微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):676－680; 4 May 2010
ISSN 0001－6209; CN 11－1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

# 流式细胞术在乳酸菌自溶检测中的应用

孙洁,吕加平*,刘鹭,张书文
(中国农业科学院农产品加工研究所,农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室,北京 100193)

**摘要**:【目的】使用流式细胞术(Flow Cytometric)建立一种新的检测方法,可快速筛选自溶度不同的乳酸菌菌株。【方法】菌悬液经 20 mmol/L 的 PI-PBS 染液在 4℃条件下避光染色 30 min,上流式细胞仪进行测定,检测器激发光波长 488 nm,检测波长 630 nm,每个样品收集 $1\times10^5$ 个细胞,联机使用 CellQuest 软件分析结果。【结果】阳性染色细胞数与细胞总数之比很好地反映菌液中自溶细胞与非自溶细胞的比例关系,整个检测过程耗时仅为 1 h 左右。【结论】与传统检测方法比较,FCM 测定结果稳定可靠,检测时间短,为乳酸菌的自溶特性研究及筛选自溶度不同的菌株用作商业发酵剂提供了便利条件。

**关键词**: 流式细胞术; 乳酸菌; 自溶; 检测
**中图分类号**: Q93-3 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209 (2010) 05-0676-05

利用乳酸菌的自溶特性对发酵乳制品品质进行改良具有较高的经济价值。在干酪生产中乳酸菌的快速自溶可加速干酪的成熟过程,缩短生产周期、降低成本,同时菌体自溶释放的胞内物质也是干酪风味和感官特性的决定因素[1-2]。在酸奶生产贮存过程中,菌体自溶可造成一些不良影响,如活菌数的减少会降低酸乳的保健功能,但适度自溶又可减轻酸奶的后酸化并改善酸奶风味。培养环境的温度、pH 值、盐浓度、金属离子的种类及浓度等都可成为影响乳酸菌自溶的因素[4-5],在发酵工业生产中以筛选不同自溶度的菌株发酵剂作为手段,可较好地控制产品的成熟周期及感官品质,因此对发酵剂菌株自溶度的精确判定显得尤为重要。

目前,普遍采用的细菌自溶度检测方法主要有以下几种:(1)将菌体悬浮在缓冲溶液中,测定其在波长 650 nm 处吸光值的下降幅度来评价菌体的自溶度;(2)平板培养后进行菌落计数并进行换算;(3)标记细胞内的 DNA,根据细胞向环境中释放的 DNA 的量来估算菌体的自溶度;(4)标记细胞内的酶类(如乳酸脱氢酶、肽酶等),测定菌体向培养环境中释放出酶的活力,以此估算乳酸菌的自溶度。但是,上述方式都存在着干扰因素过多、准确度不足、不够直观或检测周期长等弊端。流式细胞仪可快速、精确地测量通过检测区的细胞,具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大、分析全面、方法灵活及分选所需细胞等特殊功能,这些优点是其他方法无法比拟的[6]。本研究即使用流式细胞术(Flow Cytometric Method, FCM)测定菌体自溶度,建立了一种准确、快速的乳酸菌自溶检测方法,为乳酸菌的自溶特性研究提供便利。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1** 菌株和培养基:供试菌株均来自于本实验室储备菌株,经 API 系统鉴定,置信区间均在 98% 以上,分别为嗜热链球菌(*Streptococcus salivarius ssp.*) GS1、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*) LD3、和乳酸乳杆菌

**基金项目**:国家科技部"十一五"奶业产业化支撑计划(2006BAD04A07,2006BAD04A10)
* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62815542; E-mail: lvjp586@vip.sina.com
**作者简介**:孙洁(1980－),女,甘肃兰州人,博士研究生,研究方向为食品微生物与乳品加工。E-mail: jiesun80@gmail.com
**收稿日期**:2009-12-23; **修回日期**:2010-03-02

(*Lactococcus lactis ssp. Lactis*)SY15。纯化菌株用冷冻干燥机冻干保存于 -80℃低温冰箱,使用时经 MRS 肉汤 37℃条件下培养活化 3 次以上,储存于 4℃冰箱备用。

