



阴道源抑菌性乳杆菌的筛选及其抑菌能力的评价

董盼盼¹, 孟越¹, 辛向鸽¹, 孟珺^{1*}, 丁长河¹, 杜涵², 宋立人², 郑冬鸽², 杜灵广²

1 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001

2 郑州金百合生物工程有限公司, 河南 郑州 450001

董盼盼, 孟越, 辛向鸽, 孟珺, 丁长河, 杜涵, 宋立人, 郑冬鸽, 杜灵广. 阴道源抑菌性乳杆菌的筛选及其抑菌能力的评价[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4248-4261.

DONG Panpan, MENG Yue, XIN Xiangge, MENG Jun, DING Changhe, DU Han, SONG Liren, ZHENG Dongge, DU Lingguang. Screening and antimicrobial activity evaluation of antimicrobial *Lactobacillus* strains from vagina[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4248-4261.

摘要:【目的】为开发针对妇科炎症的微生态制剂, 本研究对健康妇女阴道的乳酸菌进行分离并对其抑菌特性进行探究。【方法】采用平板划线、形态学鉴定和 16S rRNA 基因鉴定相结合的方法, 对阴道中的乳杆菌进行分离纯化和鉴定。对分离得到的 5 株乳杆菌进行生长特性和黏附能力的测定。利用牛津杯法, 以大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25923 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 8739 为指示菌, 测定乳杆菌的抑菌能力; 利用微量孔板法测定乳杆菌对白假丝酵母(*Candida albicans*) CMCC(F) 98001 的抑制能力。用有机酸排除和过氧化氢排除法对其抑菌成分进行探究。【结果】初步分离出 5 株乳杆菌, 其中 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 为卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*), Q6.3 和 BHG05 为格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)。5 株乳杆菌均具有较强的生长和产酸能力, 其中 Q2.1、BHC04 和 BHG05 的延滞期短, 在 20 h 可达到稳定生长期, BHG05、Q6.3 和 Q8.5 的产酸能力较强, 最终 pH 可达 3.80–4.03。卷曲乳杆菌 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的黏附能力(疏水能力、自凝集率、与致病菌的共凝集率)显著高于阳性对照菌株德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*) DM8909。5 株乳杆菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白假丝酵母的抑制能力显著高于阳性对照乳酸链球菌素(nisin)。BHC04、BHG05 和 Q8.5 对大肠杆菌的抑制能力显著高于阳性对照菌株 DM8909。BHG05 对白假丝酵母的抑制能力显著高于阳性菌株 DM8909, 可达(73.14±0.14)%。BHC04 和 Q8.5 对白假丝酵母的抑制能力与 DM8909 无显著性差异, 可达(72.80±0.30)%和

资助项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(222102110080)

This work was supported by the Key Research and Development and Promotion Specialties of Henan (Scientific and Technological Offensive) (222102110080).

*Corresponding author. E-mail: mengjun2017@163.com

Received: 2024-05-05; Accepted: 2024-08-21; Published online: 2024-08-23

(72.93±0.10)%。综上,选取 BHC04 和 BHG05 作为具有抑菌潜力的优质菌株。5 株乳酸菌可以产生有机酸、过氧化氢等发挥抑菌作用。【结论】筛选出 2 株具有抑菌能力且益生特性优良的乳杆菌,可作为抑菌微生态制剂的候选菌株来治疗和预防由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白假丝酵母引起的妇科疾病。

关键词: 乳杆菌; 阴道; 益生特性; 抑菌能力; 妇科炎症

Screening and antimicrobial activity evaluation of antimicrobial *Lactobacillus* strains from vagina

DONG Panpan¹, MENG Yue¹, XIN Xiangge¹, MENG Jun^{1*}, DING Changhe¹, DU Han², SONG Liren², ZHENG Dongge², DU Lingguang²

¹ School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, Henan, China

² Zhengzhou Jinbaihe Bioengineering Co., Ltd., Zhengzhou 450001, Henan, China

Abstract: [Objective] To develop probiotics for gynecological inflammation, we isolated and screened out *Lactobacillus* with antimicrobial and probiotic properties from the vagina of healthy women. [Methods] The plate streaking method was employed to isolate the *Lactobacillus* strains from vaginal samples, and the isolates were then identified based on morphological and 16S rRNA gene sequencing evidence. The growth and adhesion of the five strains were characterized. The Oxford cup method with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as indicator strains was employed to assess the antimicrobial activities of the strains. The microtiter plate method was used to measure the inhibitory effects of the strains on *Candida albicans*. The antimicrobial components were explored by organic acid elimination and hydrogen peroxide elimination methods. [Results] Five strains of *Lactobacillus* were isolated, including three strains (Q2.1, BHC04, and Q8.5) of *Lactobacillus crispatus* and two strains (Q6.3 and BHG05) of *Lactobacillus gasseri*. All the five strains of *Lactobacillus* had strong growth and high acid production. Strains Q2.1, BHC04, and BHG05 had a short delay period and reached a plateau growth stage after 20 h, and strains BHG05, Q6.3, and Q8.5 had high acid production, with the culture medium finally reaching pH 3.80–4.03. The adhesion capacity (hydrophobicity, self-agglutination rate, and co-agglutination rate with pathogens) of *L. crispatus* Q2.1, BHC04, and Q8.5 was significantly higher than that of the positive control strain, *L. delbrueckii* DM8909. The inhibitory effects of the five strains on *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans* were stronger than those of the positive control (nisin). Strains BHC04, BHG05, and Q8.5 showcased stronger inhibitory effects on *E. coli* than DM8909. The inhibitory effect of BHG05 on *C. albicans* was significantly stronger than that of DM8909, with the inhibition rate reaching up to (73.14±0.14)%. The inhibitory effects of BHC04 and Q8.5 on *C. albicans* were not significantly different from that of DM8909, with the inhibition rates reaching up to (72.80±0.30)% and

(72.93±0.10)%, respectively. According to the results above, we selected BHC04 and BHG05 as high quality strains with antimicrobial potential. The five strains produced organic acids and hydrogen peroxide to exert antimicrobial effects. **[Conclusion]** Two strains of *Lactobacillus* with antimicrobial effects and excellent probiotic properties were screened out. They can be used as candidate strains of antimicrobial probiotics for the prevention and treatment of gynecological inflammation caused by *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*.

