

双歧杆菌对牙周病原菌的体外抗生作用

涂家珍, 张和光, 陈 罕, 廖旭辉, 杨国平

(中山医科大学口腔医学院口腔内科, 广东 广州 510055)

摘要:【目的】探讨双歧杆菌 *DM 8504* 对牙周病原菌的体外抗生作用。【方法】分别取每升 3×10^8 CFU (集落形成单位, colony-forming units, CFU) 的牙龈卟啉单胞菌 (*Pg*), 具核梭杆菌 (*Fn*), 伴放线菌放线杆菌 (*Aa*), 中间普氏菌 (*Pi*) 菌液 20 μ L 与每升 3×10^{10} CFU 的 *DM 8504* 菌液 20 μ L 混合培养, 每株菌做 16 支试管, 以各菌的单独培养作对照, 厌氧培养 36 h, 平板菌落计数法定量测 *DM 8504* 的抑菌作用, 计算抑制率。【结果】*DM 8504* 对 *Pg* 1312、*Pg* 33277、*Pi* 25261、*Pi* 25611、*Aa* 29523、*Aa* Y4、*Fn* 10953 抑制率分别达到 55.42%、57.21%、48.21%、46.69%、43.00%、39.04%、49.36%。双歧杆菌本身所受抑制作用则较弱, 与 *Pg* 33277 混合培养的抑制率为 21.02%。单因素方差分析表明抑制作用有非常显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。【结论】双歧杆菌 *DM 8504* 对牙周致病菌 *Pg*、*Aa*、*Fn*、*Pi* 均有抑制作用。

关键词: 双歧杆菌; 牙周病/微生物学; 抗生作用; 集落计数; 微生物学

中图分类号: R781.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04-0274-03

The Antibiosis of *Bifidobacterium* on Periodontal Pathogens

TU Jia-zhen, ZHANG He-guang, CHEN Han, LIAO Xu-hui, YANG Guo-ping

(Department of Oral Medicine, College of Stomatology, Sun Yat-sen University
of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

Abstract:【Objective】To investigate the antibiosis of *Bifidobacterium DM 8504* on periodontal pathogens.【Methods】20 μ L of 3×10^8 CFU/L (colony-forming units, CFU) *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Prevotella intermedium* (*Pi*) and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aa*) were mixed with 20 μ L of 3×10^{10} CFU/L *DM 8504* in 5 mL BHI broth test tubes respectively. Test tubes ($n = 16$ for each bacterial strain) were then incubated in anaerobic cabinet for 36 h. Pure culture of each bacterial strain was used as control groups. After incubation, bacterial colonies on plates were counted and inhibitory rate of *DM 8504* on periodontal pathogens was calculated.【Results】The inhibitory rate of *DM 8504* on *Pg* 1312, *Pg* 33277, *Pi* 25261, *Pi* 25611, *Aa* 29523, *Aa* Y4 and *Fn* 10953 were 55.42%, 57.21%, 48.21%, 46.69%, 43.00%, 39.04% and 49.36% respectively. *DM 8504* was slightly inhibited in co-culture. The inhibitory rate of *Pg* 33277 on *DM 8504* was 21.02%. Statistical analysis showed that difference in viable bacterial enumeration of each strain between pure culture and co-culture was highly significant ($P < 0.01$).【Conclusion】*Bifidobacterium DM 8504* has inhibitory effect on periodontal pathogens *Pg*, *Fn*, *Pi* and *Aa*.

Key words: *Bifidobacterium*; periodontal diseases/microbiology; antibiosis; colony count, microbial

对致病菌产生拮抗作用是双歧杆菌构成生物屏障作用的重要因素, 许多研究表明双歧杆菌能抑制沙门氏菌、李斯特菌、弯曲菌、志贺菌和霍乱弧菌等多种革兰氏阳性和阴性菌^[1~3]。目前双歧杆菌

产生生物拮抗作用的研究主要集中在抑制肠道致病菌方面^[1~3], 国内外尚未见双歧杆菌抑制牙周致病菌的文献报道。本研究设计了双歧杆菌体外抑菌实验, 旨在探讨双歧杆菌对牙周病原菌的体外抗

收稿日期: 1999-12-29

基金项目: 中山医科大学科研启动基金

作者简介: 涂家珍(1967-), 男, 福建长汀人, 硕士, 讲师, 主攻牙周病的防治。

生作用,从而为双歧杆菌应用于牙周病的生态防治提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 菌 种

青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) DM 8504; 活菌制剂丽珠肠乐生产菌种; 牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Pg*); ATCC (American Typical Culture Center, 美国标准培养物保存中心) 1312 (上海口腔医学研究所), ATCC 33277 (本实验室保存株); 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *Fn*); ATCC 10953 (上海口腔医学研究所); 伴放线菌放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Aa*); FDC (Forsyth Dental Center; Forsyth 牙科中心) Y4 (华西医科大学口腔医学院), ATCC 29523 (本实验室保存株); 中间普氏菌 (*Prevotella intermedia*, *Pi*); ATCC 25261 (华西医科大学口腔医学院), ATCC 25611 (本实验室保存株)。

