

# 对氨基苯甲酸对乳杆菌生长影响的体外实验

郭 斌 周学东 肖晓蓉 李继遥 李 蕾

**摘要** 目的:探讨对氨基苯甲酸菌株(PABA)对牙本质龋、根面龋致病菌之一的乳杆菌生长的影响。方法:10倍系列稀释法配制浓度为 $10^{-3} \sim 10^{-10}$  g/L的PABA液,将其分别加入改良的Carlsson培养基中,再将乳杆菌ATCC4356放入该培养基厌氧培养48 h(80% $N_2$ 、10% $H_2$ 、10% $CO_2$ ),用紫外可见分光光度计测定细菌浓度OD值( $\lambda = 540$  nm);并在琼脂平板培养观察细菌生长的情况,进行菌落计数。结果:PABA也有促进乳杆菌生长的能力,当PABA的浓度从 $10^{-10} \sim 10^{-4}$  g/L增加时,其促进乳杆菌生长的能力增强( $P < 0.05$ ),且当浓度为 $10^{-5}$  g/L时,促进乳杆菌生长的能力达最强,随着PABA的浓度增加到 $10^{-4}$  g/L时,此促进作用开始下降,PABA的浓度再增加至 $10^{-3}$  g/L时,对乳杆菌的生长无明显的促进作用。结论:PABA的浓度为 $10^{-5}$  g/L时,促进乳杆菌生长的能力达最强,高于或低于此浓度,这种促生长的作用均下降。

**关键词** 乳杆菌 对氨基苯甲酸 细菌生长 共生

## Effects of Para-aminobenzoic Acid (PABA) on Growth of *Lactobacillus acidophilus*

Guo Bin, Zhou Xuedong, Xiao Xiaorong, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The aim of this study is to examine effects of para-aminobenzoic acid (PABA) on the growth of *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*). **Methods:** Different concentrations of PABA ( $10^{-10} \sim 10^{-3}$  g/L) were separately transferred to the modified Carlsson medium. *L. acidophilus* (ATCC4356) grew in these Carlsson media. All cultures were incubated at 37 °C anaerobically in atmosphere of 80% of nitrogen, 10% of hydrogen, and 10% of carbon dioxide for 48 hours. Absorbance values ( $\lambda = 540$  nm) of bacterial suspensions were measured using a spectrometer (UV-1601). Colony forming units (CFU) were obtained by growing *L. acidophilus* in Carlsson media with different concentration of PABA ( $10^{-10} \sim 10^{-3}$  g/L). **Results:** Different concentrations of PABA ( $10^{-10} \sim 10^{-4}$  g/L) had different stimulating effects on the growth of *L. acidophilus* ( $P < 0.05$ ). But stimulating effects declined, when PABA concentration was  $10^{-5}$  g/L, and when the concentration of PABA reached  $10^{-3}$  g/L, the stimulating effect disappeared. **Conclusion:** This study indicates PABA stimulates the growth of *L. acidophilus*, and PABA can promote growth of *L. acidophilus*.

**Key words:** *Lactobacillus acidophilus* para-aminobenzoic acid growth

乳杆菌(*Lactobacillus*)是口腔的正常菌群。多数学者认为,乳杆菌虽不是龋病的初始致病菌,但参与了龋病的发展,是牙本质龋及根面龋的致病菌之一<sup>1</sup>。血液链球菌(简称血链菌)也是口腔的正常菌群,在牙菌斑的形成过程中,属早期定植菌,对其它细菌在牙面的粘附起了一定作用。目前认为:

血链菌所合成的对氨基苯甲酸(para-aminobenzoic acid, PABA)是变形链球菌(简称变链菌)的生长因子<sup>2,3</sup>,并且PABA在一定浓度范围内随浓度的增加( $10^{-10} \sim 10^{-4}$  g/L),促进变链菌生长的能力增强<sup>4</sup>。作为牙本质龋、根面龋致病菌之一的乳杆菌,其生长是否也受PABA的影响,并且影响程度如何,目前尚无这方面的报道。本研究的目的在于探求PABA对乳杆菌生长的影响,从而深入研究血链菌和乳杆菌之间相互关系在牙菌斑微生态平衡中的

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39670785)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院

作用,以促进探讨牙本质龋、根面龋的防治途径。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要试剂及仪器

实验菌株:国际参考菌株乳杆菌 ATCC4356; 改良 Carlsson 培养基及 PABA 的配制方法见参考文献 4, 培养基经高压灭菌 20min 后使用; 主要仪器:电子天平、厌氧培养箱及可见分光光度仪的型号及产地均见参考文献 4。

