

益生芽孢杆菌对草鱼肠上皮细胞的黏附及对嗜水气单胞菌的抑制

孔维光 吴志新 李思思 赵 慧 李锡阁 陈孝煊

华中农业大学水产学院/湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心/
农业部淡水生物繁育重点实验室/水产养殖国家级实验教学示范中心(华中农业大学), 武汉 430070

摘要 为探讨益生性枯草芽孢杆菌对肠上皮细胞黏附及对嗜水气单胞菌的抑制作用,以草鱼肠上皮细胞为研究对象,检测了枯草芽孢杆菌对肠上皮细胞的黏附率、对嗜水气单胞菌的黏附抑制率和对各种生理生化指标的影响。结果显示:枯草芽孢杆菌对草鱼肠上皮细胞形态、细胞中四甲基偶氮唑盐(MTT)OD 值、乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)和谷草转氨酶(GOT)活性等各种生理指标无显著影响,但在孵育 3 h 和 6 h 后分别显著降低了 Na^+ , K^+ -ATP 酶和谷丙转氨酶(GPT)的活性;与嗜水气单胞菌孵育 3 h 后,肠上皮细胞由椭圆变成不规则形态,培养液的死细胞增多,并且在多数时间点上显著降低了 MTT OD 值以及谷草转氨酶、 Na^+ , K^+ -ATP 酶和谷丙转氨酶的活性,细胞中 MTT OD 值和细胞上清中乳酸脱氢酶的活性显著提高($P<0.05$);枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌共孵育对肠上皮细胞形态及各种生理指标的影响明显小于嗜水气单胞菌组;黏附抑制实验显示枯草芽孢杆菌可以显著降低嗜水气单胞菌对肠上皮细胞的黏附率。提示枯草芽孢杆菌可以抑制嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞的黏附,并减轻嗜水气单胞菌对细胞的损伤。

关键词 枯草芽孢杆菌;嗜水气单胞菌;黏附;细胞损伤;肠上皮细胞;草鱼

中图分类号 S 942.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0067-07

细菌性肠道疾病是养殖鱼类的主要病害之一^[1]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)可通过脂多糖、外膜蛋白、多种酶类、溶血素等毒素侵入鱼体并逃避宿主的防御机制^[2-4]。嗜水气单胞菌可黏附到肠道并导致粘膜损伤,使病原菌易于通过肠道黏膜侵入机体^[5-6]。研究表明,病原菌的黏附是感染宿主细胞的重要阶段,阻止病原菌的黏附,其感染过程就会被阻断^[7]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种重要的微生态制剂,它可通过与肠黏膜上皮细胞的黏附而定植在肠道内,形成的微生物屏障对病原菌起到拮抗作用^[8-9]。有报道表明,枯草芽孢杆菌对鱼类致病性嗜水单胞菌^[10]、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)及弧菌 1701 株(*Vibrio* 1701)均有抑制作用^[11],其机制可能是通过产生脂肽类、肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类和核酸类等多种化合物来抑制病原菌的生长^[12]。目前关于益生性枯草芽孢杆菌对鱼类肠上皮细胞的黏附及其对鱼类病原菌的黏附抑制等方面的作用机制还鲜见报道。本试验采用原代培养的草鱼肠上皮细胞,研究益生性枯草芽孢杆菌和病原性嗜水气单胞菌对肠上皮细胞的黏附作用及其对细胞损伤的影响,以期对枯草芽孢杆菌在水产养殖中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌 株

枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)Ch9 分离自草鱼肠道,已证明对草鱼的生长有良好的促进作用^[13];嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)AH1,分离自细菌性败血症银鲫,可引起草鱼、银鲫、团头鲂、鲢等鱼类细菌性败血症和肠炎。菌株由笔者所在实验室保存。

1.2 试 剂

DMEM 培养基、山梨醇、青霉素、链霉素、庆大霉素,均为美国 Gibco 公司产品;中性蛋白酶(I 型)、胶原酶(Ⅱ型)、L-多聚赖氨酸、表皮生长因

收稿日期:2017-04-20
基金项目:国家自然科学基金项目(31472310)
孔维光,硕士研究生。研究方向:水生动物医学。E-mail: weigkong226@163.com
通信作者:陈孝煊,教授。研究方向:水生动物病害防控。E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

