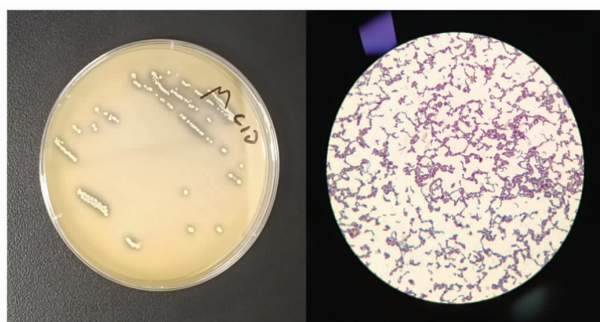


图 1 菌株 C10 的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of strain C10

表 1 菌株生化鉴定结果

Table 1 Results of biochemical identification of strain

项目	结果	项目	结果
阿拉伯糖	+	蔗糖	+
纤维二糖	+	海藻糖	+
果糖	+	木糖	+
半乳糖	+	七叶灵	+
葡萄糖	+	松三糖	+
葡萄糖酸盐	+	蜜二糖	+
乳糖	+	棉子糖	+
麦芽糖	+	鼠李糖	+
甘露醇	+	山梨醇	-
甘露糖	+	精氨酸水解酶	-

物乳杆菌。

## 2.4 生长曲线和 pH 值变化

植物乳杆菌 C10 在 24 h 内的生长趋势及产酸情况如图 6 所示。菌株在 8 h 后生长速度最快,进入对数生长期;16 h 后菌株生长变慢,进入稳定期。菌液 pH 值在接种后逐渐下降。0~8 h,pH 值从 6.16 下降至 5.65;8~16 h,菌液 pH 值快速下降至 4.57;16 h 后菌液 pH 值变化趋于平缓,基本稳定在 4.5 左右。综上所述,菌株可以在 16 h 内达到最



注:0.空白对照;1.丙三醇;2.赤藻糖醇;3.D-阿拉伯糖;4. L-阿拉伯糖;5.D-核糖;6.D-木糖;7.L-木糖;8.D-核糖醇;9. 甲基-B-D 吡喃木糖苷;10.D-半乳糖;11.D-葡萄糖;12.D-果糖;13.D-甘露醇;14. L-山梨糖;15.L-鼠李糖;16.卫矛醇;17.肌醇;18.甘露醇;19.山梨醇;20.甲基-β-D-吡喃甘露糖苷;21.甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷;22.N-乙酰葡萄糖胺;23.苦杏仁苷;24.熊果苷;25.七叶灵;26.水杨苷;27. D-纤维二糖;28.D-麦芽糖;29.D-乳糖;30.D-蜜二糖;31.D-蔗糖;32.D-海藻糖;33.菊粉;34.D-松三糖;35.D-棉子糖;36.淀粉;37.糖原;38. 木糖醇;39.D-龙胆二糖;40.D-土伦糖;41.D-来苏糖;42.D-塔格糖;43.D-岩藻糖;44.L-岩藻糖;45.D-阿拉伯醇;46.L-阿拉伯醇;47.葡萄糖酸钾;48.2-酮基葡萄糖酸钾;49.5-酮基葡萄糖酸钾。