Keywords: *Lactobacillus*; vagina; probiotic properties; antimicrobial effect; gynecological inflammation

健康妇女阴道是一个非常复杂的微生态系统^[1], 包含细菌、真菌等各种微生物, 它们主要定殖于阴道四周的侧壁黏膜中。这些微生物之间互相制约、互相作用, 形成阴道微生态系统。正常情况下微生态处于一个波动的状态, 微生物的种类和数量都不会发生质的变化。当这个系统平衡被破坏时, 会出现由于阴道菌群失调引起的阴道炎、宫颈炎和盆腔炎等多种疾病。阴道感染性疾病在国内具有高发态势, 严重影响患者的身体健康与生活质量^[2-3]。

念珠菌性阴道炎(vulvovaginal candidiasis, VVC)是一种具有高发病率、高复发性以及非致命性等特点的妇科疾病, 是困扰全球女性身体健康的一大难题。念珠菌性阴道炎的主要致病菌为白假丝酵母, 这是一种存在于健康女性阴道内的机会致病菌, 其菌丝态可以通过分泌黏附素定殖在阴道上皮细胞, 进而形成生物膜, 来抵抗抗真菌药物和宿主防御^[4]。需氧性阴道炎(aerobic vaginitis, AV)是以阴道内乳杆菌减少或缺失、需氧菌增多为主要特征的阴道感染性疾病, 最常见的病原体是大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等。当前阴道炎的治疗方法主要是使用抗生素治疗, 虽然抗生素对疾病的控制具有积极的作用, 但是研究表明, 在使用抗生素治疗阴道细菌感染患者 12 个月后有 50%的复发率^[5]。标准的抗生素疗法忽视了已经失调的阴道环境, 无

法重建阴道酸性环境^[6], 同时, 抗生素也不适用于孕妇和哺乳期妇女。这些副作用给抗生素治疗带来了新的挑战。

乳杆菌为阴道菌群的优势微生物, 数量可达阴道菌群的 95%以上^[7], 在维持阴道微生态环境平衡发挥重要作用。育龄女性正常阴道菌群主要以卷曲乳杆菌和嗜性乳杆菌为主, 卷曲乳杆菌可以作为反映女性正常阴道微生态的标志, 嗜性乳杆菌与阴道微生态紊乱密切相关^[8]。研究发现, 当阴道菌群失衡时, 及时补充乳杆菌可以纠正阴道微生态的平衡, 对疾病的治疗具有积极的意义。目前在阴道炎治疗上, 不仅要改善症状提高治愈率, 而且还要调整微生态失衡状态, 其中恢复乳杆菌数量来提升阴道防御功能成为关键。

本研究致力于从阴道样品中筛选出对常见阴道炎病原菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白假丝酵母)有较强抑菌作用的优质乳杆菌, 为开发预防和缓解由菌群紊乱而引起的阴道炎的微生态制剂提供潜在的优良菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

白假丝酵母 CMCC(F) 98001 购自北京索莱宝科技有限公司, 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和大肠杆菌 ATCC 8739 为河南工业大学粮油食

品学院保存。阳性对照菌株德氏乳杆菌 DM8909 筛选自阴道乳酸菌活菌制剂——定君生, 并由北京六合华大基因科技有限公司鉴定。

1.1.2 主要试剂

乳酸链球菌素, 山东元泰生物工程有限公司; L-半胱氨酸盐酸盐, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

MRS 培养基: 在普通 MRS 培养基加入 0.5 g/L 的 L-半胱氨酸盐酸盐, 固体 MRS 加入琼脂 15.0 g/L。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0, 固体 LB 加入琼脂 10.0 g/L。SDB (sabouraud dextrose broth)培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 蛋白胨 10.0, 固体 SDB 加入琼脂 10.0 g/L。

1.1.3 主要仪器

厌氧罐, OXOID 公司; 厌氧产气袋和酶标仪, ThermoFisher Scientific 公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博迅实业有限公司; 电热恒温培养箱, 北京市永光明医疗仪器有限公司; 超净工作台, 上海笃特科学仪器有限公司; 图像颗粒分析仪, 丹东百特仪器有限公司; 牛津杯, 北京吉泰远成科技有限公司。

1.2 阴道源乳杆菌的分离

采样者为学校健康成年女性(包括学生和教师), 所有受试者均了解并签署项目知情同意书。采样者用无菌棉签从阴道侧壁 1/3 处取得阴道分泌物, 放入带有生理盐水的无菌试管中, 4 °C 保存并尽快处理。

取少量样品用生理盐水稀释, 在 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 梯度下各吸取 100 μ L 于 MRS 固体培养基上涂布, 放置在厌氧罐中, 37 °C 倒置培养 48 h; 使用无菌接种环挑取单个特征菌落于 MRS 固体培养基上划线, 37 °C 厌氧培养 48 h, 反复划线至同一平板中的菌落颜色、大小、形

状均一致, 然后将菌落接至含有 MRS 液体培养基的厌氧管中培养 24 h, 液体培养 2-3 次后, 进行结晶紫染色观察其形态并进行保存(菌液: 甘油=1:1 存放于 -80 °C)。

1.3 阴道源乳杆菌的 16S rRNA 基因鉴定

已活化两代的菌株在 MRS 液体培养基中 37 °C 富集培养 24 h, 用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。引物为 27F (5'-AACTGAGTTTGATCCT GGCTC-3')和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTT ACGACTT-3')。PCR 扩增体系(50 μ L): 模板 DNA 2 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix II 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.25 μ L, ddH₂O 20.5 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 末端延伸 10 min。将扩增产物送至华大基因测序, 并在 NCBI 中进行同源性比对分析。

1.4 乳杆菌的生长特性

将筛选出的抑菌能力较强的菌株活化传代, 以 2% 的体积分数接种于 MRS 液体培养基, 以空白 MRS 液体培养基作为空白对照, 每 2 h 测定一次菌液的 pH 值及 OD_{600} 值^[9]。

1.5 乳杆菌的益生特性

1.5.1 乳杆菌的疏水能力

将活化好的乳杆菌 37 °C 培养 24 h 后, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 用 0.1 mol/L KNO₃ (pH 6.20)洗涤 2 次, 然后重悬菌体, 在 600 nm 处测量其初始吸光度 A_0 。取 3 mL 菌悬液加入 1 mL 二甲苯, 室温静置 10 min, 混匀静置 15 min, 吸取下层水相, 以缓冲液为空白对照, 在 600 nm 波长处测量吸光度 A 。乳杆菌的疏水能力^[10]按照公式(1)计算。

$$\text{疏水能力}(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为初始吸光度, A 为二甲苯处理后的吸光度。

1.5.2 乳杆菌自凝集率

将活化好的乳杆菌离心弃上清液,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,调整菌悬液浓度为 1×10^8 CFU/mL。取调整后的菌悬液在 600 nm 处测量吸光度,记为 A_1 ,取 2 mL 菌悬液在 37 °C 静置培养 2 h,测量在 600 nm 处测量吸光度,记为 A_2 。乳杆菌的自凝集率^[11]按照公式(2)计算。

$$\text{自凝集率}(\%) = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为初始吸光度, A_2 为静置后的吸光度。

1.5.3 乳杆菌共凝集率

按 1.5.2 调整乳杆菌的菌悬液,并且制备 3 株指示菌的菌悬液。取指示菌菌悬液 1 mL 与 1 mL 乳杆菌菌悬液混合,测定 0 h 及静置 2 h 后上层溶液的 OD_{600} 值(分别记为 A_3 和 A_4)。乳杆菌的共凝集率^[11]按照公式(3)计算。

$$\text{共凝集率}(\%) = (A_3 - A_4) / A_4 \times 100 \quad (3)$$

式中: A_3 为 0 h 上层溶液的 OD_{600} , A_4 静置 2 h 后上层溶液的 OD_{600} 。

1.6 抑菌能力的鉴定

1.6.1 无细胞上清液 (cell-free supernatants, CFS) 的制备

将活化后的菌株按 2% 接种在厌氧管 37 °C 培养 48 h,然后在 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 0.22 μ L 滤膜过滤,所得即为 CFS, 4 °C 冰箱保存备用。