子、纤维表皮生长因子、二甲基亚砷,均为美国 Sigma 公司产品;胎牛血清,为美国 ScienCell 公司产品;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transaminase, GOT)、超微量 Na^+ , K^+ -ATP 酶、BCA 总蛋白等检测试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 草鱼肠上皮细胞的分离及培养

草鱼肠上皮细胞的分离及培养方法参照文献[14]。分离细胞用含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞数为 5×10^5 个/mL,接种到 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL,置于 28°C 、5% CO_2 培养箱中进行原代培养,待细胞形成膜状单层后进行后续实验。

1.4 嗜水气单胞菌和枯草芽孢杆菌对草鱼肠上皮细胞形态的影响

细胞形成膜状单层后,更换一半新鲜培养基。试验共分 4 组:对照组(Con)加入 100 μL DMEM 培养基(不加血清);BS 组加入 100 μL (1×10^8 /mL) *B. subtilis*;AH 组加入 100 μL (1×10^8 /mL) *A. hydrophila*;BS+AH 组加入 100 μL (1×10^8 /mL) *B. subtilis* 和 *A. Hydrophila* (1:1)。每组 6 个重复,置于 28°C 、5% CO_2 培养箱中进行孵育。分别在孵育 1、3、6 h 后,用倒置荧光显微镜(Nikon Eclipse Ti, Japan)观察肠上皮细胞的生长状况和形态变化。

1.5 黏附抑制实验

参照 Ingrassia 等^[14]和 Guzman-Murillo 等^[15]的方法,采用平板菌落计数法测定枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对鱼肠上皮细胞的黏附率。抑制率为相对于 AH 组细胞上黏附 AH1 的数量,BS+AH 组细胞上黏附 AH1 数量减少的百分率。培养和分组同本文“1.4”。分别在孵育 1、3、6 h 后,用 Hanks 液轻轻冲洗 2 次,洗去未黏附的细菌,向各孔中加入 0.2 mL 含 1% Triton X-100 的 PBS,混匀后室温放置 10 min,使黏附的细菌充分释放;再向各孔中加入 0.8 mL PBS 缓冲液。吸出各孔悬液,用无菌生理盐水进行梯度稀释后,平板活菌计数法测定细菌数。细菌的黏附率和抑制率参照文献[14],按下式计算:

$$\text{黏附率} = \frac{\text{黏附在细胞上的菌数}}{\text{所加入的菌数}} \times 100\%$$

抑制率 =

$$\left(1 - \frac{\text{黏附在 BS+AH 组细胞上 AH1 的数量}}{\text{黏附在 AH 组细胞上 AH1 的数量}}\right) \times 100\%$$

1.6 收集细胞、上清液样品和检测生理生化指标

细胞培养和分组同本文“1.4”。在孵育 1、3、6 h 后,分别于相应时间点吸取上清液(或保存于一 20°C 待测),用于检测乳酸脱氢酶(LDH)活性。在培养板中每孔加入 100 μL 含有 0.5% Triton 的 Tirs-HCl 溶液,置室温下 30 min,收集细胞裂解液(或保存于一 20°C 待测),用于检测 Na^+ , K^+ -ATP、碱性磷酸酶(AKP)、谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)的活力。

细胞活性的检测采用 MTT 法。分别在孵育 1、3、6 h 后,吸出上清液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,然后每孔加入 50 μL $1 \times \text{MTT}$ 溶液,置于 28°C 、5% CO_2 的培养箱中继续孵育 4 h。吸出孔内液体,每孔加入 150 μL DMSO 溶解不溶物,振荡 10 min 后,用酶标仪在 570 nm 处检测每孔的 OD 值。

1.7 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,使用 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析,组间用 Duncan's 法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。对添加菌株和处理时间的交互作用作双因素方差分析(two-way ANOVA)。