图 2 API 50CHL 生化结果

Fig.2 Biochemical results of API 50CHL

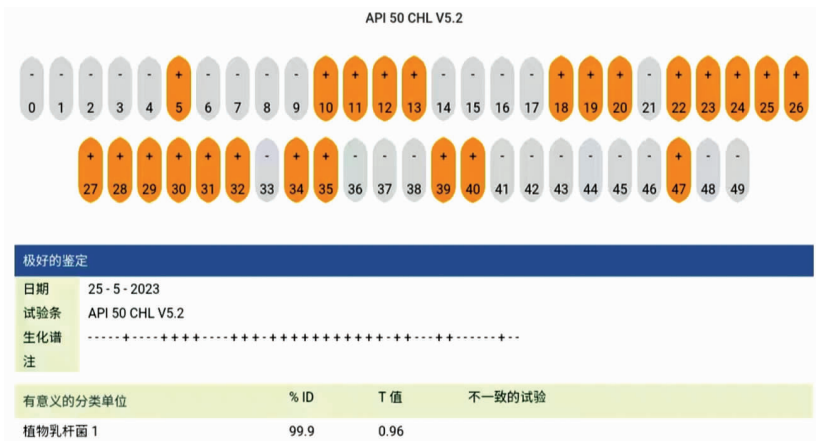


图 3 API 50CHL 鉴定结果

Fig.3 Identification results of API 50CHL

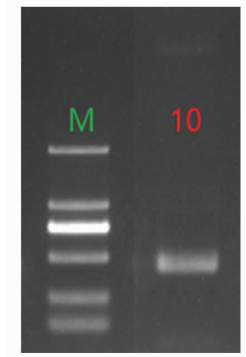


图 4 菌株 C10 的 16S rDNA 扩增产物电泳

Fig.4 Electrophoresis of 16S rDNA amplification products of strain C10

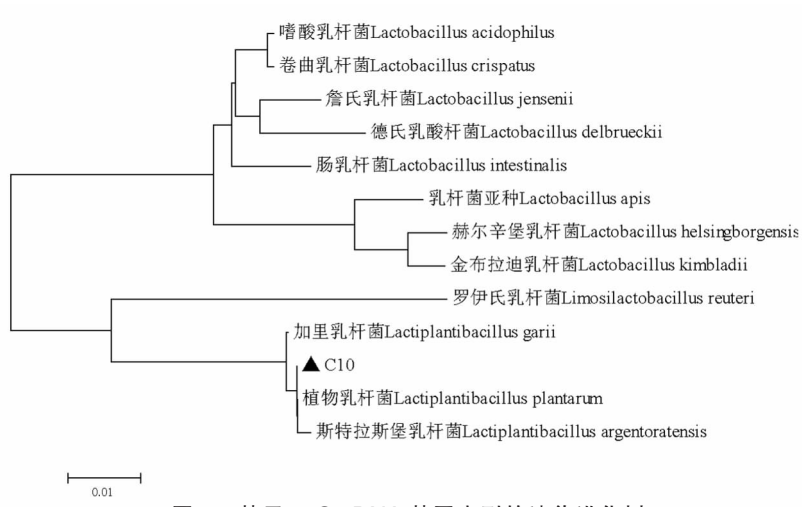


图 5 基于 16S rDNA 基因序列的遗传进化树

Fig.5 Genetic evolution tree based on 16S rDNA gene sequence

大生长量和较低的 pH 值。

### 2.5 安全性试验

2.5.1 溶血性 细菌溶血是因为细菌产生一种可以使红细胞溶解的毒素——溶血素<sup>[24]</sup>,血平板上菌落周围就会出现透明区域。植物乳杆菌 C10 菌落周围没有透明区域,也无草绿色区域,则判定为  $\gamma$ -溶血(图 7)。

2.5.2 明胶酶活性 明胶酶是能够降解胶原的一种特异基质水解酶,能够破坏基底膜,其活性与肿瘤细胞侵袭及转移密切相关<sup>[25]</sup>。将培养 48 h 后的生化管放置于 4 °C 下 30 min,取出观察内容物是否液化。植物乳杆菌 C10 未出现液化现象,内容物不流动,结果为阴性。

2.5.3 硝酸盐还原及脱羧酶试验 当菌体将硝酸盐转化为亚硝酸时,具有致癌性、致突变性和致畸性<sup>[26]</sup>。植物乳杆菌 C10 的硝酸盐还原无颜色变化结果为阴性,不产生硝酸盐还原酶,不会将硝酸盐转化为亚硝酸盐。

具有氨基酸脱羧酶活性的菌株可分解氨基酸,并生成 CO<sub>2</sub> 和生物胺。生物胺过量会导致高血压、头痛、心悸和呕吐<sup>[27]</sup>。植物乳杆菌 C10 的鸟氨酸脱羧酶及赖氨酸脱羧酶阴性。

2.5.4 抗生素药物敏感性试验 检测菌株的耐药性,确保对特定感染的首选药物的敏感性<sup>[28]</sup>。将培养 24 h 的平板放置于黑色背景下,利用反射光从平板背面用直尺测量,测量抑菌圈直径,如图 8