1.6.2 指示菌的制备

将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌按 1% 接种, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 4 °C 冰箱保存备用。将白假丝酵母按 1% 接种于沙氏葡萄糖培养基, 28 °C、100 r/min 培养 24 h 制备菌悬液,调整菌体浓度为 1×10^4 CFU/mL。

1.6.3 牛津杯法

取适量指示菌加入 50 °C 左右的 LB 培养基,使培养基中指示菌为 1×10^6 CFU/mL,充分混匀后倒平板,将平板敞口放置在操作台

90 min 吹干凝固,随后将牛津杯放置于平板表面,加入 200 μ L CFS,冰箱 4 °C 扩散 12 h,最后 37 °C 培养 8–10 h 观察其抑菌情况并测量抑菌圈直径^[12]。

1.6.4 微量孔板法

96 孔板每孔加入 190 μ L CFS 以及 10 μ L 指示菌悬液,用 MRS 代替 CFS 作为对照。在 28 °C 培养 48 h 后于酶标仪 580 nm 处测定其吸光度。乳杆菌的抑菌活性以其对指示真菌的抑菌率^[13]按照公式(4)计算。

$$\text{抑菌率}(\%) = (1 - OD_{\text{LAB}}) / OD_{\text{Control}} \times 100 \quad (4)$$

式中: OD_{LAB} 为样品组的吸光度, OD_{Control} 为对照组的吸光度。

1.7 CFS 中抑菌物质的探究

1.7.1 有机酸排除

用 0.2 mol/L 的无菌 NaOH 调节 CFS 到 pH 5.50,排除乳酸和乙酸的影响^[14],调节好的 CFS 用 0.22 μ m 水系滤膜过滤后进行抑菌实验。

1.7.2 过氧化氢排除

将适量过氧化氢酶溶解于 pH 为 7.00 的 PBS 缓冲液中,得到一定浓度的过氧化氢酶母液。测定 CFS 的初始 pH,调节 CFS 的 pH 为 7.00,将过氧化氢酶母液加入 CFS 至最终浓度为 5 mg/mL, 37 °C 反应 2 h,然后沸水浴 5 min 使酶灭活,将 CFS 的 pH 调节到初始 pH^[15],用 0.22 μ m 水系滤膜过滤,进行抑菌实验。

1.8 数据处理和分析

本研究使用 SPSS 22.0 和 Origin 2017 进行数据分析及绘图。符合正态分布的计量资料采用“均数 \pm 标准差”表示,数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并利用 Duncan's 法检验处理间的差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 菌株分离结果

采用微生物传统分离方法,用 MRS 培养

基从阴道样品中初步分离出 5 株疑似乳杆菌的菌株。对照菌株 DM8909 和 5 株分离菌株的菌落形态如图 1 所示, 对照菌株 DM8909 的菌落为乳白色, 表面光滑、隆起, 边缘整齐, 易挑起。Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的菌落为白色, 表面干燥无光泽, 扁平, 边缘整齐, 不易挑起。

Q6.3 和 BHG05 的菌落为乳白色, 表面光滑、隆起, 边缘整齐, 易挑起。6 株菌株的菌体形态如图 2 所示, 对照菌株 DM8909 的菌落的菌体为较粗的杆状, Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的菌体为细长的杆状, Q6.3 和 BHG05 的菌体为短杆状。

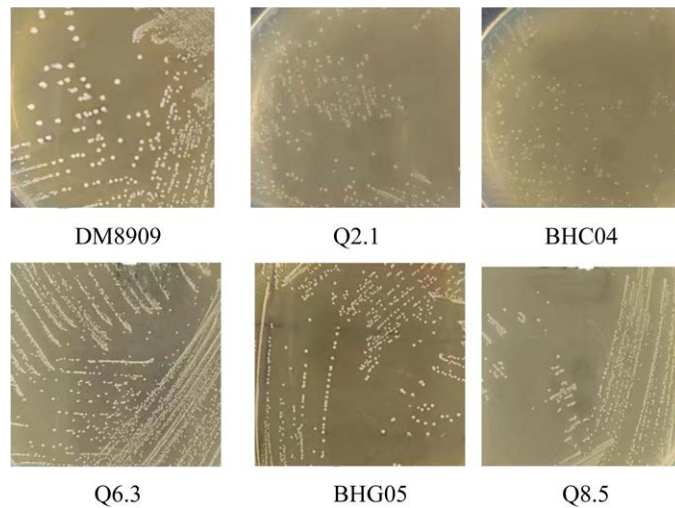


图 1 乳杆菌的菌落形态

Figure 1 Colony morphology graph of lactic acid bacteria.

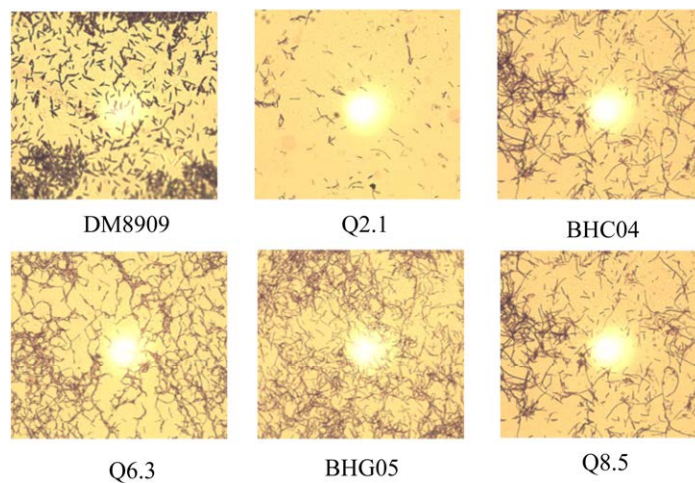


图 2 乳杆菌的菌体形态(100×)

Figure 2 Cell morphology graph of lactic acid bacteria (100×).

2.2 菌株的 16S rRNA 基因鉴定

将 16S rRNA 基因鉴定结果在 NCBI 网站进行 BLAST 同源性对比, DM8909 为德氏乳杆菌, Q2.1、BHC04 和 Q8.5 为卷曲乳杆菌, Q6.3 和 BHG05 为格氏乳杆菌。

2.3 乳杆菌的生长特性

菌株的生长曲线如图 3 所示, 0–4 h 时为菌株生长的延滞期, 但菌株 Q2.1、BHC04 和 BHG05 增长较快, 这 3 株乳杆菌延滞期较短, 可见其适应环境能力强, 4–12 h 为对数生长期, 除 Q8.5 外, 各菌株迅速增长, 20 h 时除 Q8.5 外, 其余菌株均已进入稳定生长期, Q8.5 的对数生长期较长, 在 32 h 基本稳定。在相同培养时间内, 菌株 BHC04 和 Q6.3 的生长繁殖能力最强, 最终菌液浓度最高。

乳杆菌培养液 pH 值变化与菌株的生长情况密切相关。菌株的生长曲线如图 4 所示, 0–20 h pH 随着菌体数目的增加而快速降低, 24 h 后随着培养时间的延长, 导致代谢产物积累和营养物质消耗, 使得待测菌株的增殖速度受到明显抑制, pH 值的下降速率减缓。在 48 h 时, 比较发现 BHG05、Q6.3 和 Q8.5 的产酸能力较强, 最终 pH 分别为 3.90、3.80 和 4.03。

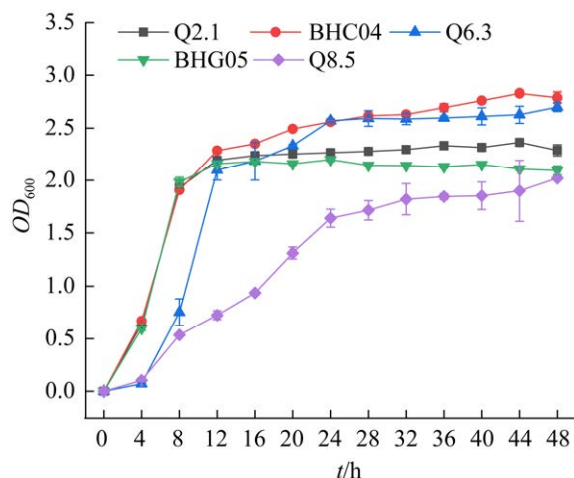


图 3 乳杆菌的生长曲线

Figure 3 Growth curves of lactic acid bacteria.