**1.1.2** 主要试剂和仪器:API® 试剂盒为法国生物-梅里埃公司出品,MRS 肉汤培养基购自北京陆桥公司,50 mmol/L PH 6.5 PBS 缓冲液:母液 A 和母液 B 为称取 41.74 g $K_2HPO$ 和 43.40 g $KH_2PO$ 加蒸馏水溶解后分别定容至 200 mL 和 500 mL,置 4℃冰箱备用。使用时取 31.5 mL 母液 A 和 68.5 mL 母液 B,加入 0.05% 吐温 20 并调节 pH 至 6.5。碘化丙锭(PI)为 Sigma 公司产品, PI-PBS 染液为 1 mg PI 溶于 1 mL 去离子水中,使用时由 PBS 缓冲液稀释至浓度为 20 mmol/L。LGJ-10 型冷冻干燥机由北京四环公司制造,FACSCalibur 流式细胞仪由美国 BD 公司制造,U-3010 全波段分光光度仪由日本 Hitach 公司制造。

### 1.2 菌体制备

活化菌株于 MRS 肉汤培养基 37℃下培养至稳定期,离心收集菌体细胞,重悬于 PBS 缓冲液中,置于 37℃保温,分别在 4、8、16、24 h 取样,离心收集菌体细胞(3000 × g,5 min),并用 PBS 缓冲液冲洗 2 次之后进行 PI 染色。

### 1.3 流式细胞仪(FCM)检测

将 1.2 中所得菌体细胞重悬于 PBS 缓冲液并调整吸光值($OD_{650}$)到 1.0 左右,使菌悬液细胞数控制在 $1 \times 10^7$ cells/mL,取 1 mL 菌液离心(3000 × g,5 min)弃上清液重悬于同体积 PI-PBS 染液中,4℃避光染色 30 min,以 400 目铜网过滤,上流式细胞仪进行测定。FCM 检测光源为氩离子激光,氩离子激发光波长 488 nm,检测器 FL3 检测波长 650 nm,每个样品收集 $1 \times 10^5$ 个细胞。以未经 PI 染色的菌悬液设置阴性对照;以经过热处理(70℃ 10 min)[7]的菌悬液染色作为阳性对照,用 CellQuest 软件进行数据分析。

### 1.4 FCM 方法准确性验证

活菌计数法[8]:将 1.2 中所得菌液梯度稀释,涂布于 MRS 琼脂平板内 37℃培养 48 h,进行菌落计数并与 FCM 结果对比。

比浊法[9]:取 1.2 中菌液,用分光光度仪测定菌液吸光值($OD_{650}$),计算乳酸菌自溶度并与 FCM 方法进行结果对比。自溶度计算公式:自溶度(%) = $\left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \times 100$,其中 $A_1$ 为菌液吸光值;$A_2$ 为菌液初始吸光值[10]。

## 2 结果和讨论

### 2.1 FCM 分析乳酸菌自溶结果

碘化丙锭(PI)可与细胞内的 DNA 嵌合,对细菌进行标记,但是 PI 不能穿透活细菌的细胞膜,它只能在细胞膜破损的情况下进入细菌内,并与细菌 DNA 和 RNA 相结合,在 488 nm 的激光激发下,可在波长 660 nm 左右检测到红色荧光信号[11]。利用 PI 的这一特性可标记乳酸菌的自溶状况:乳酸菌在自溶初期细胞膜通透性增加,到自溶后期细胞膜破裂,这一过程中细胞阳性染色率将逐渐增大,在流式细胞仪中收集样品信号,根据细胞所处的位置设合适的"门",将其分为染色阳性区与染色阴性区,得到相应的 FCM 图谱,如图 1 中所示即为乳酸菌 LD3 在自溶期间,图中 A、B 分别为细胞全阴性与全阳性对照。