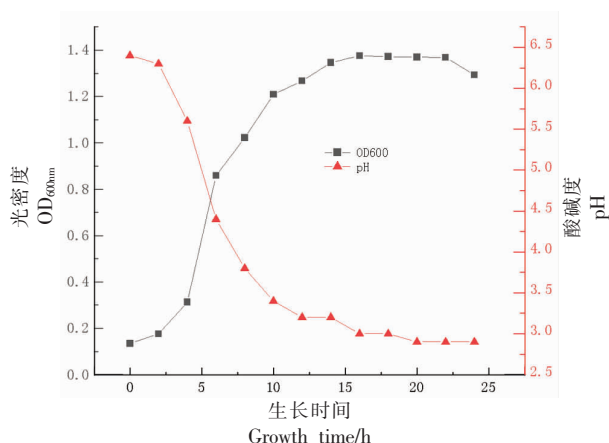


图 6 植物乳杆菌 C10 的生长趋势和 pH 值变化

Fig.6 Growth trend and pH change of *Lactobacillus plantarum* C10



图 7 植物乳杆菌 C10 的溶血结果

Fig.7 Hemolysis results of *Lactobacillus plantarum* C10

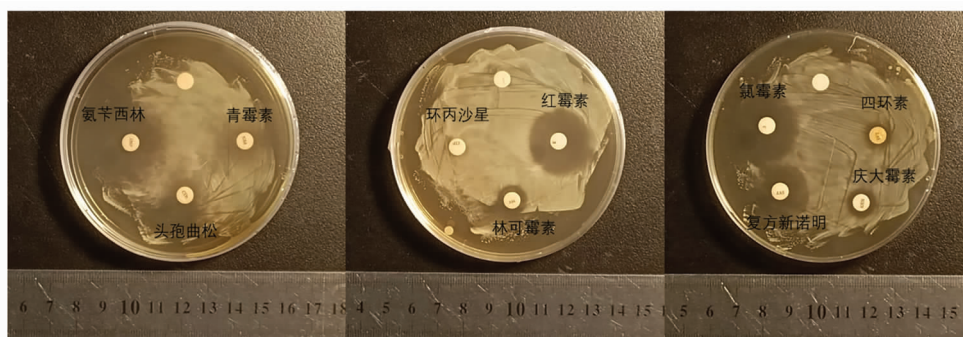


图 8 植物乳杆菌 C10 对 10 种药物的耐药性

Fig.8 Resistance of *Lactobacillus plantarum* C10 to ten drugs

所示。

通过表 2 可以看出，植物乳杆菌 C10 对氯霉

素、红霉素、氨苄西林、复方新诺明、青霉素都有很好的抗生素药物敏感性。对环丙沙星不敏感。

表 2 10 种药物的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of bacteriostatic zone of ten drugs

药物	氯霉素	红霉素	氨苄西林	复方新诺明	青霉素	林可霉素	头孢曲松	庆大霉素	四环素	环丙沙星
直径/mm	25.89	25.57	23.73	20.73	15.32	11.18	11.01	10.64	9.63	0

## 2.6 益生性试验

2.6.1 自聚集及疏水性 自聚集可阻止致病菌的粘附,增加微生物定殖在胃肠道的能力<sup>[29]</sup>。植物乳杆菌 C10 具有高等的自聚集能力,可达到 85.33%,疏水性达到 35.50%。保证其在肠道中定殖,从而竞争性抑制病原菌。

2.6.2 耐酸耐胆盐能力 植物乳杆菌 C10 在 pH 值为 2.0,2.5,3.0 下的存活率分别为 22.64%,32.48%,39.39%。在 0.3%,0.5%,1.0%的胆盐中的存活率可达到 98.79%,95.79%,80.00%。耐酸耐胆

盐<sup>[30]</sup>结果反映了植物乳杆菌 C10 可以在胃肠道中存活。

## 2.7 重金属吸附能力

2.7.1 不同铅离子浓度下的吸附率 为了探究不同铅离子浓度下的植物乳杆菌 C10 吸附效果,并与植物乳杆菌 6003 进行比较。按照 1.4.12 节中的方法吸附铅离子,使用电感耦合等离子体发射光谱仪测定上清液中铅离子浓度<sup>[31]</sup>,并按照 1.4.13 节中的方法计算其吸附率,得到的结果如表 3 所示。

表3 不同铅离子浓度下的吸附率

Table 3 Adsorption rates at different concentrations of lead ions

铅离子浓度/(mmol/L)	0.125	0.25	0.5	1.0	1.5
C10 吸附率/%	65.32	65.82	31.36	18.54	6.92
6003 吸附率/%	9.25	9.46	8.31	2.47	1.90