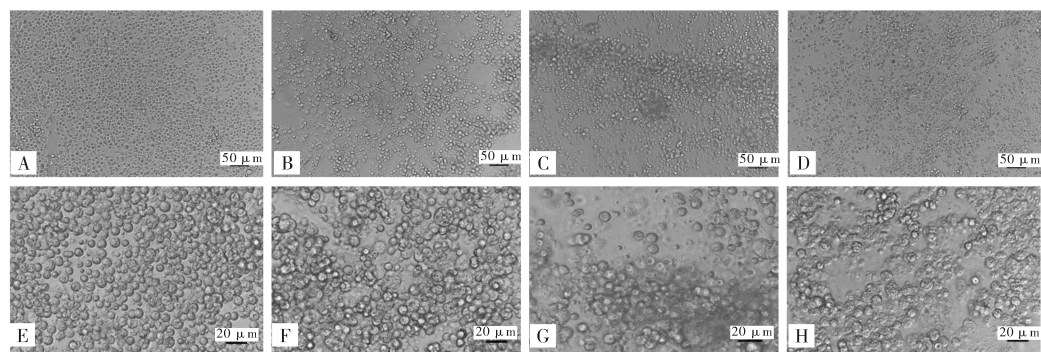
2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对肠上皮细胞形态的影响

分离的草鱼肠上皮细胞具有肠上皮细胞的典型特征,呈椭圆形或扁平多角形,细胞相连呈“铺石路”样(图 1A 和图 1D)。与对照组相比,BS 组 3 h 后对细胞的影响较小,仅看到少量细胞漂浮于培养基表面,但细胞形态正常(图 1B, E)。AH 组 3 h 后细胞表面黏附了大量的细菌,漂浮于培养基液面的死细胞及不规则形状的细胞增多(图 1C, F)。BS+AH 组细胞表面黏附大量不同形态的细菌,部分细胞形态改变并漂浮于培养基液面(图 1D, H)。

2.2 枯草芽孢杆菌抑制嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞的黏附作用

枯草芽孢杆菌的黏附率及其对嗜水气单胞菌黏附的影响见表 1。孵育 1、3、6 h 后,枯草芽孢杆菌对草鱼肠上皮细胞的黏附率分别为 $11.55\% \pm 3.211\%$ 、 $14.75\% \pm 1.984\%$ 、 $14.42\% \pm 0.804\%$ 。嗜



A,E:对照组;B,F:枯草芽孢杆菌组;C,G:嗜水气单胞菌组;D,H:枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌共孵育组。A,E:Control group; B, F:*B. subtilis* group; C,G:*A. hydrophila* group; D,H: (*B. subtilis* + *A. hydrophila*) group.

图 1 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞形态的影响

Fig.1 The influence of *B. subtilis* and *A. hydrophila* on morphology in the intestinal epithelial cells of grass carp

表 1 枯草芽孢杆菌对草鱼肠道上皮细胞的黏附率及其对嗜水气单胞菌黏附抑制

Table 1 The adherence rate of *B. subtilis* and its inhibition ratio to *A. hydrophila* in the intestinal epithelial cells of grass carp %

时间/h Time	黏附率 Adherence rate			抑制率 Inhibition ratio
	BS	AH	BS+AH	
1	11.55±3.211	14.38±3.189	7.75±1.323	45.49±5.526
3	14.75±1.984	17.83±2.626	11.50±1.750	35.55±0.455
6	14.42±0.804	21.08±2.788	13.92±0.764	33.08±10.657

水气单胞菌对细胞的黏附率分别为 14.38%±3.189%、17.83%±2.626%、21.08%±2.788%；2 种细菌共孵育后，嗜水气单胞菌的黏附率分别为 7.75%±1.323%、11.50%±1.750%、13.92%±0.764%，枯草芽孢杆菌对嗜水气单胞菌黏附的抑制率分别为 45.49%±5.526%、35.55%±0.455%、33.08%±10.657%。

2.3 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞活性的影响

枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞活性的影响见表 2。与对照组相比,BS 组细胞的 MTT OD 值差异不显著($P>0.05$)；孵育 1、3 和 6 h 后,AH 组细胞的 MTT OD 值显著降低($P<0.05$)；孵育 1 h 后,BS+AH 组 MTT OD 值显著低于对照

