

几株益生菌对鲤前肠黏液的体外黏附特性

曾东^{1,2}, 王益平^{1,3}, 倪学勤^{1,2}, 汪开毓^{4*}, 吴梦^{1,2}

(1. 四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心, 四川雅安 625014;

2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014;

3. 四川农业大学动物科技学院水产养殖系, 四川雅安 625014;

4. 四川农业大学动物医学院鱼病研究中心, 四川雅安 625014)

摘要:采用体外固定鲤前肠黏液,结合细菌同位素示踪的方法,对来源于鲤肠道的2株肠球菌和1株柠檬酸杆菌以及养殖水体的2株芽孢杆菌的细菌表面凝集素和黏液蛋白受体的化学组成、对病原菌附着鲤前肠黏液的影响等进行了研究。结果表明,5株菌经高碘酸钠和蛋白水解酶修饰后,高碘酸钠能极显著降低芽孢杆菌、肠球菌和柠檬酸杆菌的黏附率($P < 0.01$),而蛋白水解酶对多数菌株的影响不显著($P > 0.05$),推测细菌表面的凝集素主要为具糖蛋白质质的物质。黏液蛋白经蛋白水解酶处理后,部分菌株的附着数量显著降低($P < 0.05$),但经高碘酸钠处理后,5株菌的黏附率均显著上升($P < 0.05$),提示黏液蛋白上存在的5株细菌的特异性受体物质可能为蛋白质。益生菌通过排斥、竞争和取代作用能够显著降低部分病原菌的黏附率。取代作用对病原菌黏附的抑制效果最好,但具有菌株特异性。

关键词:鲤;黏附;黏液;益生菌

中图分类号: S 917

文献标识码: A

益生菌在水产养殖中的应用日益广泛,它们是能够进入动物肠道繁殖,并具有促进宿主健康作用的一类细菌^[1]。主要通过代谢产物、竞争化学物质或能源、竞争黏附位点和刺激机体免疫应答等方式防治水生动物疾病^[2-3]。但是对益生菌作用机理的研究还不够全面,严重制约了益生菌产品的开发和应用。随着动物微生物学研究的不断深入,益生菌的筛选标准日益完善。有研究表明,益生菌能否发挥功能,首先取决于它们能否在宿主肠道内定植^[4-6]。目前,益生菌对肠道上皮或黏液蛋白的黏附实验大都采用同位素示踪法,定量地研究细菌能否有效地定植到肠道黏膜^[7-8]。由于动物体内模型很难定量,同位素³H的检出率相对较低,所以本试验结合³²P同位素示踪进行体外黏附,定量分析5株益生菌对鲤前肠黏液的黏附特性,为鲤益生菌作用机理研究和产品开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株及培养条件 短小芽孢杆菌 C3 和枯草芽孢杆菌 Z2 分离于四川农业大学教学农场养殖塘底泥,肠球菌 L2、E2 和费氏柠檬酸杆菌 D2 分离于四川农业大学教学农场健康鲤肠道,大肠杆菌 CVCC2060 购自中国兽医药品监察所菌种保藏中心,大肠杆菌 ATCC25922 保存于四川农业大学动物微生态研究中心,嗜水气单胞菌 AH1 和 AH2 由四川农业大学水产病理实验室惠赠。芽孢杆菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌和柠檬酸杆菌用营养肉汤培养基于 37 ℃,150 r/min 振荡培养,肠球菌用 EC 培养基在 CO₂ 培养箱中培养。

主要仪器 FJ-2107P 液体闪烁计数仪(西安核仪器厂),96 孔细胞培养板(爱思进医用塑料有限公司),高速离心机(宁波新芝生物科技股份

收稿日期:2008-10-12 修回日期:2009-06-18

资助项目:教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0555);四川省教委应用基础项目(07ZA065);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0848)

通讯作者:汪开毓,E-mail: kywang@sicau.edu.cn

有限公司), HH-6 型数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司), HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), Sartorius Bs2000s 电子天平, 恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂)。