由表3可知,随着离子浓度的梯度增加,吸附率呈梯度减少,当离子浓度从0.25 mmol/L增加到1.5 mmol/L时,菌株C10的吸附率从65.82%下降到6.92%。当铅离子浓度为0.25 mmol/L时,菌体对铅离子吸附率最佳,达到65.82%。而植物乳杆菌6003对铅离子的吸附率很低,仅有9.46%。

2.7.2 扫描电镜-X射线能谱分析 吸附前的植物乳杆菌C10的菌体元素分析<sup>[32]</sup>表明,没有检测到铅元素(图9、表4)。吸附铅离子后的菌体表面呈现褶皱(图10),并且在EDS图谱中可以检测到Pb,出现了铅元素峰。在表5中发现,铅元素的重量百分比为9.69%。进一步证明植物乳杆菌C10

可以吸附铅离子。

2.7.3 傅里叶变换红外光谱分析 为了研究植物乳杆菌C10吸附铅离子菌体表面基团的变化,利用傅里叶变换红外光谱仪进行扫描后得到结果如图11所示。试验组和对照组存在较大的差异。试验组在 $3280\text{ cm}^{-1}$ 处的峰变得更尖锐而宽阔,这证实了在铅离子吸附后,植物乳杆菌C10表面的氨基NH、羟基OH与铅离子发生了相互作用<sup>[33]</sup>。在 $1644\text{ cm}^{-1}$ 处为羰基C=O伸缩振动的特征吸收峰,说明铅离子与植物乳杆菌C10菌体表面的羰基发生了相互作用。在 $1224\text{ cm}^{-1}$ 处为羧基COOH的伸缩振动吸收峰。因此,金属铅的生物吸附主要

表4 吸附前菌株C10的EDS元素分析

Table 4 EDS elemental analysis of C10 before adsorption

元素	质量百分比/wt%	原子百分比/at%
C K	47.20	53.76
N K	15.30	14.94
O K	35.66	30.49
P K	1.61	0.71
S K	0.24	0.10
总量	100.00	

表5 吸附后菌株C10的EDS元素分析

Table 5 EDS elemental analysis of C10 after adsorption

元素	质量百分比/wt%	原子百分比/at%
C K	43.03	54.66
N K	10.28	11.20
O K	32.25	30.76
Na K	2.44	1.62
P K	1.91	0.94
Mn K	0.40	0.11
Pb M	9.69	0.71
总量	100.00	

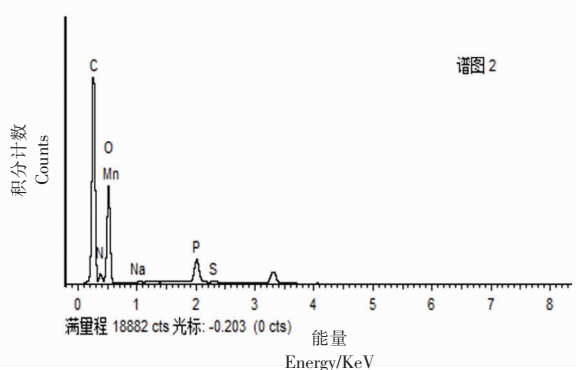
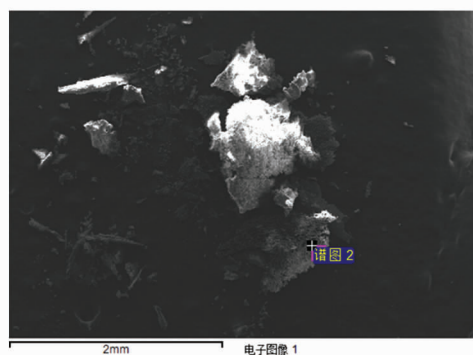