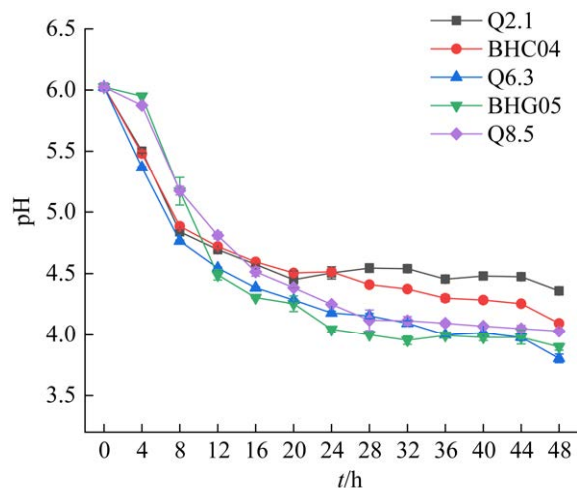


图 4 乳杆菌的产酸曲线

Figure 4 Acid production curves of lactic acid bacteria.

2.4 菌株的黏附能力评价

2.4.1 菌株的疏水能力

菌体表面的疏水性与黏附能力呈正相关关系^[16], 因此疏水能力常常用来评价乳杆菌的黏附性能。如图 5 所示, 5 株乳杆菌的表面疏水能力均显著高于对照菌株 DM8909, 说明 5 株菌均

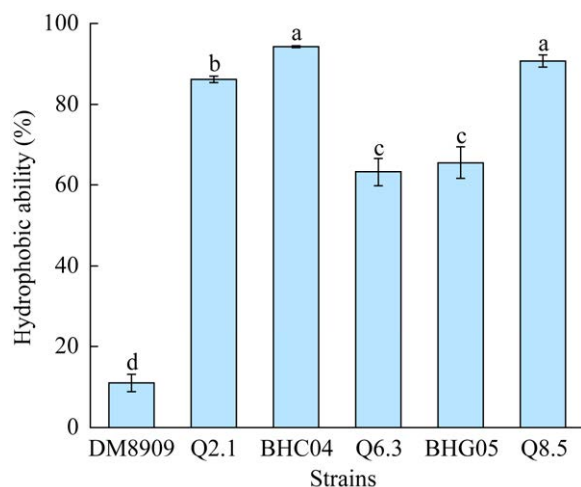


图 5 乳杆菌的疏水能力

Figure 5 Hydrophobic ability of lactic acid bacteria. Different letters (a, b, c and d) indicate statistical significance ($P < 0.05$). The same below.

具有较强的疏水能力。卷曲乳杆菌 BHC04 和 Q8.5 的疏水能力最强, 分别为 94.26% 和 90.72%。另外发现, 卷曲乳杆菌 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的疏水能力均在 85.00% 以上, 格氏乳杆菌 Q6.3 和 BHG05 的疏水能力也无显著性差异, 3 株卷曲乳杆菌的疏水能力均显著高于 2 株格氏乳杆菌, 这表明相同菌种的表面疏水能力可能相似, 即菌株的疏水能力与菌种有关, 由研究结果可以发现卷曲乳杆菌具有较强的表面疏水能力。

2.4.2 菌株的自凝集率

菌株的自凝集率如图 6 所示, 6 株菌的自凝集率均在 40.00% 以上, 卷曲乳杆菌 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的自凝集率显著高于对照菌株, 分别为 75.75%、78.95% 和 87.99%。格氏乳杆菌 BHG05 的自凝集率为 53.37%, 显著高于对照菌株, 格氏乳杆菌 Q6.3 的自凝集率为 43.86%, 显著低于对照菌株(DM8909 为 50.69%)。3 株卷曲乳杆菌的自凝集率均显著高于 2 株格氏乳杆菌, 因此可以推测菌株的自凝集率也与菌种有关, 卷曲乳杆菌具有较强的自凝集率。

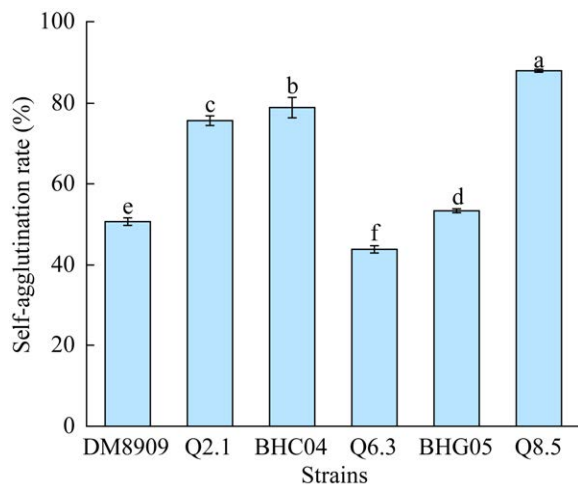


图 6 乳杆菌的自凝集率

Figure 6 The self-agglutination rate of lactic acid bacteria.

2.4.3 乳杆菌和致病菌的共凝集率

与大肠杆菌的共凝集率见图 7A, 卷曲乳杆菌 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的与大肠杆菌的共凝集率显著高于对照菌株, 分别为 58.24%、61.38%