主要试剂 同位素标记物 γ -³²P-ATP(北京市福瑞生物工程公司), 缓冲液 PBS 和 HEPES(SIGMA 公司), 牛血清白蛋白、高碘酸钠溶液、胰蛋白酶溶液等其他常规药品为国内分析纯产品。

1.2 细菌的同位素标记

将同位素标记物 γ -³²P-ATP 按照 1 μ Ci/mL 添加到各种细菌培养液中, 细菌接种量为 1%, 在适宜条件下培养 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 用 PBS 洗菌体 2~3 次, 最后混悬于 PBS 中, 调整菌体浓度在 $(2.5 \sim 5) \times 10^8$ CFU/mL, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 鲤前肠黏液蛋白的制备

剖解体重 0.5 kg 左右的健康鲤 5 条, 迅速切取前肠组织并纵向剖开肠管, 按照 Ouwehand 等^[5]的方法, 用含 0.01% 明胶的 PBS 洗涤前肠内表面, 然后用塑料小铲轻轻刮取内表面组织得到黏液, 转移到 10 mmol/L pH 7.4 的 HH buffer 中, 13 000 r/min 离心 10 min, 去除细胞和组织碎片, 取上清液检测其蛋白浓度, 并调整浓度至 1.0 mg/mL 左右, 分装以后 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 细菌经修饰后黏附试验

细菌的修饰 取过夜培养的细菌各 1.5 mL, 分别加入 0.75 mL 的 0.5% (w/v) 高碘酸钠、800 μ g/mL 胰蛋白酶、800 μ g/mL 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 处理 1 h 后, 10 000 r/min 离心 15 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次(4 000 r/min, 10 min), 最后用 PBS 定容至 1.5 mL 备用。同时设不做处理的菌液对照。

黏液蛋白的固定 黏液蛋白解冻后, 加入 96 孔细胞培养板每孔 100 μ L, 放 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定 20 h。

修饰细菌的黏附 吸弃已固定黏液蛋白的 96 孔培养板中剩余黏液, 轻轻加入 100 μ L HH Buffer 洗涤 1 次, 然后每孔加入修饰的菌体 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 处理 1 h, 吸弃菌液, 用 HH Buffer 洗涤 1 次, 每孔加入含 1% SDS 0.1 mol/L NaOH 的裂解液 200 μ L, 60 $^{\circ}$ C 处理 1 h。将孔中的液体全部转

移到已加入 5 mL 蒸馏水的闪烁测定管中, 用 FJ-2107P 液体闪烁计数器检测放射活性。

1.5 黏液经修饰后黏附试验

在 96 孔培养板中每孔加入黏液蛋白 100 μ L, 然后分别加入 100 μ L 的 0.5% (w/v) 高碘酸钠、800 μ g/mL 胰蛋白酶、800 μ g/mL 蛋白酶 K、黏液蛋白各 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 处理 2.5 h 后, 放 4 $^{\circ}$ C 冰箱处理 20 h, 采用 1.4 的方法检测黏附细菌的放射活性。

1.6 益生菌对病原菌黏附作用的影响

益生菌对病原菌黏附的排斥作用 将过夜培养的未标记益生菌按每孔 100 μ L 加入已固定黏液蛋白的 96 孔板中, 室温处理 1 h, 吸弃多余菌液, 用 HH Buffer 洗涤 3 次, 除去未黏附的菌体, 每孔加入已标记的病原菌 100 μ L, 室温处理 1 h, 吸弃多余菌液, 用 HH Buffer 洗涤 3 次, 采用 1.4 的方法检测各样品的放射活性, 同时设不加益生菌处理的空白对照组, 计算病原菌的相对黏附率。计算公式为

$$\text{CPM}(\%) (\text{病原菌的相对黏附率}) = \frac{\text{CPMa}}{\text{CPMo}} \times 100$$