图9 吸附前菌株C10的扫描电镜图及EDS图

Fig.9 SEM and EDS images of C10 before adsorption

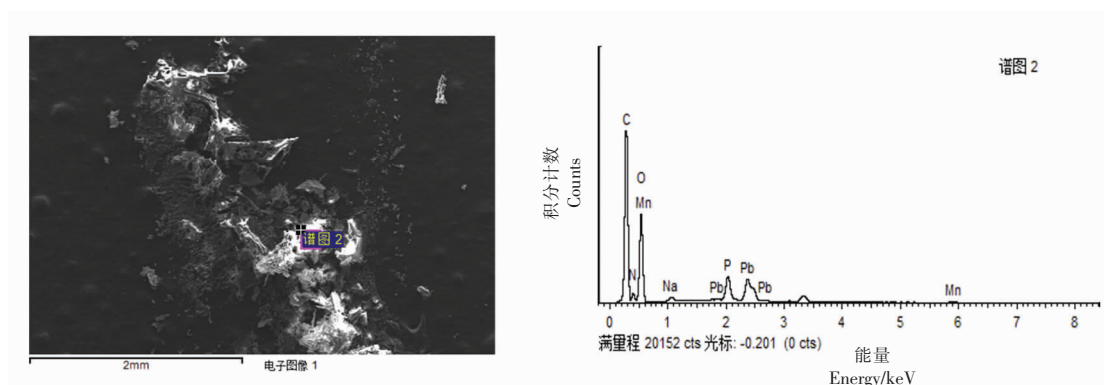


图 10 吸附后菌株 C10 的扫描电镜图及 EDS 图

Fig.10 SEM and EDS images of C10 after adsorption

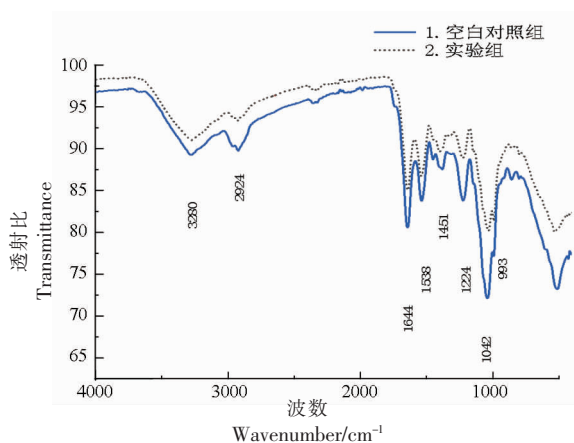


图 11 吸附重金属离子前后的红外变化图

Fig.11 Infrared changes before and after adsorption of heavy metal ions

官能团是羧基、羟基、氨基。

在红外光谱分析中,二阶导数谱图可以帮助区分峰宽相似但结构不同的吸收峰,从而提高谱图中峰的分辨率<sup>[34]</sup>。此外,二阶导数谱图还能够去除背景和噪声,结果与红外谱图相同。通过对空白对照组和试验组的二阶导数分析,从图 12、图 13 可以看出有明显区别,酰胺 I 带和酰胺 III 带峰位对应蛋白质二级结构,空白对照组酰胺 I 带和酰胺 III 带的吸收峰中,归属于  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  转角;而试验组酰胺 I 带吸收峰中 1 637,1 659,1 665,1 675,1 688  $\text{cm}^{-1}$  归属于  $\beta$  折叠、 $\alpha$  螺旋、 $\beta$  转角;酰胺 III 带的 1 227,1 293,1 326  $\text{cm}^{-1}$  归属于  $\beta$  折叠、 $\beta$  转角、 $\alpha$  螺旋,吸附后出现了  $\beta$  折叠。因

