

口腔枯草芽孢杆菌代谢产物的抑菌活性研究

游祥磊¹ 王少果¹ 曾飒¹ 车春晓¹ 周建业² 王佳佳² 李志强² 何祥一^{1*}

(1. 兰州大学 口腔医学院修复科 甘肃 兰州 730000; 2. 西北民族大学 口腔医学院 甘肃 兰州 730030)

[摘要] **目的:**从口腔中分离枯草芽孢杆菌并验证其代谢产物对主要致龋菌的抑制作用。**方法:**搔刮法提取牙菌斑,平板稀释法筛选出细菌后,进行形态学观察及 16S rDNA 基因序列的比对。琼脂平板打孔法检测其代谢产物对变形链球菌、粘性放线菌及嗜酸乳杆菌的抑菌活性。**结果:**从牙菌斑中分离出 3 株细菌,通过形态学及 16S rDNA 基因序列检测确定为枯草芽孢杆菌;其代谢产物对变形链球菌、粘性放线菌、嗜酸乳杆菌均具有抑制作用,其中对粘性放线菌抑制作用最强。**结论:**牙菌斑中可以分离出枯草芽孢杆菌,并且其代谢产物对主要致龋菌具有抑制作用,枯草芽孢杆菌有望作为益生菌在龋病防治中发挥重要作用。

[关键词] 枯草芽孢杆菌 代谢产物 抑菌活性 致龋菌

[中图分类号] R780.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2015)10—0991—04

In Vitro Inhibitive Activity of Metabolites of Bacillus Subtilis Isolated from Oral Cavity. YOU Xiang-lei¹, WANG Shao-guo¹, ZENG Sa¹, CHE Chun-xiao¹, ZHOU Jian-ye², Wang Jia-jia², LI Zhi-qiang², HE Xiang-yi^{1*}. 1. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. School of Stomatology, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China

[Abstract] **Objective:** To isolate Bacillus subtilis and verify whether its metabolic product could inhibit the major cariogenic bacteria. **Methods:** The dental plaque was achieved by scratching method, and Bacillus subtilis were then isolated using plate culture method, which were identified through morphology and 16S rDNA gene sequence analysis. The inhibitory activity of the metabolic products against the major cariogenic bacteria was observed by use of the agar well diffusion method. **Results:** Three strains of bacteria were isolated from the dental plaque, which were identified as Bacillus subtilis through morphology and 16S rDNA gene sequence analysis. The metabolic products showed significant inhibitory activity to Streptococcus mutans, Viscous actinomycetes and Lactobacillus acidophilus, especially Viscous actinomycetes. **Conclusion:** Bacillus subtilis can be isolated from the dental plaque, and its metabolic products can inhibit the major cariogenic bacteria. Bacillus subtilis is expected to play an important role in prevention and control of caries disease as an inhibitive bacterium.

[Key words] Bacillus subtilis Metabolic product Inhibitive activity Cariogenic bacteria

枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)是一种革兰阳性兼性厌氧菌,主要分布在自然环境和动物胃肠道^[1],在食品、工业、医疗等多个领域被广泛开发利用^[2,3]。在医疗领域,枯草芽孢杆菌具有很重要的医学研究和应用价值。研究表明,枯草芽孢杆菌在肠道内不仅可以消耗氧气促进其他优势厌氧菌繁殖以维持肠道内的微生态平衡,其自身还可分泌纤维

素酶提高食物消化率。因此,其常作为微生态制剂用于调节胃肠道菌群平衡,以治疗腹泻及慢性胃炎^[4]。枯草芽孢杆菌还可以促进肠道淋巴组织的发育,直接或间接激活机体产生免疫应答,提高机体免疫力,甚至在肿瘤预防上也具有一定的效果^[5,6]。齐涵等^[7]将枯草芽孢杆菌活菌制剂用于治疗烧伤创面取得了良好的抗感染作用。另外,枯草芽孢杆菌还被用作破伤风等口服疫苗的载体^[8]。

枯草芽孢杆菌还存在于人类口腔中。Naidorf 等(1974 年)^[9]与 Sunde 等(2000 年)^[10]进行牙髓病相关微生物研究时,都在口腔中检测出枯草芽孢杆菌,由此引起口腔医学界学者们的关注。Yamane 等(2009 年)^[11]不仅应用培养法在口腔分离出枯草芽孢杆菌,并对其进行了形态学及生理生化特征的