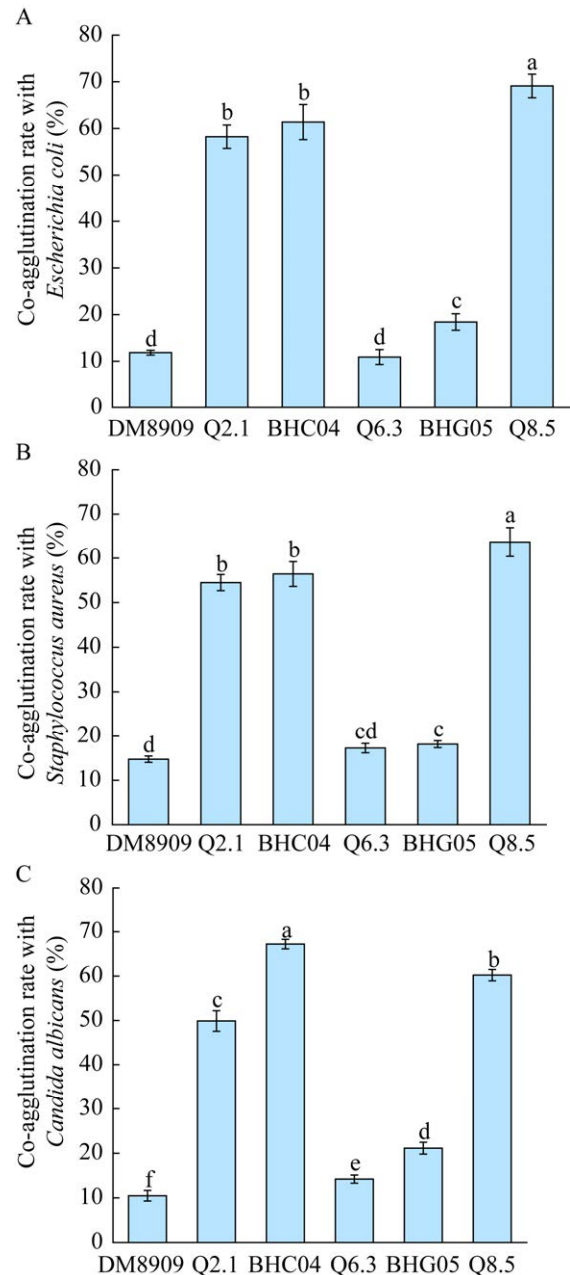


图 7 乳杆菌与大肠杆菌(A)、金黄色葡萄球菌(B)和白假丝酵母(C)的共凝集率

Figure 7 The co-agglutination rate of lactic acid bacteria with *Escherichia coli* (A), *Staphylococcus aureus* (B), and *Candida albicans* (C).

和 69.11%。格氏乳杆菌 BHG05 与大肠杆菌的共凝集率为 18.41%，显著高于对照菌株，Q6.3 与大肠杆菌的共凝集率与对照菌株无显著性差异。与金黄色葡萄球菌的共凝集率见图 7B，卷曲乳杆菌 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 的与金黄色葡萄球菌的共凝集率显著高于对照菌株，分别为 54.48%、56.43%和 63.67%。格氏乳杆菌 Q6.3 和 BHG05 与金黄色葡萄球菌的共凝集率与对照菌株存在显著性差异，分别为 17.27%和 18.17%。与白假丝酵母的共凝集率见图 7C，卷曲乳杆菌 Q2.1、BHC04 和 Q8.5 与白假丝酵母的共凝集率显著高于对照菌株，分别 49.88%、67.21%和 60.22%。格氏乳杆菌 BHG05 和 Q6.3 与白假丝酵母的共凝集率为 21.14%和 14.21%，显著高于对照菌株。3 株卷曲乳杆菌与致病菌的共凝集率均显著高于 2 株格氏乳杆菌，可以推测菌株的共凝集率也与菌种有关，卷曲乳杆菌具有较强的共凝集率。综上所述，乳杆菌 Q2.1、BHC04、Q8.5 和 BHG05 均具有较强的黏附能力，而且黏附能力与乳杆菌种类有关，卷曲乳杆菌具有更强的黏附能力。

2.5 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制能力

选取 DM8908 为阳性对照菌株，以乳酸链

球菌素(nisin)为阳性对照^[17]，用牛津杯法以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为指示菌评价筛选菌株的抑菌能力。结果如表 1 所示，对大肠杆菌抑制能力较强的菌株依次为 Q8.5 (25.00±2.18) mm、BHG05 (23.67±1.76) mm、BHC04 (23.50±1.50) mm、Q2.1 (21.83±2.02) mm 和 Q6.3 (21.00±0.50) mm。对金黄色葡萄球菌抑制能力较强的菌株依次 BHC04 (26.00±2.65) mm、Q6.3 (25.67±1.53) mm、BHG05 (25.00±1.00) mm、Q2.1 (23.67±3.21) mm 和 Q8.5 (22.17±2.02) mm。这 5 株菌产生抑菌圈的大小均在 20.00 mm 以上，其中 BHC04、BHG05 和 Q8.5 对大肠杆菌的抑制能力与对照菌株 DM8909 存在显著性差异，5 株菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制能力显著高于阳性对照乳酸链球菌素。由图 8 可知，5 株菌对大肠杆菌产生的抑菌圈透明且明显大于乳酸链球菌素，说明其抑菌潜力巨大。另外研究发现，这 5 株菌的 CFS 的 pH 均可达到 pH 4.00 以下，推测其抑菌能力可能与发酵液 pH 存在某种联系。

2.6 对白假丝酵母的抑制能力

由表 2 可知，BHG05 对白假丝酵母的抑制能力显著高于阳性菌株 DM8909，为(73.14±0.14)%。BHC04 和 Q8.5 对白假丝酵母的抑制能力与

表 1 CFS 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制能力

Table 1 The inhibitory capacity of CFS against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Strains	pH	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)
DM8909	3.97	20.00±2.65ab	22.67±1.15a
Q2.1	3.86	21.83±2.02a	23.67±3.21a
BHC04	3.87	23.50±1.50a	26.00±2.65a
Q6.3	3.86	21.00±0.50ab	25.67±1.53a
BHG05	3.80	23.67±1.76a	25.00±1.00a
Q8.5	3.86	25.00±2.18a	22.17±2.02a
Nisin	—	14.67±1.15c	18.33±1.15b

Different letters (a, b, and c) at the same rank indicate statistical significance ($P<0.05$), the outer diameter of the inhibitory circle is 7.80 mm, and the activity of nisin is 1 000 IU/mL. — indicated that pH was not measured.

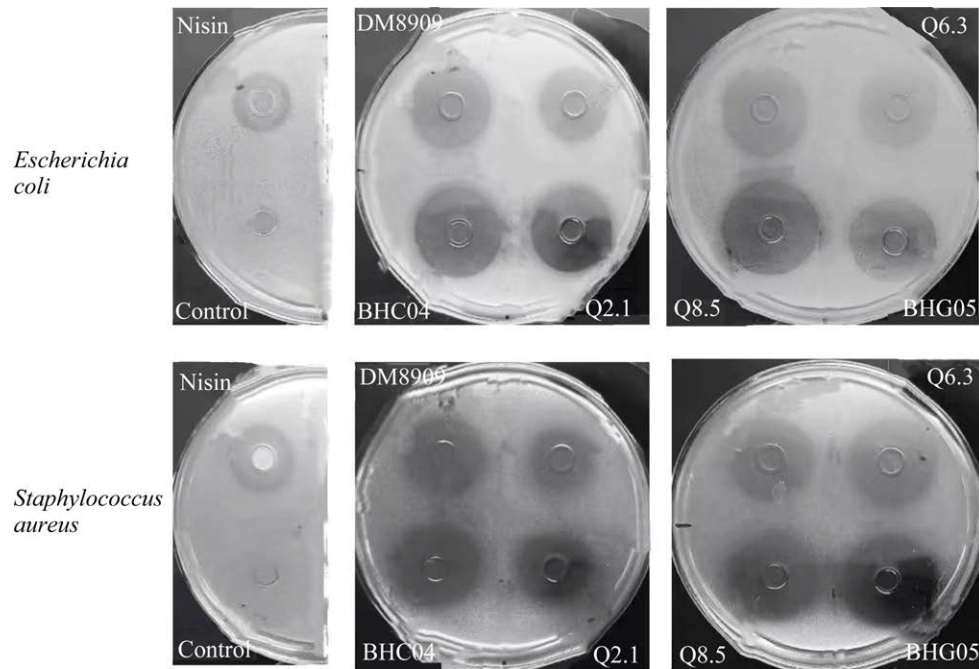


图 8 CFS 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌产生的抑菌圈

Figure 8 Inhibition zone produced by CFS on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The outer diameter of the inhibitory circle is 7.80 mm, and the activity of nisin is 1 000 IU/mL.