式中, CPMa 为排斥作用以后黏附的病原菌放射活性, CPMo 为空白对照组病原菌放射活性。

益生菌对病原菌黏附的竞争作用 将过夜培养的未标记益生菌每孔 100 μ L 和已标记的病原菌每孔 100 μ L 同时加入已固定黏液蛋白的 96 孔板中, 室温处理 1 h, 吸弃多余菌液, 用 HH Buffer 洗涤 3 次, 除去未黏附的菌体, 采用 1.4 的方法检测各样品的放射活性, 同时设 PBS 代替益生菌的空白对照组, 计算病原菌的相对黏附率。

益生菌对病原菌黏附的取代作用 添加已标记病原菌和未标记益生菌的顺序与“益生菌对病原菌黏附的排斥作用”相反, 其他操作同“益生菌对病原菌黏附的排斥作用”。

1.7 数据分析

采用 SPSS 11.5 对数据进行分析, 结果采用平均值 \pm 标准误差表示。

2 结果

2.1 修饰菌体对黏附的影响

分别用高碘酸钠、蛋白酶 K 和胰蛋白酶对 5 株益生菌进行处理, 用不处理的菌体作对照, 测定其黏附率的变化。经高碘酸钠处理, 除 L2 的黏

附率显著降低($P < 0.05$),其它菌株均极显著下降($P < 0.01$)。经胰蛋白酶处理,Z2、C3、L2 的黏附率变化不显著($P > 0.05$),但 E2 的黏附率极显著下降($P < 0.01$);D2 的黏附率极显著上升($P < 0.01$)。经过蛋白酶 K 处理,C3 和 D2 的黏附率变化不显著($P > 0.05$),Z2 的黏附率显著下降($P < 0.05$),L2 和 E2 的黏附率极显著下降($P <$

0.01)(表 1)。说明 5 株益生菌表面的主要凝结素的化学性质不同。Z2、C3、D2 细胞表面的凝结素主要表现为糖蛋白的性质,而 L2 和 E2 细胞表面的凝结素主要表现为蛋白质性质。尽管表面凝结素的性质相似,但是处理以后对黏附率的影响效果存在较大差异,推测这与凝结素的含量有一定的关系。

表 1 5 株益生菌经蛋白酶和高碘酸钠修饰后对固定化鲤黏液蛋白的相对黏附率

Tab.1 Effect of chemical and enzymatic treatment of 5 probiotic strains on the relative adhesion to the immobilized carp intestinal mucus

处理 treatment	Z2 <i>Bacillus subtilis</i>	C3 <i>Bacillus pumilus</i>	L2 <i>Enterococci spp.</i>	E2 <i>Enterococci spp.</i>	D2 <i>Citrobacter spp.</i>
对照组 control	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
高碘酸钠 metaperiodate	11.93 ± 1.00 ^b	51.51 ± 5.52 ^b	73.56 ± 2.22	70.88 ± 6.03 ^b	21.43 ± 1.86 ^b
胰蛋白酶 trypsin	114.30 ± 20.47	101.50 ± 7.94	90.74 ± 24.84	60.78 ± 11.89 ^b	116.60 ± 4.72 ^c
蛋白酶 K protease K	74.94 ± 0.80	91.18 ± 4.41	50.66 ± 13.04 ^b	50.67 ± 3.78 ^b	97.11 ± 9.27

注:表中列数值为细菌相对附着数量的平均值 ± 标准差;表中同一栏内具不同字母者差异极显著($P < 0.01$),下表同。

Notes: Significance level was $P < 0.01$ between values scripted with different letters. The same as below.

2.2 修饰黏液蛋白对黏附的影响

用高碘酸钠、蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理黏液蛋白,用未处理的黏液蛋白作对照,测定菌体黏附率的变化。黏液蛋白经过高碘酸钠处理,C3 和 E2 的黏附率显著上升($P < 0.05$),而 Z2、L2 和 D2 的黏附率极显著上升($P < 0.01$)。经蛋白酶 K

处理,L2 的黏附率极显著下降($P < 0.01$),而 D2 的黏附率显著上升($P < 0.05$),其他菌株的黏附率变化不显著($P > 0.05$)。经胰蛋白酶处理,C3 的黏附率显著下降($P < 0.05$),L2 黏附率极显著上升($P < 0.01$)(表 2)。结果表明,黏液蛋白上凝结素受体的主要性质有差异,但均为蛋白质成分。