基金项目 国家自然科学基金地区项目(编号:31160124/C0309)
甘肃省科技计划项目(编号:1204FKCA168、1308RJZA248)

甘肃省科技支撑项目(编号:144WCGA167)

作者简介 游祥磊(1988~),男,硕士在读,主要从事口腔修复学和口腔微生物学研究。

* 通讯作者 何祥一, E-mail: hexy@lzu.edu.cn

鉴定。总体来看,枯草芽孢杆菌在口腔中的分布数量较少,甚至在利用现代高通量测序技术对口腔微生物多样性的检测中,应用主成分分析法对数据进行处理时,枯草芽孢杆菌在数量上也会被忽略不计。由于众多因素的影响,口腔枯草芽孢杆菌的检出率较低,其在口腔生态环境中的作用鲜有报道。

文献表明,枯草芽孢杆菌可以通过竞争粘附位点、营养,或分泌抑菌物质等多种途径抑制微生物的生长。陈天游等^[12]通过将枯草芽孢杆菌与6种肠道致病菌体外混培养表明,枯草芽孢杆菌对志贺菌、大肠杆菌有很好的拮抗作用。程鹏飞等^[13]证实枯草芽孢杆菌次级代谢产物有较强的抑菌活性。枯草芽孢杆菌可以产生细菌素、脂肽等多种抑菌性物质,主要通过其代谢产物的抑菌性来实现对微生物生长的抑制作用。因此,本研究的目的是从口腔中分离枯草芽孢杆菌并验证其代谢产物对变形链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*, *L. acidophilus*)、粘性放线菌(*Viscous actinomycetes*, *V. actinomycetes*)等主要致龋菌具有抑制作用,进而对研究枯草芽孢杆菌在口腔生态环境中的生理特性及作用打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 样本的采集 经兰州大学伦理委员会审核合格,随机选取兰州大学在校硕士研究生,男、女各10人,要求全身健康,无龋齿,与志愿者签订知情同意书。晨起,未刷牙时用搔刮法提取指数牙(11、16、17、26、27、31、36、37、46、47)牙齿菌斑。置入盛有无菌PBS缓冲液的离心管中,37℃下,在摇床上以220 r/min混匀,备用。

1.2 细菌的筛选 采用稀释涂平板法对枯草芽孢杆菌进行分离。培养基选用枯草芽孢杆菌选择性培养基 T2 培养基:葡萄糖 10 g、大豆蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、酵母提取物 2 g,加入 1 L 无菌去离子水。固体培养基每升加入琼脂 20 g。pH 值调至 7.0。培养条件为:37℃孵箱培养 16 h。

1.3 细菌的鉴定 采用形态学和 16SrDNA 技术相结合的方法进行细菌鉴定。观察细菌菌落形态及×400 光镜下采用细菌基因组观察细菌形态,采用革兰氏染色法在光学显微镜下观察其菌体形态,并测量菌体大小。依据《伯杰氏细菌鉴定手册》,菌株在形态特征上与枯草芽孢杆菌相似,然后采用细菌基因组试剂盒(OMEGA, D3350-01)提取初步筛选细菌的基因组 DNA。以 16SrDNA 基因通用引

物 8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') PCR 扩增各菌株 DNA。PCR 反应体系和条件按 Wen 等^[14]方法进行。阳性 PCR 扩增产物委托北京六合华大基因科技有限公司完成测序。通过 NCBI 中的 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与 GenBank 中的核酸序列数据进行比对,最终进行种属分析。

1.4 细菌生长曲线的测定 应用比浊法进行细菌生长曲线的测定。分别测定 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 h 的 A_{600} 值,每组设置 3 个重复,取平均值绘制细菌生长曲线。