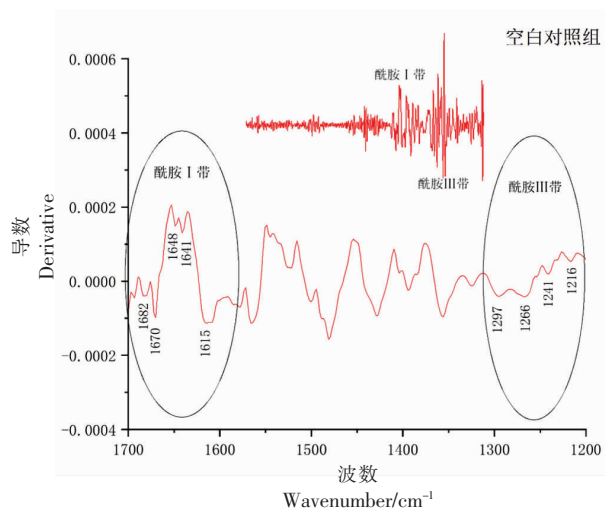


图 12 空白对照组红外光谱的二阶导数谱图

Fig.12 Second derivative spectrum of control group infrared spectrum

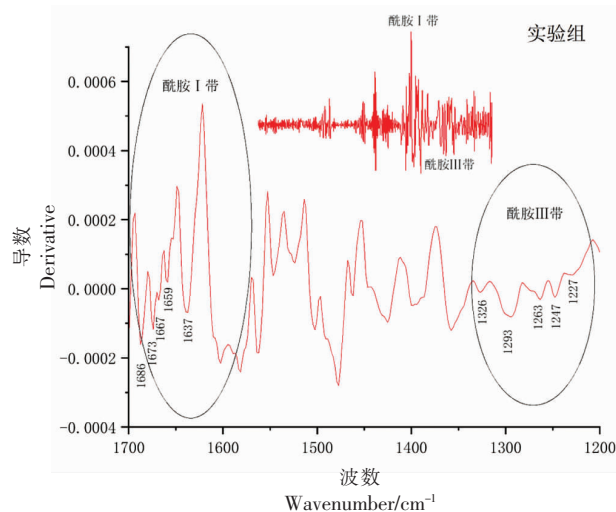


图 13 试验组红外光谱的二阶导数谱图

Fig.13 Second derivative spectra of infrared spectrum of experimental group



此,傅里叶变换红外光谱分析表明,菌体通过吸附 $Pb^{2+}$ ,使得菌体表面蛋白二级结构发生变化。

### 3 结果与讨论

本研究从蜂蜜中筛选得到的菌株,通过形态特征、生理生化并用 API 50CHL 以及 16S rDNA 测序分析,鉴定菌株 C10 是植物乳杆菌。

植物乳杆菌 C10 不产生溶血素,不会降解胶原,不会产生亚硝酸盐和过量胺,可以在肠道中定植,在酸性及胆盐环境中可以存活生长,对抗生素药物敏感。植物乳杆菌 C10 对  $Pb^{2+}$  的吸附率可达 65.82%,菌体表面铅元素占元素百分比为 9.69%。在吸附过程中菌体表面蛋白的二级结构发生了明显的变化。植物乳杆菌 C10 与其它菌株相比,张奕吉等<sup>[35]</sup>的菌株对 100 mg/L  $Pb^{2+}$  的吸附率只有 38%,高于李冉等<sup>[36]</sup>报道的植物乳杆菌 5% 的  $Pb^{2+}$  吸附率。因此,植物乳杆菌 C10 具有很好的安全性和高效性,在吸附重金属方面具有一定优势。

目前,对于植物乳杆菌 C10 的安全性与益生功能的研究仅限于体外试验,下一步将利用此菌进行动物实验和人体试验,进而明确其在体内的益生机制和机理。为建立新菌种库,开发吸附重金属的保健食品以及可食用益生菌提供了一定帮助。

### 参 考 文 献

- [1] BARUAH S G, AHMED I, DAS B, et al. Heavy metal (loid) s contamination and health risk assessment of soil-rice system in rural and peri-urban areas of lower Brahmaputra valley, northeast India[J]. Chemosphere, 2021, 266: 129150.
- [2] 林新校, 吴泽. 食品中重金属的健康风险评估研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(12): 225-233.  
LIN X X, WU Z. Research progress on health risk assessment of heavy metals in food[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(12): 225-233.
- [3] MASUMOTO T, AMANO H, OTANI S, et al. Association between prenatal cadmium exposure and child development: The Japan environment and children's study[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2022, 243: 113989.
- [4] TYTŁA M, WIDZIEWICZ-RZOŃCA K, KERNERT J, et al. First comprehensive analysis of potential ecological risk and factors influencing heavy metals binding in Sewage Sludge from WWTPs using the ultrasonic disintegration process[J]. Water, 2023, 15(4): 666.
- [5] DONG K Q, JIANG Y L, ZHANG Y D, et al. Tannic acid-assisted fabrication of antibacterial sodium alginate-based gel beads for the multifunctional adsorption of heavy metal ions and dyes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 252: 126249.
- [6] ATUCHIN V V, ASYAKINA L K, SERAZETDINOVA Y R, et al. Microorganisms for bioremediation of soils contaminated with heavy metals[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 864.
- [7] PRIYA A K, GNANASEKARAN L, DUTTA K, et al. Biosorption of heavy metals by microorganisms: Evaluation of different underlying mechanisms [J]. Chemosphere, 2022, 307: 135957.
- [8] AFROOZ M R, MOGHADAS B K, TAMJIDI S. Performance of functionalized bacterial as bio-adsorbent for intensifying heavy metal uptake from wastewater: A review study[J]. Journal of Alloys and Compounds, 2022, 893: 162321.
- [9] ZHANG Z, LI J H, JIANG S M, et al. *Lactobacillus fermentum* HNU312 alleviated oxidative damage and behavioural abnormalities during brain development in early life induced by chronic lead exposure [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 251: 114543.
- [10] DAISLEY B A, MONACHESE M, TRINDER M, et al. Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium[J]. Gut Microbes, 2019, 10(3): 321-333.
- [11] BHAKTA J N, OHNISHI K, MUNEKAGE Y, et al. Characterization of lactic acid bacteria - based probiotics as potential heavy metal sorbents[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(6): 1193-1206.
- [12] 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.