#### 1.2 细菌培养

将实验菌株接种于牛心脑浸汁(BHI)血琼脂平板上,厌氧培养 48 h(80 %N<sub>2</sub>、10 %H<sub>2</sub>、10 %CO<sub>2</sub>),形态学及生物化学检查为纯种,收集菌细胞,用无菌生理盐水洗涤 2 次后,用磷酸盐缓冲液配成混悬液(比浊 12 ×10<sup>8</sup> CFU/ml)。实验共分为 10 组,即阳性对照,阴性对照及 PABA 浓度分别为 10<sup>-3</sup> ~ 10<sup>-10</sup> g/L 的实验组,均采用双管法。每组加入改良 Carlsson 液体培养基 2 ml。阳性对照组及实验组内接种实验菌株,即分别精密移取 100μl 细菌混悬液于上述各管培养基中,阴性对照组加入 2.1 ml DH<sub>2</sub>O,阳性对照组中加入 2 ml DH<sub>2</sub>O,其余各实验组分别加入已配制的浓度为 10<sup>-3</sup> ~ 10<sup>-10</sup> g/L 的 PABA 液 2 ml,厌氧培养 48 h(80 %N<sub>2</sub>、10 %H<sub>2</sub>、10 %CO<sub>2</sub>)。

#### 1.3 菌液比浊

用可见分光光度仪测定培养后的细菌浓度 OD 值( = 540 nm),阴性对照用于调零。

#### 1.4 菌落计数

将上述在改良 Carlsson 液体培养基及不同浓度的 PABA 混和液中厌氧培养 48 h 细菌菌液各 0.1 ml,作 10 倍系列稀释,使接种的菌液浓度为 3 ×10<sup>5</sup> CFU/ml,每管取 10 μl 进行平板倾注,通过琼脂平板培养对细菌进行计数,并观察细菌生长情况。

#### 1.5 数据的统计学处理

单因素的方差分析比较各组总体均数间差别有无统计学意义,用 q 检验方法比较两组间的差别。

## 2 结 果

### 2.1 菌液比浊结果

乳杆菌在改良 Carlsson 培养基中生长得不如变链菌好,但 10<sup>-10</sup> ~ 10<sup>-4</sup> g/L 浓度的 PABA 也有促进乳杆菌生长的能力,且当 PABA 浓度加到 10<sup>-5</sup> g/L 时,促进生长的作用达最强,随着 PABA 的浓度增加到 10<sup>-4</sup> g/L 时,这种促进生长的能力开始下降,在 10<sup>-3</sup> g/L 浓度时,对乳杆菌的生长无明显的促进作用(表 1,图 1)。

表 1 不同浓度的 PABA 对乳杆菌生长的影响

PABA 浓度(g/L)	OD 值
10 <sup>-10</sup>	0.0291
10 <sup>-9</sup>	0.0315
10 <sup>-8</sup>	0.0343
10 <sup>-7</sup>	0.0356
10 <sup>-6</sup>	0.0994
10 <sup>-5</sup>	0.2627
10 <sup>-4</sup>	0.1593
10 <sup>-3</sup>	0.0258
阳性对照	0.0252

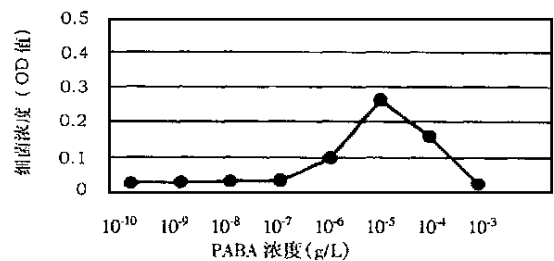


图 1 不同浓度的 PABA 影响乳杆菌生长的 OD 值变化

### 2.2 菌落计数结果

含不同浓度 PABA 的培养基中乳杆菌生长的菌落计数结果见表 2,结果表明从 10<sup>-10</sup> ~ 10<sup>-5</sup> g/L 不同浓度的 PABA 中乳杆菌生长的菌落计数依次增加(P < 0.05);但当 PABA 浓度增大到 10<sup>-4</sup> g/L 时,其菌落计数减少;当 PABA 浓度继续增大到 10<sup>-3</sup> g/L 时,菌落形成单位与对照组无显著性差异(P > 0.05)。

表 2 含不同浓度 PABA 的培养基中乳杆菌生长的菌落计数

PABA 浓度(g/L)	菌落计数(CFU/ml)	P 值
10 <sup>-10</sup>	2.6 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-9</sup>	3.1 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-8</sup>	3.6 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-7</sup>	4.1 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-6</sup>	5.4 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-5</sup>	7.6 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-4</sup>	6.2 ×10 <sup>7</sup>	<0.05
10 <sup>-3</sup>	8.1 ×10 <sup>6</sup>	>0.05
阳性对照	8.1 ×10 <sup>6</sup>	-