1.5 细菌代谢产物抑菌活性的检测 代谢产物的制备及抑菌活性的检测参照 Kavitha 等^[15]的法进行,略有改动。指示菌为变形链球菌 ATCC25175,粘性放线菌 ATCC15987、嗜酸乳杆菌 ATCC4356 标准菌株(西北民族大学国家民委口腔微生物重点实验室提供)。在 100 mL BHI 培养基灭菌后冷却至 45℃时混入 CFU 为 1×10^6 变形链球菌菌液 10 μ L,混匀,倒入培养皿中至凝固后用打孔器均匀打孔。选取代谢物最丰富时的菌液 50 mL,3000 r/min 离心 3 min。取其上清液经 0.22 μ m 滤器过滤后旋转蒸发,调 pH 值至 7.0 后用无菌纯水定容至 5 mL,实验组每孔分别加入相应代谢产物 200 μ L。空白培养基作为阴性对照。平板置于 37℃孵箱培养 24 h。按照十字交叉法用直尺测量牛津杯周围的抑菌圈直径,每个处理设 3 个重复,取平均值,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS17.0 软件进行分析,分别对数据数据进行单因素方差分析,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细菌分离及革兰氏染色 细菌筛选培养结果见图 1,培养皿中有 3 个菌落,分离出 3 株细菌(Bs01、Bs02、Bs03)。形态学观察菌落形状不规则,微黄色,表面有皱褶,有菌丝向培养基深部生长。革兰氏染色(图 2),为阳性,短杆状,有鞭毛。显微镜下,在形态特征上 3 株菌株都确定为枯草芽孢杆菌。

2.2 16S rDNA 检测 将 Bs01、Bs02、Bs03 三株菌的 16SrDNA 序列与 GenBank 中的 16SrDNA 序列进行同源比对,结果显示菌株 Bs01、Bs02、Bs03 的 16SrDNA 序列与枯草芽孢杆菌 16SrDNA 的序列的相似度分别为 99%、99%和 97%,确定三株菌均为枯草芽孢杆菌。

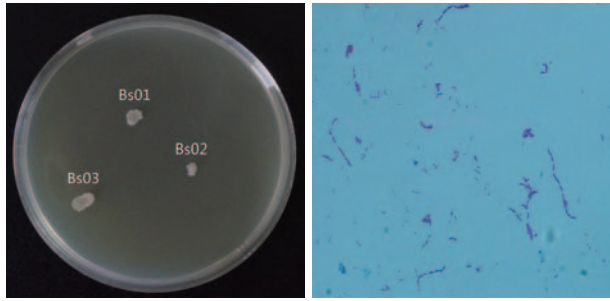


图 1 枯草芽孢杆菌的筛选 **图 2** ×400 光镜下的枯草芽孢杆菌
Fig. 1 The isolation of *Bacillus subtilis* **Fig. 2** *Bacillus subtilis* under ×-400 microscope

2.3 生长曲线 菌株 Bs01、Bs02 及 Bs03 的生长

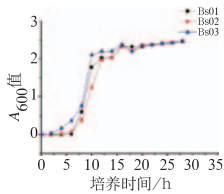


图 3 枯草芽孢杆菌的生长曲线

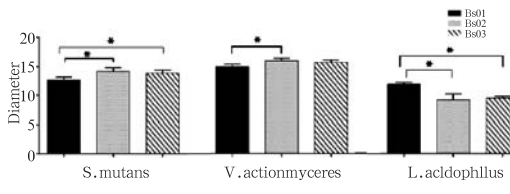


图 5 Bs01、Bs02 及 Bs03 三菌株代谢产物的抑菌性强弱

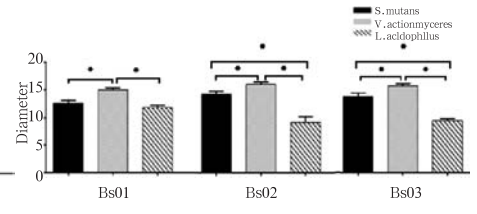


图 6 枯草芽孢杆菌代谢产物对 3 种主要致病菌的抑制作用的强弱
Fig. 6 The inhibitive activity of *Bacillus subtilis* metabolites against the major cariogenic bacteria

Fig. 3 The growth curve of *Bacillus subtilis*

Fig. 5 The inhibitive activity of metabolites of Bs01, Bs02 and Bs03

Fig. 6 The inhibitive activity of *Bacillus subtilis* metabolites against the major cariogenic bacteria

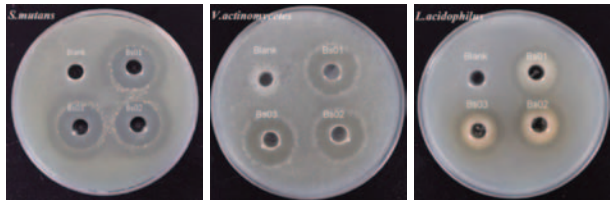


图 4 枯草芽孢杆菌代谢产物对主要致龋菌的抑制作用

Fig. 4 The inhibition of *Bacillus subtilis* metabolites against the major cariogenic bacteria