表 2 CFS 对白假丝酵母的抑制能力

Table 2 The inhibitory capacity of CFS against *Candida albicans*

Strains	pH	<i>Candida albicans</i> (%)
DM8909	3.97	72.58±0.18b
Q2.1	3.86	71.92±0.33c
BHC04	3.87	72.80±0.30ab
Q6.3	3.86	72.12±0.21c
BHG05	3.80	73.14±0.14a
Q8.5	3.86	72.93±0.10ab
Nisin	—	57.07±0.49d

Different letters (a, b, c, and d) indicate statistical significance ($P < 0.05$), the outer diameter of the inhibitory circle is 7.80 mm, and the activity of nisin is 1 000 IU/mL. — indicated that pH was not measured.

DM8909 无显著性差异, 可达(72.80±0.30)%和(72.93±0.10)%. 5 株菌对白假丝酵母的抑制能力显著高于阳性对照乳酸链球菌素。综上所述, BHC04 和 BHG05 对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)、革兰氏阳性菌(金黄色葡萄菌)和真菌(白假

丝酵母)均具有较强的抑制能力, 选取 BHC04 和 BHG05 作为具有抑菌潜力的优质菌株。

2.7 有机酸排除试验

由表 3 可知, 调节 CFS 的 pH 为 5.50 之后, CFS 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制能力消失, 可推测 6 株乳酸菌主要通过产生有机酸发挥抑菌能力。然而也有研究表明抑菌类物质在酸性条件下发挥抑菌作用, 可能调节 pH 破坏了抑菌成分^[18]。CFS 对白色念珠菌的抑菌能力见表 3, 对照菌株 DM8909 的抑制效果经酸排除后显著下降, 说明对照菌株的抑菌效果大部分来自有机酸。5 株乳酸菌 CFS 酸排除后抑菌效果均有下降, 但抑制率仍保持在 60.00%以上, 菌株 Q6.3 和 BHG05 的 CFS 在 pH 5.50 时对白色念珠菌的抑菌率可达 (70.12±1.67)% 和 (72.80±1.04)%, 表明这 5 株乳酸菌可能分泌除有机酸以外的其他抑菌物质。

表 3 有机酸排除试验结果

Table 3 Elimination of organic acid

Strains	<i>Escherichia coli</i> (mm)		<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)		<i>Candida albicans</i> (mm)	
	CFS	CFS of pH 5.50	CFS	CFS of pH 5.50	CFS	CFS of pH 5.50
DM8909	24.00±1.87	0	24.67±2.01	0	75.17±0.20a	47.66±0.54b
Q2.1	23.50±0.41	0	24.00±1.41	0	75.59±0.08a	69.51±1.35b
BHC04	24.67±2.66	0	27.75±1.25	0	75.78±0.36a	69.13±0.76b
Q6.3	23.67±1.70	0	25.00±2.16	0	75.19±0.29a	70.12±1.67b
BHG05	28.00±2.16	0	23.17±2.09	0	74.73±0.17a	72.80±1.04b
Q8.5	23.83±0.24	0	23.67±1.25	0	75.40±0.19a	67.47±1.02b

Different letters (a and b) indicate statistical significance ($P<0.05$).

2.8 过氧化氢排除试验

乳酸菌在发酵过程中不仅会产生乳酸、乙酸等有机酸，还会产生具有抑菌作用的过氧化氢^[19]。乳酸菌自身不具备过氧化氢酶，这会导致环境中过氧化氢不断积累，抑制其他菌的生长^[20]。由图 9A 和 9B 可知，经过过氧化氢酶处理后，6 株乳酸菌的抑菌能力在处理前后不存在显著性差异，推测可能是乳酸菌产生的过氧化氢较少，并且大肠杆菌和金黄色葡萄球菌对过氧化氢不敏感。由图 9C 可知，6 株乳酸菌的 CFS 对白色念珠菌的抑制能力在处理前后均存在显著性差异，这说明白色念珠菌对过氧化氢更敏感。嗜酸乳杆菌及保加利亚乳杆菌在生长繁殖

过程中产生的过氧化氢可以抑制金黄色葡萄球菌、荧光假单胞杆菌及大肠杆菌等常见致病菌的活性^[21-22]。

3 讨论与结论

本文采用传统微生物分离方法，从健康女性阴道样品中分离得到 5 株乳杆菌，其中 3 株卷曲乳杆菌和 2 株格氏乳杆菌。研究发现，5 株乳杆菌均具有良好的生长繁殖能力，延滞期短，20 h 即可达到生长稳定期，并且 5 株菌均具有良好的产酸能力，其中 BHG05、Q6.3 和 Q8.5 的产酸能力可达 3.80–4.03，乳杆菌可以通过分解糖原产生乳酸，增加阴道酸度，降低阴道的 pH 值，

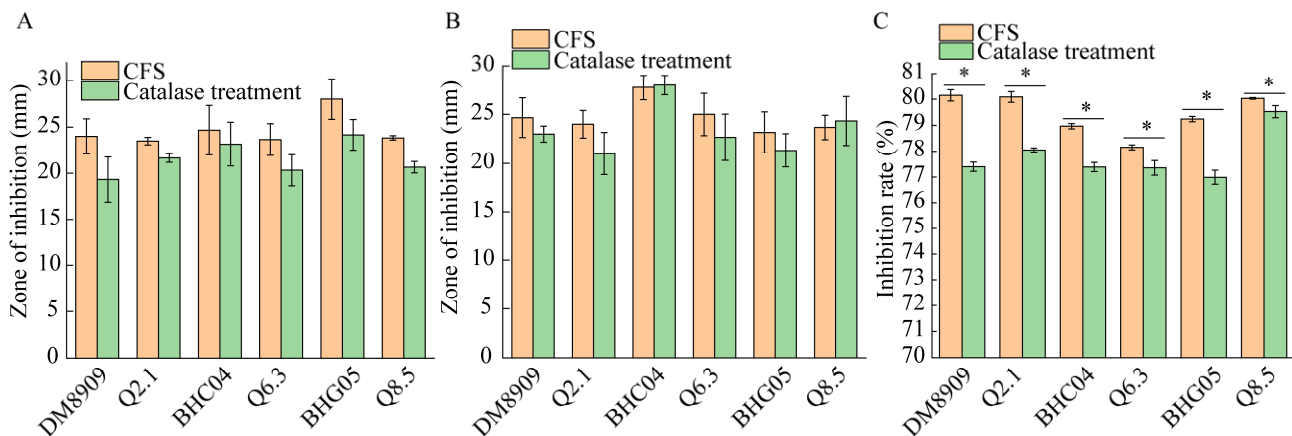


图 9 过氧化氢排除试验

Figure 9 Elimination of hydrogen peroxide. A: *Escherichia coli*. B: *Staphylococcus aureus*. C: *Candida albicans*. * indicates significant difference before and after treatment ($P<0.05$).