### 3 讨 论

牙菌斑是一个复杂的生态平衡体系,口腔微生物以形成菌斑的方式存在于牙面及根面,在这样一个复杂的细菌生态体系中,环境中的各种因素及细菌间的相互作用都将影响菌斑内微生态环境的稳定和菌群之间的动态变化。血链菌及乳杆菌均为口腔正常菌群,在牙菌斑的形成过程中,血链菌属早期定植菌,对其它细菌在牙面的粘附起了一定作用。已有研究证实,血链菌有合成 PABA 的能力,且代谢不受氧环境的影响<sup>3</sup>,当 PABA 的浓度达  $10^4$  g/L 时,促进变链菌生长的能力最强<sup>4</sup>。多数学者认为,乳杆菌虽不是龋病发生初始致病菌,但参与了龋病的发展,主要涉及牙本质龋,在日益受到学者们关注的根面龋研究中也证实乳杆菌是导致根面龋的致病菌之一。随着现代龋病病因学、口腔生态学的不断发展以及生态菌斑假说的提出,已逐渐认识到,通过调节、维护牙菌斑微生态平衡即可能达到防治龋病的目的<sup>5,6</sup>。

微生物生长所需的物质包括水、碳源、氮源、无机盐、生长因子,其中作为 B 族维生素之一的 PABA 是微生物必需的生长因子<sup>7</sup>。在已有的实验中也证实乳杆菌在 Carlsson 培养基(不含 PABA)中不生长,而在含 PABA 的培养基(改良 Carlsson 培养基)中却生长。PABA 在微生物学领域,其主要的生物学作用是促进微生物的生长,作用机理是微生物利用 PABA 合成四氢叶酸,后者不仅是许多酶促反应  $H^+$  的传递体,而且也是胸腺嘧啶核苷酸的前体<sup>8</sup>,具有很强的生物活性,因此,PABA 是微生物的生长因子。但 PABA 具有促进微生物生长的最佳浓度,并非含量越多促生长的效果越好。Chulay 等<sup>9</sup>报道 PABA 浓度在  $0.5 \mu\text{g/ml}$  时促进疟原虫 *falciparum* 在按蚊体内生长的能力最强,而高于此浓度时 PABA 将抑制疟原虫的生长。

本实验结果表明,在相同的改良 Carlsson 培养基中,并加入与变链菌生长条件一致的微量 PABA,乳杆菌生长的能力也增强,证实 PABA 不仅为菌斑中主要致龋菌变链菌的生长因子<sup>2~4</sup>,而且也是菌斑中另一致龋菌乳杆菌的生长因子。但在相平行

的培养基中,乳杆菌生长的细菌浓度较变链菌小,这可能是因为乳杆菌为嗜酸菌,其最适宜生长的培养基的 pH 值为  $5.5 \sim 6.2$ ,变链菌则为  $7.0$ ,而采用的改良 Carlsson 培养基其 pH 值为  $7.0$ ,更适宜变链菌生长之缘故。本实验还观察到随着 PABA 浓度的增加( $10^{10} \sim 10^5$  g/L),促进乳杆菌生长的能力也增强,且浓度为  $10^5$  g/L 时,促进乳杆菌生长能力最强,但当 PABA 浓度继续增大到  $10^4$  g/L 时,这种促进乳杆菌生长的能力开始下降,PABA 浓度再增大至  $10^3$  g/L 时,乳杆菌的生长情况与阳性对照无显著性差异。

本实验通过探求两菌间的相互关系,以促进深入探索血链菌和乳杆菌间相互关系在牙菌斑微生态平衡中的作用。

### 参考文献

- 1 Mcgrady JA. Specific and charge interactions mediate collagen recognition by *Lactobacilli*. J Dent Res, 1995, 74(4): 649 ~ 654
- 2 Carlsson J. Nutritional requirements of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in mixed culture. Arch Oral Biol, 1971, 16(8): 963 ~ 965
- 3 Zhou XD, Hu T, Zhang P, et al. Reversed phase high performance liquid chromatographic measurement of the P-aminobenzoic acid synthesized by *Streptococcus sanguis*. Clin J Dent Res, 1998, 1(2): 37 ~ 40
- 4 郭 斌,周学东,肖晓蓉,等. 对氨基苯甲酸对变形链球菌生长研究影响的体外实验. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(5): 312 ~ 314
- 5 March PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. Proc Finn Dent Soc, 1991, 87(4): 515 ~ 525
- 6 Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res, 1994, 8(2): 263 ~ 271
- 7 季季伦,张伟心,杨启端主编. 微生态生理学. 北京:北京农业大学出版社, 1993: 76
- 8 张乃微主编. 生物化学. 北京:北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1999: 145 ~ 146
- 9 Chulay, Walkins JDWH, Sixsmith DG. Synergistic antimalarial activity of pyrimethamine and sulfadoxine against *Plasmodium falciparum* in vitro. Am J Trop Med Hyg, 1984, 33: 325 ~ 330

(2001-07-09 收稿, 2001-08-21 修回)

(本文编辑 刘 怡)