2.4 细菌代谢物对主要致龋菌的抑制作用

细菌代谢物对主要致龋菌的抑制作用见图 4, Blank 为阴性对照组, 周围细菌没有明显变化; 样本 Bs01、Bs02 及 Bs03 周围均有透亮的抑菌环, 说明三株菌的代谢产物均对变形链球菌、嗜酸乳杆菌、粘性放线菌具有抑制作用。Bs01、Bs02 及 Bs03 三菌株代谢产物抑菌性的强弱, 见图 5。1) 变形链球菌组: Bs02 > Bs01 ($P < 0.05$), Bs03 > Bs01 ($P < 0.05$); 2) 粘性放线菌组: Bs02 > Bs01 ($P < 0.05$); 3) 嗜酸乳杆菌组: Bs01 > Bs02 ($P < 0.05$), Bs01 > Bs03 ($P < 0.05$)。枯草芽孢杆菌代谢产物对 3 种主要致病菌的抑菌性强弱, 见图 6。1) Bs01 组: 粘性放线菌 > 变形链球菌 ($P < 0.05$), 粘性放线菌 > 嗜酸乳杆菌 ($P < 0.05$); 2) Bs02 组: 粘性放线菌 > 变形链球菌 > 嗜酸

曲线分别见图 3, 菌株 Bs01 的生长曲线在 6~12 h 变陡显示进入对数生长期, 在 12 h 变平缓但依然增长较为迅速, 在 16 h 曲线基本平缓但仍有增长显示进入平台期; 菌株 Bs02 在 4~12 h 生长曲线较陡, 细菌处于对数生长期, 在 12~14 h 曲线平直, 细菌进入平台期, 在 14~16 h 曲线出现一个小的陡峰显示细菌在 16 h 有 1 个二次快速增长, 16 h 以后曲线平缓但一直上升显示细菌进入平台期; 菌株 Bs03 的生长曲线在 2~12 h 较陡显示细菌处于对数生长期, 12 h 以后曲线基本平缓显示进入平台期, 16 h 曲线有轻微上扬显示在 16 h 细菌有 1 个小的二次增长。

乳杆菌 ($P < 0.05$); 3) Bs03 组: 粘性放线菌 > 变形链球菌 > 嗜酸乳杆菌 ($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来, 抗生素的应用引发了一系列公共安全问 题, 微生态疗法已日渐成熟并成为解决这些问题的一种必然趋势^[16]。益生菌为“控制在一定数量时对宿主健康有益的活的微生物”(FAO/WHO 2001)在防治微生物因素引起的疾病中起着积极的作用^[16]。其中, 枯草芽孢杆菌可有效定殖在肠道黏膜的表面形成生物屏障以阻止致病菌的定殖, 并通过分泌抑菌物质杀死致病微生物或抑制其繁殖等方式来调节胃肠道微生物生态系统的平衡^[17,18]。由此, 其已作为效应菌株被用来胃肠道菌群失调引起的疾病, 并被认为是最佳作为益生菌的细菌^[3,19]。这提示枯草芽孢杆菌有望作为益生菌防止龋病, 研究其对主要致龋菌是否有抑制作用也就具有重要意义。

众所周知, 在口腔不同部位所检测到的微生物种类也有所差异。口腔微生物研究中样本主要来源于唾液和牙菌斑。其中, 口腔唾液具备一定的流动性, 其微生物丰度更优于口腔其他部位, 且唾液样本相对于口腔内其他样本更易获取, 这使得唾液成为

微生物多样性研究的主要采样源^[20]。但以往研究表明,牙釉质表面所形成的生物膜为口腔微生物最主要的粘附区且具备一定的稳定性,在牙齿表面微生物多样性的研究中更具代表性^[21]。因此,本研究选择牙菌斑作为取样部位。

本研究通过选择性培养基进行细菌分离,避免了口腔优势菌竞争性抑制枯草芽孢杆菌,提高了枯草芽孢杆菌的检出率。传统的细菌系统分类主要依据形态特征和生理生化特性,从形态学、生理生化反应特征以及免疫学特性等方面加以鉴定,敏感性低。16S rDNA 技术对微生物进行鉴定的步骤又较为繁琐。因此,本研究应用形态学方法与 16S rDNA 技术相结合的方法对细菌进行鉴定更为快速、准确。