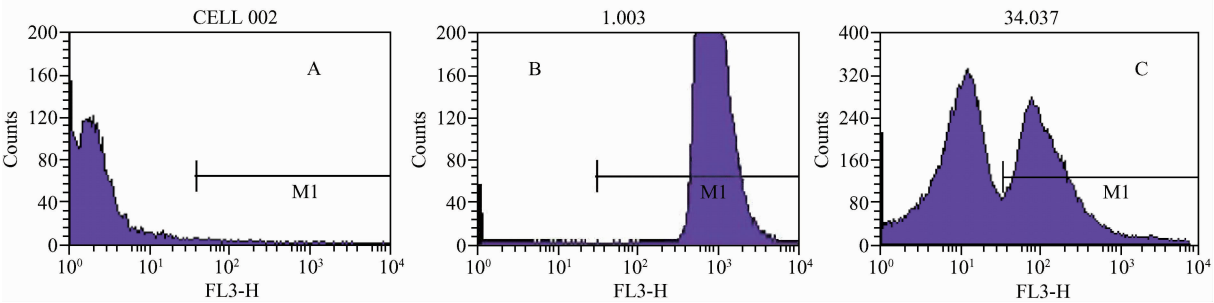


**图 1 菌株 LD3 的 PI-PBS 染色 FCM 直方图谱**

Fig. 1 Flow cytometry histograms of *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* LD3 cell suspensions stained with PI-PBS ( A: negative comparison of LD3 by FCM; B: positive comparison of LD3 by FCM; C: detection of LD3 by FCM).

图中横坐标 FL3-H 表示细胞荧光强度,纵坐标 Counts 为细胞频率。由图 1 中 A、B 可知,以 FL3-H 在 $10^1$ 处设门,未经 PI 染色的阴性对照中的染色阳性率为 1.72%,热致死后阳性对照中 PI 染色阳性率为 99.59%。其中阴性对照中的细胞染色阳性率略高是因为菌液中可能存有的菌体细胞残片及其他蛋

白、杂质等干扰所致,所以要求在每次试验时,均需设置阴性对照以扣除这些干扰因素。使用 CellQuest 软件对流式细胞仪读取数据进行联机分析,可以直接得到 PI 染色呈阳性的细胞数与细胞总数的比率,每个样本上机检测时间根据菌液浓度大小在 40 S – 100 S 之间。

### 2.2 FCM 方法的灵敏度与精密度

流式细胞仪理论上最低检出限为单位体积 1 个细胞,但由于样品在处理过程中,难免会造成菌体损失,使得样品中细胞数含量很低时,其检测值的可信程度降低。当菌悬液的细胞数降到 $10^3$ cells/mL 以下时,不仅仪器收集菌体细胞的时间过长导致效率低下,而且检测结果也发生了较大偏差。FACSCalibur 型流式细胞仪每秒钟最大的检测值为 10000 cells/s,理论上样品细胞浓度的检测上限为 $6\times10^7$ cells/mL。对于浓度太大的样品,需要将其逐级稀释并调整细胞数为 $10^7$ cells/mL 左右进行检测并换算。根据分析结果显示,乳酸菌菌悬液上机样本的细胞数在 $10^4$ cells/mL – $10^7$ cells/mL 范围时,检测结果比较稳定准确。FCM 方法精密度如表 1 所示,对样品进行重复试验($n=5$),所得 PI 阳性染色率数据的变异系数 CV 值均在 5% 以内,属合理范围,由此可知 FCM 方法检测乳酸菌的自溶度具有很好的精密度。

**表 1 FCM 法检测乳酸菌自溶精密度试验($n=5$)**

Table 1 The stability (RSD $n=5$) of FCM

| Item | *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* LD3 | | | | *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* SY15 | | | | *Streptococcus salivarius* *ssp* GS1 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *t*/h | 4 | 8 | 16 | 24 | 4 | 8 | 16 | 24 | 4 | 8 | 16 | 24 |
| Autolysis rate/% | 18.78 | 64.73 | 42.74 | 39.93 | 36.54 | 42.55 | 37.71 | 49.42 | 19 | 26.98 | 18.88 | 16.32 |
| CV/% | 1.54 | 2.54 | 1.32 | 0.62 | 2.25 | 1.73 | 1.01 | 1.56 | 1.78 | 3.23 | 2.32 | 1.57 |