- [13] CHATRAGADDA R, DUFOSSÉ L. Ecological and biotechnological aspects of pigmented microbes: A way forward in development of food and pharmaceutical grade pigments[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 637.
- [14] LIU N, MIAO S, QIN L K. Screening and application of lactic acid bacteria and yeasts with l-lactic acid - producing and antioxidant capacity in traditional fermented rice acid[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(11): 6095–6111.
- [15] DENG L Q, LIU L M, FU T Y, et al. Genome sequence and evaluation of safety and probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* LPJZ-658[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1620.
- [16] AKAMINE I T, MANSOLDO F R P, CARDOSO V S, et al. Hydrolase activities of sourdough microorganisms[J]. *Fermentation*, 2023, 9(8): 703.
- [17] 许喜林, 赵思博, 郑柳青, 等. 鼠李糖乳杆菌 LR-ZB1107-01 的培养基优化及益生特性评价[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(8): 21–29.
- XU X L, ZHAO S B, ZHENG L Q, et al. Optimization of culture medium and evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* LR-ZB1107-01[J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2022, 50(8): 21–29.
- [18] LIU W, SONG L Y, SUN W, et al. Distribution of microbes and antimicrobial susceptibility in patients with diabetic foot infections in South China[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1113622.
- [19] 刘亚东, 王苏和, 贺敏, 等. 高通量筛选鉴定耐受和吸附重金属  $Pb^{2+}$  的酵母菌[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(6): 246–255.
- LIU Y D, WANG S H, HE M, et al. Identification of yeast that tolerate and adsorb heavy metal  $Pb^{2+}$  by high-throughput screening[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(6): 246–255.
- [20] 赵晓峰, 贺银凤, 李畅. 1 株耐铅乳酸菌的吸附铅特性研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 58–64.
- ZHAO X F, HE Y F, LI C. Study on lead adsorption characteristics of a strain of lead-resistant lactic acid bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(1): 58–64.
- [21] TEEMU H, SEPPO S, JUSSI M, et al. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria[J]. *International journal of food microbiology*, 2008, 125(2): 170–175.
- [22] HUANG W, LIU Z. Biosorption of Cd (II)/Pb (II) from aqueous solution by biosurfactant -producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 105: 113–119.
- [23] PARTE A, KRIEG N R, LUDWIG W, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 4: The bacteroidetes, spirochaetes, tenericutes (mollicutes), acidobacteria, fibrobacteres, fusobacteria, dictyoglomi, gemmatimonadetes, lentisphaerae, verrucomicrobia, chlamydiae, and planctomycetes*[M]. Germany: Springer Science & Business Media, 2011.
- [24] WAHID Z H A A, ABBAS M J A A. Distribution of *hla*, *hly*, *hlgC*, *hld* & *cylA* hemolysin genes and their alleles in different bacterial species isolated from the variant clinical sources in Basrah[J]. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 2023, 30(3): 180–198.
- [25] FARINA A R, MACKAY A R. Gelatinase B/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression[J]. *Cancers*, 2014, 6(1): 240–296.
- [26] PAN J X, LIU L L, PAN H P, et al. A feasibility study of metal sulfide (FeS and MnS) on simultaneous denitrification and chromate reduction[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127491.
- [27] RESTUCCIA D, SPIZZIRRI U G, PUOCI F, et al. Accumulation of biogenic amines in foods: hazard identification and control options [J]. *Microbial Food Safety and Preservation Techniques* (ed. VR Rai and JA Bai), 2014(1): 53–74.
- [28] RELLER L B, WEINSTEIN M, JORGENSEN J H, et al. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 49(11): 1749–1755.
- [29] GOHIL P, NANAVATI B, PATEL K, et al. Assessing the efficacy of probiotics in augmenting bovine reproductive health: An integrated in vitro, in silico, and in vivo study[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1137611.
- [30] SUHARSONO H, SUARDANA I W, PINATIH K J P. Bacteriocin potency test of lactic acid bacteria (LAB) isolated from rumen of Bali cattle against low pH and bile salt [J]. *Bali Medical Journal*, 2023, 12(1): 1142–1146.