生长曲线的检测结果显示,枯草芽孢杆菌基本在 6~12 h 处于对数增长期,这与前人的研究结果一致^[22]。由于细菌在 16 h 时处于二次快速增长期,细菌基数大,代谢物种类丰富且数量多,所以选取这一时期的代谢产物。并且本研究用于测定枯草芽孢杆菌生长曲线的培养基与后续取代谢产物的培养基一致,能反应细菌代谢的真实情况,数据更可靠。细菌代谢产物对变形链球菌具有与抑制作用也与 Nicholson 等^[2]的枯草芽孢杆菌可以分泌抑菌活性物质的结论相符。Bs01、Bs02 及 Bs03 三株菌代谢产物抑菌性的强弱差异不明显,这与三株菌的生长曲线相符,显示这三株菌代谢特征极其相近,为同一种属的不同菌株。而枯草芽孢杆菌代谢产物对三种主要致龋菌的抑制作用显示其对变形链球菌、粘性放线菌、嗜酸乳杆菌均具有显著的抑制作用,其中对粘性放线菌抑制作用最强。

口腔枯草芽孢杆菌代谢产物对三种主要致龋菌均具有显著的抑制作用,这表明枯草芽孢杆菌有可能会减少龋病的发生并抑制其发展,具有作为益生菌防治龋病的巨大潜能。但是,枯草芽孢杆菌在口腔微生态环境中能否对致龋菌起到抑制作用,还需体内研究的验证。枯草芽孢杆菌代谢产物中的何种物质对致龋菌具有抑制作用也尚不明确。尽管枯草芽孢杆菌作为益生菌已经在临床应用,但口腔微生态环境与肠道微生态系统不同,不同来源的芽孢杆菌在不同部位的黏附、繁殖等生理功能有所不同,在肠道中具有益生作用的细菌不一定在口腔中也具有益生作用^[23]。因此,枯草芽孢杆菌作为生物制剂应用到龋病的替代疗法中仍需进行各项临床前研究。

4 结论

牙菌斑中可以分离出枯草芽孢杆菌,其代谢产

物对变形链球菌具有抑制作用。枯草芽孢杆菌有望作为益生菌在防治龋病中发挥重要作用。

致谢:感谢在本实验中的每一位受调查者;感谢西北民族大学口腔医学国家民委重点实验室提供的帮助。

参考文献

- [1] Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, et al. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(2): 968-978
- [2] Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, et al. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006, 45(2): 144-158
- [3] Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(3): 548-572
- [4] Madsen K. The international scientific conference on probiotics and prebiotics [J]. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 2011, 5: 571-573
- [5] Rhee K J, Sethupathi P, Driks A, et al. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire [J]. *J Immunol*, 2004, 172(2): 1118-1124
- [6] Baek JO, Seo JW, Kwon O, et al. Production of human papillomavirus type 33 L1 major capsid protein and virus-like particles from *Bacillus subtilis* to develop a prophylactic vaccine against cervical cancer [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 50(3): 173-180
- [7] 齐涵,明月. 枯草芽孢杆菌 BS224 菌活菌制剂(白天鹅气雾剂)治疗烧伤创面的疗效[J]. *中国微生态学杂志*, 1998, 10(3): 174-176
- [8] Cutting SM, Hong HA, Baccigalupi L, et al. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics [J]. *Int Rev Immunol*, 2009, 28(6): 487-505
- [9] Naidorf I J. Clinical microbiology in endodontics [J]. *Dent Clin North Am*, 1974, 18(2): 329-344
- [10] Sunde PT, Olsen I, Lind PO, et al. Extraradicular infection: a methodological study [J]. *Dent Traumatol*, 2000, 16(2): 84-90
- [11] Yamane K, Ogawa K, Yoshida M, et al. Identification and characterization of clinically isolated biofilm-forming gram-positive rods from teeth associated with persistent apical periodontitis [J]. *J Endod*, 2009, 35(3): 347-352
- [12] 陈天游,董思国,田万红,等. 枯草芽孢杆菌活菌体外拮抗 6 种肠道致病菌的研究[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(5): 74-76
- [13] 程鹏飞,梁绍康,程国军,等. 一株南海柳珊瑚共附生细菌的鉴定及其产活性物质的培养条件优化[J]. *水产科学*, 2012, 30(11): 702-707