从而抑制有害微生物在阴道内的定殖^[23]。乳杆菌的黏附能力主要从表面疏水性、自凝集率及与病原菌的共凝集率这3个方面进行评价^[11]。细菌的黏附能力在衡量菌株抵抗病原菌的入侵、平衡肠道菌群以及免疫调节宿主生物活性等功能中扮演着一个重要的角色^[24]，乳杆菌的黏附作用被认为是发挥抑菌作用的前提。乳杆菌可通过黏附素与上皮细胞表面的受体结合定殖于细胞表面并占据空间位置，与病原菌形成位置竞争和营养物质竞争，进而阻止病原菌的黏附和侵袭，抑制病原菌的大量繁殖^[25]。乳杆菌的自聚集率与菌株黏附定殖能力有关，是乳杆菌发挥生理功能、免疫调节和生物拮抗等作用必要条件^[26]。乳杆菌自聚集率越强，其对上皮细胞的黏附能力则越强^[27]。共聚集率较强的乳杆菌可以防止致病菌黏附到阴道上皮，从而达到抑菌的效果。对5株乳杆菌的黏附作用进行评价，发现Q2.1、BHC04和Q8.5的表面疏水性、自凝集率及与病原菌的共凝集率均高于对照菌株，另外本研究发现，卷曲乳杆菌的表面疏水性、自凝集率及与病原菌的共凝集率显著高于格氏乳杆菌，推测乳杆菌的黏附能力与菌株的种属相关。益生菌黏附机体上皮细胞后，可以通过分泌有机酸、抗菌肽等物质来抑制微生物^[28]。需氧性阴道炎主要由大肠杆菌和金黄色葡萄球菌这些需氧菌引起，外阴阴道假丝酵母菌病的主要病原体为白假丝酵母^[29]。本研究分离的5株乳杆菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白假丝酵母均具有较强的抑制能力，综合比较筛选出BHC04和BHG05为具有抑菌潜力的优质菌株。5株乳酸菌主要通过产生有机酸和过氧化氢发挥抑菌作用。

阴道微生态菌群的平衡主要是以乳杆菌菌群来维持的，其中以卷曲乳杆菌、詹氏乳杆菌、格氏乳杆菌和嗜性乳杆菌等益生乳杆菌构成。乳杆菌作为阴道微生态中的优势菌群，不

仅可以维持阴道微生态健康，而且起到预防阴道感染的作用，在抵御病原微生物的入侵中发挥着不可替代的作用^[23]。乳杆菌可通过产生抗菌物质或与病原菌竞争等方式来抑制病原菌的增殖^[30]。乳杆菌还可通过参与机体免疫调节，促进抗炎因子IL-1RA的分泌，抑制IL-6、IL-8等促炎因子的分泌，维持免疫平衡，恢复阴道微生态健康^[31]。研究表明乳杆菌可通过产生抗菌物质(有机酸、过氧化氢、细菌素)，自动聚集作用以及竞争阴道上皮中的营养物质和黏附位置等作用抑制体内病原体的过度繁殖^[32]，维持女性生殖道系统稳定。

20世纪80年代我国就成功研发出用于治疗阴道炎的阴道乳酸菌活菌制剂——定君生，目前已经广泛应用于临床且具备良好的治疗效果，是治疗女性细菌性阴道疾病的理想药物^[33]。乳杆菌作为一种女性益生菌已被用于预防阴道炎症和调节阴道微生态系统。然而，目前国内可供选择的女性益生菌产品种类有限，因此开发能够预防和治疗女性生殖道疾病，改善阴道微环境，增强女性生殖健康的乳酸菌制剂是十分必要和紧迫的^[34]。本研究从健康成年女性阴道分离出5株乳杆菌，初步研究结果表明其具有较好的黏附特性和抑菌能力，未来有望将应用于女性微生态制剂领域。然而，本研究还不够深入，还需要体内和临床试验去验证其抑菌效果。不同乳杆菌菌种、菌株之间的生物学功能不尽相同^[35]，筛选出的菌株的安全性与无毒性检测等还需进一步验证。目前，国内、外关于微生态制剂的报道也主要是抑制细菌性阴道炎，还未见抑制真菌性阴道炎的妇科用微生态制剂，本研究筛选出的菌株可以抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白假丝酵母，有望解决需氧性和真菌性阴道炎，这不仅可以提高妇女生活质量，还可带动相关产业发展，为社会创造更大的经济效益。

参考文献

- [1] MENDLING W. Vaginal microbiota[M]// Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2016: 83-93.
- [2] 魏旭, 曲冬颖, 李娟, 周琳, 关怀. 阴道菌群失调与宫颈癌发病的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(11): 1361-1364.
- WEI X, QU DY, LI J, ZHOU L, GUAN H. Vaginal microbiota and cervical cancer: research progress[J]. Chinese Journal of Microecology, 2023, 35(11): 1361-1364 (in Chinese).
- [3] 朱钰瑶, 赵婷, 陶兴花, 高美秀, 和文丽, 张琼, 袁涛. 妇科恶性肿瘤患者阴道微生态状况[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(4): 459-462.
- ZHU YY, ZHAO T, TAO XH, GAO MX, HE WL, ZHANG Q, YUAN T. Vaginal microecology of gynecological malignant tumors[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(4): 459-462 (in Chinese).
- [4] SONG N, KAN S, PANG Q, MEI H, ZHENG H, LI D, CUI F, LV G, AN R, LI P, XIONG Z, FAN S, ZHANG M, CHEN Y, QIAO Q, LIANG X, CUI M, LI D, LIAO Q, LI X, LIU W. A prospective study on vulvovaginal candidiasis: multicentre molecular epidemiology of pathogenic yeasts in China[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2022, 36(4): 566-572.
- [5] LAMBERT JA, JOHN S, SOBEL JD, AKINS RA. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: recognition of the conversion process[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82599.
- [6] SOUSA LGV, PEREIRA SA, CERCA N. Fighting polymicrobial biofilms in bacterial vaginosis[J]. Microbial Biotechnology, 2023, 16(7): 1423-1437.
- [7] 肖冰冰, 廖秦平. 利用 DNA 指纹图谱技术对健康女性阴道菌群多样性的分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2012, 44(2): 281-287.
- XIAO BB, LIAO QP. Analysis of diversity of vaginal microbiota in healthy Chinese women by using DNA fingerprinting[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2012, 44(2): 281-287 (in Chinese).
- [8] 肖卓然, 白会会, 刘朝晖. 嗜性乳杆菌对女性生殖道健康影响的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(11): 1348-1351, 1355.
- XIAO ZR, BAI HH, LIU ZH. Effects of *Lactobacillus iners* on female genital tract health: research progress[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(11): 1348-1351, 1355 (in Chinese).
- [9] BALASUBRAMANIAN B, SOUNDHARRAJAN I, AL-DHABI NA, VIJAYARAGHAVAN P, BALASUBRAMANIAN K, VALAN ARASU M, CHOI KC. Probiotic characteristics of *Ligilactobacillus salivarius* AS22 isolated from sheep dung and its application in corn-fox tail millet silage[J]. Applied Sciences, 2021, 11(20): 9447.
- [10] LEE KW, PARK JY, JEONG HR, HEO HJ, HAN NS, KIM JH. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces[J]. Anaerobe, 2012, 18(1): 96-102.
- [11] 白霞, 崔梦含, 朱鹏程, 苏雅航, 刘爽, 王金丽, 李东亮, 唐俊妮. 3 株魏斯氏菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(9): 59-69.
- BAI X, CUI MH, ZHU PC, SU YH, LIU S, WANG JL, LI DL, TANG JN. Isolation, identification and biological characteristics of 3 strains of *Weissella*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(9): 59-69 (in Chinese).
- [12] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 552-553.
- SHANG H, WANG YS, SHEN ZY. National Guide to Clinical Laboratory Procedures[M]. 4th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 552-553 (in Chinese).
- [13] WANG S, WANG QY, YANG EC, YAN L, LI T, ZHUANG H. Antimicrobial compounds produced by vaginal *Lactobacillus crispatus* are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 564.
- [14] de AZEVEDO POS, CONVERTI A, GIERUS M, OLIVEIRA RPS. Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*: from shake flasks to bioreactor[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(1): 461-469.
- [15] MA JH, HONG Y, DENG LL, YI LH, ZENG KF. Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum* on Citrus[J]. Biological Control, 2019, 138: 104044.
- [16] 吴梵, 马国文, 曾照中, 洪维鍊, 倪丹, 郭宇星. 副干酪乳酪杆菌 K56 表面蛋白及其黏附性能的研究[J]. 食品科学, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20240329.1152.014.html>.
- WU F, MA GW, ZENG ZZ, HONG WL, NI D, GUO XY. Surface Protein and adhesion properties of *Lactocaseibacillus paracasei* K56[J]. Food Science, 2024. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20240329.1152.014.html> (in Chinese).
- [17] 陆洲, 戴意强, Hafiz Abdul RASHEED, 吴寒, 夏秀东, 董明盛. 植物乳杆菌 D1501 发酵黄浆水的抑菌活性及其中细菌素的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 117-124.
- LU Z, DAI YQ, RASHEED H, WU H, XIA XD,