1.2 培养基

牛心脑浸液培养基 (brain heart infusion, BHI) 由美国 Beckton Dickinson 公司生产。配制时每 100 mL 添加西红柿汁 20 mL 及氯化血红素、维生素 K₁ 贮存液 1 mL。双歧杆菌选择性培养基 (bifidobacterial selective medium agar, BSA), 自配。

1.3 仪器设备

YQX 厌氧培养箱 (上海跃进医疗器械厂), SW-CJ-IF 超净工作台 (苏州苏净集团安泰空气技术有限公司), QY 系列金花牌取液器 (北京青云航空仪表公司)。

1.4 混合培养和定量分析

收集 BHI 平板上的各实验菌, 将双歧杆菌菌液调至 3×10^{10} CFU/L (集落形成单位, colony-forming units, CFU), 其它各实验菌菌液调至 3×10^8 CFU/L, 吸取各实验菌液 20 μ L 接种至 5 mL BHI 液体培养基的试管中, 每株菌接种 16 支试管, 每管中再分别接种 20 μ L 双歧杆菌液, 以各实验菌液和双歧杆菌液 20 μ L 接种于等量液体培养基中单独培养作对照, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 (体积比: 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) 36 h 后取出, 经 10 倍系列稀释到 10^{-8} , 吸取各稀释菌液 50 μ L, 用三角形玻璃推棒涂布平板, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h, 计实验菌菌

落数, 涂布 BSA 平板厌氧培养 48 h, 计双歧杆菌菌落数 (计数范围: 每板 30~400 个)。计算双歧杆菌抑菌率为:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{单独培养菌落数} - \text{混合培养菌落数}}{\text{单独培养菌落数}} \times 100\%$$

1.5 统计分析

本结果以 SPSS for windows 9.0 分析数据, 采用方差分析 (ANOVA) 法, α 值定为双侧 0.05。

2 结 果

DM 8504 对 *Pg* 1312、*Pg* 33277、*Pi* 25261、*Pi* 25611、*Aa* 29523、*Aa* Y4、*Fn* 10953 都有抑制作用, 抑制率分别达到 55.42%、57.21%、48.21%、46.69%、43.00%、39.04%、49.36%, 而 DM 8504 本身受抑制作用较弱, 与 *Pg* 33277 混合培养受抑率为 21.02% (表 1)。将原始数据换算成活菌数 (CFU/L): 活菌数 = 菌落数 \times 稀释倍数 $\times 20 \times 1000$, 再将其行对数变换, 使各组方差齐, 单因素方差分析结果表明: 单独培养的各实验菌活菌数均多于混合培养数 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 1 DM 8504 对实验菌的抑菌率

Table 1 The inhibitory rate of DM 8504 on experimental bacteria ($\bar{x} \pm s$, CFU/plate)

Bacterial strain	n	Bacterial colonies ¹⁾		Percent inhibition (%)
		Pure culture	Co-culture	
<i>Pg</i> 1312	16	332 \pm 5	148 \pm 3	55.42
<i>Pg</i> 33277	16	243 \pm 7	104 \pm 2	57.21
<i>Pi</i> 25261	16	251 \pm 5	130 \pm 3	48.21
<i>Pi</i> 25611	16	242 \pm 5	129 \pm 4	46.69
<i>Aa</i> 29523	16	307 \pm 9	175 \pm 4	43.00
<i>Aa</i> Y4	16	333 \pm 7	203 \pm 7	39.04
<i>Fn</i> 10953	16	156 \pm 4	79 \pm 3	49.36
DM 8504 ²⁾	16	158 \pm 4	125 \pm 4	21.02

1) Data were selected when it was diluted to 10^7 ; 2) Co-culture with *Pg* 33277

3 讨 论

3.1 双歧杆菌用于牙周病生态防治的设想

牙周细菌的相互拮抗作用, 对于牙周细菌组成和比例起着重要作用, 直接影响牙周组织的健康及病变的发生和发展。顺应牙周微生态系规律, 建立生理性的拮抗菌丛, 恢复、维持牙周微生态系的平

表2 单独培养与混合培养的活菌数的比较

Table 2 Comparison of viable bacterial number between pure-culture and co-culture ($\bar{x} \pm s$ $n = 16$)