- [31] SUN P P, WANG M, WU T T, et al. Covalent crosslinking cellulose/graphene aerogels with high elasticity and adsorbability for heavy metal ions adsorption[J]. *Polymers*, 2023, 15(11): 2434.
- [32] NEWBURY D E, RITCHIE N W M. Elemental mapping of microstructures by scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS): extraordinary advances with the silicon drift detector (SDD)[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2013, 28(7): 973-988.
- [33] 王燕波. 近红外及中红外光谱分析技术用于表征人血清白蛋白和免疫球蛋白G结构变化的研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.  
WANG Y B. Study on structural changes of human serum albumin and immunoglobulin G by near infrared and mid-infrared spectroscopy[D]. Jinan: Shandong University, 2018.
- [34] 蓝蔚青, 胡潇予, 阮东娜, 等. 傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(8): 2507-2514.
- [35] LAN W Q, HU X Y, RUAN D N, et al. Effect of carrageenan oligosaccharides on protein structure of *Penaeus albinus*[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2019, 39(8): 2507-2514.
- [35] 张奕吉, 杜磊, 谢静莉. 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.
- ZHANG Y J, DU L, XIE J L. Adsorption of heavy metals by *Lactobacillus plantarum* X7021[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(12): 4786-4792.
- [36] 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.
- LI R, OU J, DAI Q H, et al. Correlation between tolerance and adsorption of *Lactobacillus plantarum* to heavy metals  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$  and  $Cu^{2+}$ [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(1): 52-58.

### Isolation and Identification of *Lactobacillus plantarum* C10 and Its Adsorption Effect on Heavy Metal Lead

Gao Xibei<sup>1,2</sup>, Shen Wenquan<sup>2</sup>, Zhang Yu<sup>3</sup>, Zhang Hongcheng<sup>1,2</sup>, Zhang Gensheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Engineering, Harbin Commercial University, Harbin 150000

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Resource Insects, Institute of Apicultural Bees, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093

<sup>3</sup>Jiangsu Beevip Biotechnology Co., Ltd., Taizhou 225300, Jiangsu)

**Abstract** Objective: To isolate and purify probiotic *Lactobacillus* from honey with high adsorption rate of heavy metal lead and edible. Methods: Physiological and biochemical experiments were performed on the isolated and purified strains, and a phylogenetic tree based on 16s rDNA was established for taxonomic identification; the probiotic properties of the strains were assessed by hemolysis, gelatinase activity, nitrate reduction and amino acid decarboxylase, self-aggregation and hydrophobicity, acid and bile salt resistance, and antimicrobial drug sensitivity. Meanwhile, inductively coupled plasma emission spectroscopy was used to determine the  $Pb^{2+}$  content in the solution before and after adsorption. The ability of the strains to adsorb heavy metals was explored. Scanning electron microscopy-X-ray energy spectroscopy was used to observe the adsorption of  $Pb^{2+}$  by the bacteria before and after adsorption. Fourier transform infrared spectroscopy was used to determine the adsorption of  $Pb^{2+}$  by the bacterium and the changes in protein structure. Results: Strain C10 screened from honey was identified as *Lactobacillus plantarum*, with no hemolytic and gelatinase activities; it could not reduce nitrate and did not decarboxylate to produce amines; self-aggregation and hydrophobicity reached 85.33% and 35.50%, respectively; survival under acid and bile salts was 39.39% and 98.79%, respectively; and it had strong sensitivity to chloramphenicol, erythromycin, ampicillin and cotrimoxazole. *Lactobacillus plantarum* C10 adsorbed 65.82% of heavy metals within 2 h. Scanning electron microscopy-X-ray spectroscopy showed that the percentage of lead element was 9.69%, and Fourier transform infrared spectroscopy showed that the secondary structure of the surface protein of the bacterium changed significantly after the adsorption of  $Pb^{2+}$ . Conclusion: *Lactobacillus plantarum* C10 has good probiotic properties, can effectively adsorb  $Pb^{2+}$ , and has the effect of preventing heavy metal poisoning.

**Keywords** *Lactobacillus plantarum*; identification; probiotic; lead; adsorption