- DONG MS. Antimicrobial activity of soy whey fermented by *Lactobacillus plantarum* D1501 and purification and identification of bacteriocin from it[J]. Food Science, 2020, 41(24): 117-124 (in Chinese).
- [18] 武昌俊, 戴陈伟, 蔡标, 童琳, 葛瑞钦, 李舜. 一株安徽传统酸奶中产抑菌物质的乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5779-5785. WU CJ, DAI CW, CAI B, TONG L, GE RQ, LI S. Isolation and identification of a bacteriostatic-producing lactic acid bacterium from traditional fermented milk in Anhui[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(17): 5779-5785 (in Chinese).
- [19] 侯楠楠, 张建梅, 谢全喜. 乳酸菌对肠道微生物屏障的调控作用[J]. 广东饲料, 2015, 24(3): 34-35. HOU NN, ZHANG JM, XIE QX. Regulatory effect of lactic acid bacteria on intestinal microbial barrier[J]. Guangdong Feed, 2015, 24(3): 34-35 (in Chinese).
- [20] COLLINS EB, ARAMAKI K. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(3): 353-357.
- [21] DAHIYA RS, SPECK ML. Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Dairy Science, 1968, 51(10): 1568-1572.
- [22] 叶德晓, 游泽芳, 柴将红. 细菌性阴道病的治疗进展[J]. 皮肤病诊疗学杂志, 2023, 30(6): 567-573. YE DX, YOU ZF, CHAI JH. Progress in the treatment of bacterial vaginosis[J]. Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-Venereology, 2023, 30(6): 567-573 (in Chinese).
- [23] GRIGORYAN S, BAZUKYAN I, TRCHOUNIAN A. Aggregation and adhesion activity of *lactobacilli* isolated from fermented products *in vitro* and *in vivo*: a potential probiotic strain[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2018, 10(2): 269-276.
- [24] 王晓萌, 韩张鹏, 李佳乐, 付梦琪, 桑亚新, 高洁. 乳杆菌表层蛋白功能研究进展[J]. 中国食品学报, 2023, 23(6): 411-419. WANG XM, HAN ZP, LI JL, FU MQ, SANG YX, GAO J. Research progress on the function of surface layer protein of lactic acid bacteria[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(6): 411-419 (in Chinese).
- [25] 杨珍珠, 潘秭琪, 迟海, 陶乐仁. 羊奶源产细菌素乳酸菌筛选、鉴定及益生特性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 71-77. YANG ZZ, PAN ZQ, CHI H, TAO LR. Screening, identification and probiotic characteristics of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria from goat milk[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 71-77 (in Chinese).
- [26] MALDONADO NC, de RUIZ CS, OTERO MC, SESMA F, NADER-MACÍAS ME. Lactic acid bacteria isolated from young calves: characterization and potential as probiotics[J]. Research in Veterinary Science, 2012, 92(2): 342-349.
- [27] 朱妍, 刘慧燕, 闫丹丽, 赵春光, 滕政蓉, 张英, 刘晓燕, 方海田, 武俊瑞. 益生菌缓解金黄色葡萄球菌感染牛乳腺炎的研究与应用进展[J]. 中国乳品工业, 2024, 52(1): 33-39. ZHU Y, LIU HY, YAN DL, ZHAO CG, TENG ZR, ZHANG Y, LIU XY, FANG HT, WU JR. Research status of probiotics in alleviating bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*[J]. China Dairy Industry, 2024, 52(1): 33-39 (in Chinese).
- [28] FUNG S, SHIRLEY M. Oteseconazole in recurrent vulvovaginal candidiasis: a profile of its use[J]. Drugs & Therapy Perspectives, 2023, 39(8): 263-269.
- [29] KONG L, KONG J, CHAI ZH, TAO GX, CAI XL, YING LX, SHI JM. Recombinant interferon α -2B gel combined with *Lactobacillus* as a vaginal capsule in patients with cervical high-risk human papillomavirus[J]. Current Topics in Nutraceutical Research, 2023, 21(1): 47-52.
- [30] XU C, FU YY, LIU F, LIU ZJ, MA JG, JIANG R, SONG CN, JIANG ZM, HOU JC. Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 137: 110338.
- [31] CHEE WJY, CHEW SY, THAN LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 203.
- [32] MOHAMED AS, REDA FM, SHINDIA AAH, HASSANIEN WAG. A novel cyclic dipeptide from *Lactiplantibacillus plantarum* MC39 inhibits proliferation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* W8 and *Enterobacter hormaechei* U25[J]. International Dairy Journal, 2023, 142: 105553.
- [33] 刘佳明, 袁杰利, 李国峰, 张大伟. 乳杆菌 DM8909 菌株抑制小鼠阴道感染的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(2): 80-81, 84. LIU JM, YUAN JL, LI GF, ZHANG DW. Study in inhibition vaginal infection in mice with *Lactobacillus* DM8908 strain[J]. Chinese Journal of Microecology, 2003, 15(2): 80-81, 84 (in Chinese).
- [34] JIA L, SUN WL, LI WB, DONG Y, WU LL, SALDAÑA MDA, GAO Y, JIN Y, SUN WX. A colour indicator film based on bromothymol blue/poly-L-lactic acid/polyvinylpyrrolidone for detecting bacteria[J]. Packaging Technology and Science, 2023, 36(7): 549-556.
- [35] BARRONS R, TASSONE D. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review[J]. Clinical Therapeutics, 2008, 30(3): 453-468.