对于乳酸菌自溶机理目前虽尚未有明确认识,但是多数研究认为乳酸菌的自溶与其生长繁殖过程息息相关[12-13],在一项对嗜酸乳杆菌自溶酶 Acma 的研究中发现[14],缺乏 Acma 基因的菌体细胞会形成长链并生长缓慢甚至停滞,说明自溶酶可通过影响细胞膜的溶解从而影响整个细胞的分离过程。在本研究中发现,在 37℃ 缓冲溶液保温时,乳酸菌的自溶呈现先升后降的状态:在相对于培养状态的迟滞期时菌体自溶率较低,当进入指数生长期时自溶率最高,此后随着菌体生长进入平稳期,自溶率又逐渐下降。这一结果与 Riepe[15] 等学者的自溶高峰发生于菌体细胞分裂时期的观点相一致。

### 2.3 FCM 方法检测乳酸菌自溶度的准确性验证

对 10 份菌悬液分别使用 FCM 方法、平板计数法和比浊法进行自溶度检验,检测结果如图 2 示,乳酸菌菌悬液上机样本的细胞数在 $10^4$ cells/mL – $10^7$ cells/mL 范围内时,FCM 法所得结果与平板计数法和比浊法的检测结果均呈正相关,相关性系数为 $p<0.01$ $r=0.9805$ 和 $p<0.01$ $r=0.9249$,结果均为显著。

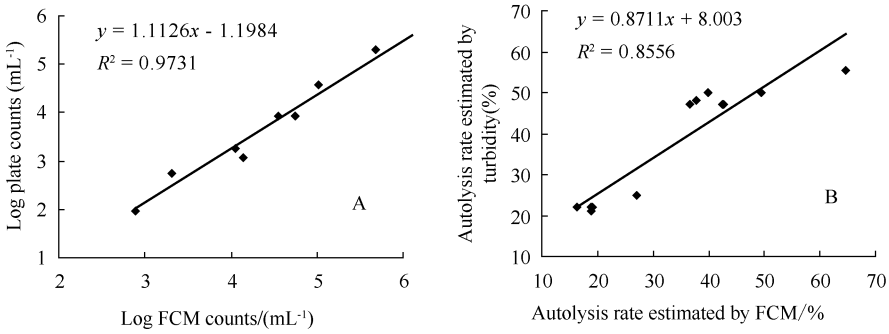


**图 2 FCM 法与其他自溶度检测方法的相关性**

Fig. 2 Correlation between other methods and FCM by PI staining (A) Correlation between plate counts and FCM counts obtained of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* in PBS buffer. (B) Correlation between FCM assessment autolysis rate and turbidity assessment autolysis rate of *Streptococcus salivarius* ssp. in PBS buffer.

与传统方法相比,FCM 方法检测乳酸菌自溶度具有诸多优势。平板计数法耗时长(通常需要 24 – 72 h),数据离散程度高,变异系数 CV 值达到 10% – 25%。在本研究中发现,同时使用平板计数法和 FCM 方法检测相同菌液,平板计数法测得活菌数比 FCM 法测得的活菌数低,可见菌落生长过程中

易受许多外界因素影响,有时并不能准确地反映菌液中活菌数的比例关系。与之相比,FCM 方法取样和染色操作简便、耗时短,完成整个检测过程仅需 1 h左后即可获得准确可靠的数据,可以实时监测乳酸菌在生长过程的自溶度变化。同样的,使用分光光度法测量菌悬液的吸光值时,样液中菌体浓度太大或太小可造成吸光度过高或过低,若培养基含有颗粒或细胞碎片等杂质干扰时,其测量误差非常大。而流式细胞仪则是在封闭的环境中对单个细胞进行逐一检测,排除了很多干扰因素。由此可见,FCM 方法所得结果的精确度和直观程度远高于传统菌落计数法和菌液比浊法。

## 3 结论

流式细胞术(FCM)集流体喷射、激光、电子和计算机技术等于一体,是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,它可高速分析上万个细胞,并能同时从一个细胞中测得多种参数,与传统检测方法相比,具有简单、快速和敏感性高等优点,可进行活体细胞的多参数分析。在细胞浓度范围 $10^4$ cells/mL – $10^7$ cells/mL 内,采用 PI 染色的 FCM 方法能够将乳酸菌自溶和未自溶的细胞在 FCM 图谱上清楚地区分开来,并且能正确反映其比例关系,该方法快速、稳定、可靠,很好的满足了乳酸菌自溶度检测的需要。

## 参考文献


[1] Crow VL, Coolbear T, Gopal PK, Martleya FG, McKayb LL, Riepe H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, 1995, 5 (8): 855-875.