表 2 黏液蛋白经蛋白酶和高碘酸钠修饰后 5 株益生菌的相对黏附率

Tab. 2 Effect of chemical and enzymatic pretreatment of carp intestinal mucus on the relative adhesion of 5 probiotic strains

处理 treatment	Z2 <i>Bacillus subtilis</i>	C3 <i>Bacillus pumilus</i>	L2 <i>Enterococci spp.</i>	E2 <i>Enterococci spp.</i>	D2 <i>Citrobacter spp.</i>
对照组 control	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
高碘酸钠 metaperiodate	118.80 ± 5.33 ^b	113.70 ± 9.6 ^b	112.40 ± 1.64 ^b	113.10 ± 4.7 ^b	181.20 ± 17.96 ^b
胰蛋白酶 trypsin	93.01 ± 7.84	82.85 ± 8.10 ^c	111.60 ± 3.83 ^b	87.50 ± 3.83	108.90 ± 5.81
蛋白酶 K protease K	106.20 ± 9.72	104.20 ± 4.48	87.59 ± 3.28 ^c	95.65 ± 12.28	123.10 ± 11.33 ^c

2.3 益生菌对病原菌黏附作用的影响

从图 1 可以看出,5 株益生菌先定植于黏液蛋白,对大多数病原菌的黏附具有排斥作用,但是影响效果不一致。5 株益生菌对大肠杆菌 ATCC25922 的黏附影响不显著($P > 0.05$),E2 极显著地降低了大肠杆菌 CVCC2060 的黏附率($P < 0.01$),D2 显著降低了 CVCC2060 的黏附率($P < 0.05$),C2 和 E2 显著升高嗜水气单胞菌 AH1 的黏附率($P < 0.05$),Z2 显著升高嗜水气单胞菌 AH2 的黏附率($P < 0.05$)。

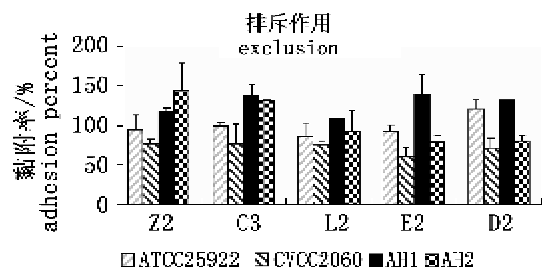


图 1 益生菌排斥作用后病原菌的相对黏附率

Fig. 1 The relative adhesion of pathogens by exclusion of probiotic strain

竞争作用的影响效果与排斥作用相似,各菌株对大肠杆菌 ATCC25922 的黏附影响不显著 ($P > 0.05$), D2 极显著降低了大肠杆菌 CVCC2060 的黏附率 ($P < 0.01$), Z2 显著降低了嗜水气单胞菌 AH1 的黏附率 ($P < 0.05$), E2 显著增加了嗜水气单胞菌 AH2 的黏附率 ($P < 0.05$) (图 2)。其中部分病原菌的黏附率出现了上升的现象,推测这可能是由于益生菌修饰了病原菌的表面结构,使其更能有效地黏附到黏液上面。

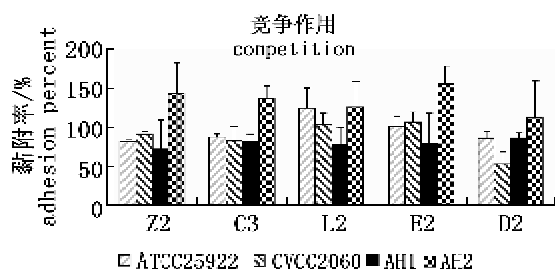


图 2 益生菌竞争作用后病原菌的相对黏附率
Fig. 2 The relative adhesion of pathogens by competition of probiotic strain