Bacterial Strain	lg(bacterial number)	
	Pure-culture	Co-culture
<i>Pg</i> 1312	13.824 ± 0.009	13.474 ± 0.022
<i>Pg</i> 33277	13.690 ± 0.010	13.320 ± 0.014
<i>Pi</i> 25261	13.703 ± 0.003	13.412 ± 0.003
<i>Pi</i> 25611	13.684 ± 0.014	13.411 ± 0.022
<i>Aa</i> 29523	13.794 ± 0.022	13.542 ± 0.008
<i>Aa</i> Y4	13.825 ± 0.018	13.495 ± 0.016
<i>Fn</i> 10953	13.491 ± 0.016	13.200 ± 0.009
<i>DM</i> 8504	13.501 ± 0.009	13.411 ± 0.010

Viable bacterial number in pure culture is more than that in co-culture ($P < 0.01$)

衡,是牙周病生态防治的新构思。双歧杆菌是人体最重要的益生菌,具有拮抗多种致病菌^[1-3]、激活机体免疫机能、产生维生素、抗肿瘤、清除氧自由基、降解内毒素及细菌产生的有害酶、防治创面感染、促进伤口愈合等广泛的生态效应^[2]。因此,若能在牙周微生态系内建立双歧杆菌的优势菌丛,可开辟一条安全有效、生态防治牙周病的新途径。

3.2 菌液浓度确定

双歧杆菌生长较慢。本研究通过预实验观察,双歧杆菌要经 18~24 h 才进入对数生长期,而其它几种实验菌 6~8 h 即进入对数生长期。因此,参照蒋寒青等^[3]报道双歧杆菌生物拮抗作用的菌液浓度比,将双歧杆菌菌液浓度调至 3×10^{10} CFU/L,其余实验菌菌液浓度调至 3×10^8 CFU/L,以显示双歧杆菌对牙周致病菌的生物拮抗作用。

3.3 双歧杆菌拮抗牙周致病菌的作用

对致病菌产生拮抗作用是双歧杆菌构成生物屏障作用的重要因素,双歧杆菌是否具有拮抗牙周致病菌的作用,是能否成为牙周病菌群调整疗法效应菌的关键指标之一。本结果表明双歧杆菌有抑制牙周病原菌 *Pg*、*Aa*、*Pi*、*Fn* 的作用,提示若能在牙周微生态系内建立双歧杆菌的优势菌丛,将有利于建立和维持牙周微生态系的生理性平衡。

3.4 双歧杆菌抗菌作用的机理分析

体外实验表明^[4,5], *Pg*、*Aa*、*Pi*、*Fn* 的最适生长 pH 值均在中性至弱碱性范围。中间普氏菌仅能在 6.0~7.3 的 pH 范围中生长;牙龈卟啉单胞菌的最适生长 pH 值为 7.5~8.0,在 pH 值小于 6.5 或大于 8.7 时,生长极差,不能保持应有的生物活性;具核梭杆菌、中间型普氏菌的生长随 pH 值的下降受抑制甚至停滞^[6]。Rogers 等^[7]报道, *Fn* 生长所需的氨基肽酶,其最适 pH 值为 7.5~8.0,当 pH 值呈酸性时,这些酶活性明显下降, *Fn* 的生长受抑制。在混合培养时,随着双歧杆菌的生长,培养基中的乳酸和乙酸增多, pH 值下降到不适宜致病菌的生长,双歧杆菌产生的广谱抗菌物质也增多^[1-3],从而抑制了牙周病原菌 *Pg*、*Aa*、*Pi*、*Fn* 的生长。国内外尚未见双歧杆菌抑制牙周致病菌的文献报道,其抑菌的确切机制,待进一步研究。

参考文献:

- [1] Gibson G R, Wang X. Regulatory effects of Bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria [J]. J Appl Bacteriol, 1994, 77(4): 412.
- [2] 陈昭斌,张朝武,康白.我国人源双歧杆菌生态效应的研究近况 [J].中国微生态学杂志,1997,9(5): 54.
- [3] 蒋寒青,卢行安,康白.对双歧杆菌 *DM* 9227 株的实验研究: I 双歧杆菌 *DM* 9227 株的试管内生物拮抗作用的研究 [J].中国微生态学杂志,1993,5(1): 26.
- [4] Takahashi N, Saito K, Schachtele C F, et al. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* [J]. Oral Microbiol Immunol, 1997, 12(6): 323.
- [5] Svensater G, Larsson U B, Greif E C, et al. Acid tolerance response and survival by oral bacteria [J]. Oral Microbiol Immunol, 1997, 12(5): 266.
- [6] 周村,章锦才.牙周微生态研究进展 [J].中国微生态学杂志,1998,10(4): 236.
- [7] Rogers A H, Gunadi A, Gully N J, et al. An aminopeptidase nutritionally important to *Fusobacterium nucleatum* [J]. Microbiology, 1998, 144(Pt 7): 1807.

(编辑 关淡庄)