[2] Law, BA, Sharpe ME, Reiter B. The release of intracellular dipeptidase from starter *streptococci* during cheddar cheese ripening. *Journal of dairy science*, 1974, 41: 137-146.

[3] Masuda T, Hidaka A, Kondo N, Ura T, Itoh T. Intracellular enzyme activities and autolytic properties of *lactobacillus acidophilus*. and *lactobacillus gasseri*. *Food Science and Technology*, 2005, 11 (3): 328-331.

[4] El-Kholy W, El-Soda, Ezzat N, Shafei HE. Autolysis and intracellular enzyme release from cheese related dairy lactobacilli. *Le Lait*, 1998, 78: 439-452

[5] Wilkinson, MG, Guinee TP, Fox PF. Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 1994, 4: 141-160.

[6] Mccloskey TW, Oyaizu N, Coronesi M, pahwa S. Use of a flow cytometricassay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1994, 71(1): 14-18.

[7] Bunthof, CJ, Bloemen K, Breeuwer P, Rombouts FM, Tjakko A. Flow cytometric assessment of the viability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5):2326-2335.

[8] Bunthof, CJ, Tjakko A. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2934-2942.

[9] Yokoia K, Kawasakib K, Taketoc A, Kodaira K. Characterization of lytic enzyme activities of *Lactobacillus gasseri*. with special reference to autolysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 96 (3): 273-279.

[10] Girbe B, Gerard V, Jan K. Autolysis of *Lactococcus lactis*. is influenced by proteolysis. *Journal of bacteriology*, 1998, 180 (22): 5947-5953.

[11] Prudêncio C, Filipe S, Corte-Real M. Flow cytometric assessment of cell structural and functional changes induced by acetic acid in the yeasts *ygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytometry*, 1998, 31: 307-313.

[12] Gasson JM. Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages. *Anonie van Lesswenhoek*, 1996, 70: 147-159.

[13] Pillidge CJ, Rallabhandi PSVS, Tong Xing-zhang, Gopal PK, Farley PC, Sullivan PA. Atoulysis of *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 2002 12: 133-140.

[14] Buist G, Kok J, Leenhouts KJ, Dabrowska M, Venema G, Haandrikman AJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*, 1995 6(177): 1554-1563.

[15] Riepe HR, Pillidge CJ, GoPal PK, Mekay LL. Characterization of the highly autolytic*Lactococcus lactis subsp.* strains CO and 2250. *Applied and environment microbiology*, 1997 10(60): 3757-3767.

# Assessment of autolysis of lactic acid bacteria by Flow Cytometry

Jie Sun, Jiaping Lv*, Lu Liu, Shuwen Zhang

(Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Lab of Agricultural Product Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

**Abstract**: [**Objective**] The autolysis rate of lactic acid bacteria is crucial for their applications as dairy starters and as probiotics. To establish a rapid and sensitive method to detect autolysis rate of lactic acid bacteria, Flow Cytometry Method (FCM) can be employed. [**Methods**] Cell suspensions were dyed by PI – PBS (20 mmol/L) in 4℃ dark environment for 30 min. A 630 nm long pass filter was used to collect the red fluorescence (FL3 488 nm), and 1 × 105 cells were collected from each sample. Data were analyzed by CellQuest online analysis system. Test time ranged from 40 to 100 s, depending on the concentrations of cell suspensions. FCM enumerations were accurate to 104 cells/mL. [**Results**] Correlation test did not show difference between FCM test and other methods for the determination of autolysis rate of lactic acid bacteria. [**Conclusion**] FCM is a good analytical method that allows rapid and sensitive measuring the viability of lactic acid bacteria.

**Keywords**: Flow cytometry; Lactic acid bacteria; Autolysis

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Eleventh Five-Year Support Program of the Ministry of Science and Technology of the PRC(2006BAD04A07,2006BAD04A10)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62815542; E-mail: lvjp586@vip.sina.com

Received: 23 December 2009/Revised: 2 March 2010

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对"作者或单位的署名"进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(http://journals.im.ac.cn/actamicrocn),在首页内、"**常见问题**"中有显示,点开左侧的"**署名**",其中有详细的说明和办理方法。

(1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。

(2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。

(3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。