取代作用对病原菌的黏附影响最大,5 株益生菌都极显著地降低了大肠杆菌 ATCC25922 的黏附率 ($P < 0.01$), D2 极显著地降低了大肠杆菌 CVCC2060 的黏附率 ($P < 0.01$), Z2、C3 和 E2 显著地降低了 CVCC2060 的黏附率 ($P < 0.05$), Z2 和 C3 显著地降低了嗜水气单胞菌 AH1 的黏附率 ($P < 0.05$), C3 显著地降低了嗜水气单胞菌 AH2 的黏附率 ($P < 0.05$) (图 3)。

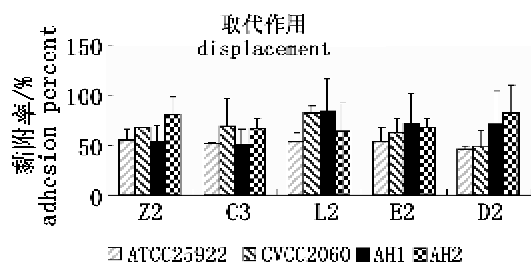


图 3 益生菌取代作用后病原菌的相对黏附率
Fig. 3 The relative adhesion of pathogens by displacement of probiotic strain

3 讨论

采用高碘酸钠和蛋白酶对细菌和黏液进行修

饰,由于它们分别能改变糖类物质和蛋白类物质的一些性质,因此可以分析细菌表面凝集素和黏液受体的主要性质。本试验 5 株菌的表面凝集素主要为糖类物质,菌株 E2 和 L2 的凝集素还表现出蛋白质性质,与孟庆翔等^[9]实验结果基本一致。关于鲤前肠黏液受体性质的研究结果表明,部分受体物质可能为蛋白质样物质,这与高巍等^[10]的研究结果相似,但是受体的主要性质还有待研究。

5 株益生菌和病原菌的相互作用结果与 Chabrillon 等^[11]报道一致,排斥和竞争作用的效果相似,能降低部分病原菌的黏附率,而取代作用显著降低病原菌的黏附率。在排斥作用中,由于芽孢杆菌自身黏附率较低,抑制病原菌作用不显著 ($P > 0.05$),而自身黏附率较高的鱼源肠球菌 L2 降低病原菌黏附效果最好,与 Niall 等^[13]报道一致。由于自身黏附率低,大肠杆菌 CVCC2060 的黏附作用被普遍抑制,推测与其非特异性黏附特性有关。结合体外拮抗试验(数据未列出),在排斥作用中,鱼源柠檬酸杆菌 D2 能显著降低 CVCC2060 的黏附率,但在体外拮抗试验中没有表现出拮抗作用,这可能是由于 D2 更多地发挥了位阻效应。竞争作用中,异源的芽孢杆菌 Z2 显著降低嗜水气单胞菌 AH1 的黏附率 ($P < 0.05$),而在排斥作用中影响不显著 ($P > 0.05$),但是在体外拮抗试验中,Z2 对 AH1 表现出很强的拮抗作用,这可能由于相互作用时间延长以后,Z2 更多地发挥了抑制或者改变病原菌表面结构的作用,与体外拮抗试验的效果一致,推测在黏附过程中,芽孢杆菌表现出更多的拮抗作用,而位点效应相对较少,是菌体本身和代谢产物抑制了病原菌的黏附。取代作用中,4 株病原菌的黏附均不同程度被抑制,与黏附时间延长有关, Lee 等^[15]研究表明,病原菌在体外黏附试验中随着黏附时间的增加,其黏附率不断下降,推测可能是由于病原菌非特异性黏附的稳定性不好,随着时间的增加不断脱落,与本试验取代作用的效果一致;此外,益生菌发挥拮抗作用和位点效应,也会降低病原菌黏附率。

在修饰黏液或益生菌与病原菌相互作用以后,部分细菌的黏附数量上升,这与 Chabrillon 等^[11]报道一致,Niall 等^[12]认为这种现象可能是由于修饰黏液的结构,为菌体的黏附提供更多更

合适的黏附位点。Pirt 等^[14]认为菌体相互作用,改变了菌体的大小和形状,也会影响细菌的黏附率。

5 株益生菌对黏液蛋白的黏附可能与细菌表面的糖蛋白样凝集素、黏液蛋白表面的蛋白质受体相关。通过排斥、竞争和取代 3 种作用方式均能降低部分病原菌的黏附率,其中取代作用的效果最好,并具有菌株特异性。

参考文献:

- [1] Gatesoupe F J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus* [J]. *Aquatic Living Resources*, 1997, 10: 239 - 246.
- [2] Laurent V, Geert R, Patrick S, *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 655 - 671.
- [3] Irianto A, Austin B. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26: 59 - 62.
- [4] Ouwehand A C, Kirjavainen M M, GroK N, *et al.* Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus [J]. *International Dairy Journal*, 1999, 9: 623 - 630.
- [5] Ouwehand A C, Pia N, Salminen S J. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria *in vitro* [J]. *Microbiology Letters*, 1999, 177: 35 - 38.
- [6] Bojana B, Matijacic, Mojca N, *et al.* Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on caco-2 cells and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107: 92 - 96.
- [7] Casini L. Interference of the humoral immune response against resident and nonresident intestinal commensal strains in weaning pigs [J]. *Livestock Science*, 2007, 108: 226 - 228.
- [8] Kirjavainen P V, Ouwehand A C, Erika I, *et al.* The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus [J]. *Microbiology Letters*, 1998, 167: 185 - 189.
- [9] 孟庆翔,高巍. 生长猪消化道大肠杆菌、乳杆菌和双歧杆菌凝集素活性及其化学性质[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(9): 1119 - 1124.
- [10] 高巍,孟庆翔. 乳杆菌、双歧杆菌和大肠杆菌附着固定化猪小肠黏液蛋白的研究 [J]. *中国农业科学*, 2004, 37(4): 609 - 613.
- [11] Chabrillon M, Rico R M, Balebona M C, *et al.* Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* [J]. *Journal of Fish Disease*, 2005, 28: 229 - 237.
- [12] Niall G V, Winston D L, Horst K. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus [J]. *Microbiology Letters*, 2004, 231: 145 - 152.
- [13] Lee Y K, Puong K Y. Displacement of bacterial pathogens from mucus and caco-2 cell surface by lactobacilli [J]. *J Med Microbiol*, 2003, 52: 925 - 930.
- [14] Pirt S J. Principles of microbe and cell cultivation [M]. Oxford: Blackwell, Scientific Publications, 1985.

The adhesion characteristics of 5 probiotic strains to the carp foregut mucus *in vitro*

ZENG Dong¹, WANG Yi-ping^{1,3}, NI Xue-qin^{1,2}, WANG Kai-yu^{4*}, WU Meng^{1,2}

(1. Animal Microecology Research Center in Veterinary College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, China;

3. Aquaculture Department in College of Animal Science and Technology,
Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

4. The Fish Disease Research Center of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Using immobilized mucosal model *in vitro*, combined with the isotope tracing method, the adhesion characteristics of *Enterococci*, *Citrobacter* isolated from carp intestines and *Bacillus* isolated from water to the carp foregut mucus were investigated. Results showed that after the modification with proteolytic enzymes or sodium metaperiodate, the relative adhesion percentages of all five bacteria were declined extremely significantly after they were treated with sodium metaperiodate ($P < 0.01$), but it was affected less by the proteolytic enzymes treatment ($P > 0.05$), indicating that main lectins existing on the cell surface of the five bacteria are glycoprotein compounds. After the modification with proteolytic enzymes or sodium metaperiodate of mucus, the relative adhesion percentages of part of five bacteria were declined significantly after the mucus was treated with proteolytic enzymes ($P < 0.05$), but it was affected significantly by the sodium metaperiodate treatment ($P < 0.05$), indicating that the special receptors of the microorganisms are protein compounds. According to the interactions such as exclusion, competition, and displacement, the five probiotic bacteria can reduce the relative adhesion percentages of part pathogens significantly. The inhibition of displacement to the pathogens was best, but the disparity was led by the different strain.

Key words: *Cyprinus carpio*; adhesion; mucus; probiotics

Corresponding author: WANG Kai-yu. E-mail: kywang@sicau.edu.cn