表 2 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠道上皮细胞 MTT OD 值的影响

Table 2 The influence of *B. subtilis* and *A. hydrophila* on MTT OD value in the intestinal epithelial cells of grass carp

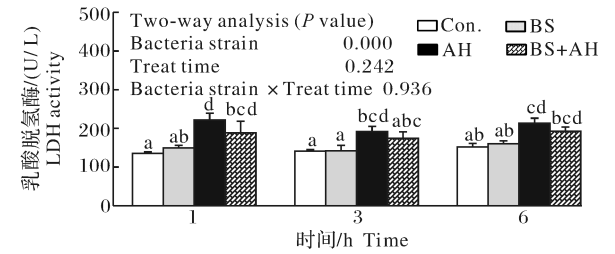
项目 Items		Con	BS	AH	BS+AH
时间/h Time	1	0.443±0.018e	0.423±0.037e	0.358±0.048cd	0.384±0.039d
	3	0.348±0.035bcd	0.357±0.058cd	0.275±0.038a	0.349±0.046cd
	6	0.324±0.025bc	0.300±0.056ab	0.270±0.043a	0.318±0.035abc
双因子分析(<i>P</i> 值) Two-way analysis(<i>P</i> value)					
菌株处理 Bacteria strain		0.000			
处理时间 Treat time		0.000			
菌株处理×处理时间 Bacteria strain×Treat time		0.283			

注:数据为平均值±标准差,同行数据标不同字母表示组间的差异显著($P<0.05$), $n=6$ 。Note: Values in the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$), data presented are Means±SD, $n=6$.

组($P<0.05$),而其他时间点无显著差异($P>0.05$)。在孵育 3 h 后,AH 组 MTT OD 值显著低于 BS+AH 组($P<0.05$)。各处理组 3 h 和 6 h MTT OD 值与 1 h 相比均显著降低($P<0.05$)。

2.4 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞损伤的影响

与对照组相比,BS 组细胞培养上清 LDH 无显著变化($P>0.05$);孵育 1、3 和 6 h 后,AH 组细胞培养上清中 LDH 活性显著高于对照组($P<0.05$);BS+AH 组细胞培养上清 LDH 活性在 1 h 时显著高于对照组($P<0.05$),其他时间显著低于 AH 组($P<0.05$),详见图 2。双因素分析结果表明,细胞培养上清中 LDH 的活性与是否加入细菌有关,与处理时间无关。



不同字母表示同一时间的组间有显著性差异($P<0.05$);下同。
Different letter means significant difference between groups ($P<0.05$); the same applies below.

图 2 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞乳酸脱氢酶活性的影响

Fig.2 The influence of *B. subtilis* and *A. hydrophila* on LDH activity in the intestinal epithelial cells of grass carp

2.5 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对肠上皮细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶和碱性磷酸酶 (AKP)的影响

BS 组孵育 3 h 后,细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性显著低于对照组($P<0.05$),其他时间点无显著变化;AH 组细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性在各时间点上都显著低于对照组($P<0.05$);BS+AH 组细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性在 1 h 时无显著变化,其他时间点显著降低($P<0.05$)。处理时间和两者的交互作用对细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性均无显著影响($P>0.05$)(图 3A)。菌株、处理时间及两者的相互作用对细胞 AKP 均无显著差异($P>0.05$)(图 3B)。

2.6 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对肠上皮细胞谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)的影响

AH 组在孵育 6 h 后,细胞 GOT 的活性显著低于对照组,也显著低于孵育 1 h 和 3 h($P<0.05$)。BS 组及 BS+AH 组 GOT 活性无显著变化(图 4A)。AH 组在孵育 3 h 和 6 h 后,细胞 GPT 活性显著低于对照组($P<0.05$),孵育 6 h 后的 GPT 活性显著低于 1 h 和 3 h。与对照组相比,BS 组及 BS+AH 组在孵育 6 h 后 GPT 活性显著降低($P<0.05$),其他时间点无显著差异($P>0.05$)(图 4B)。双因素分析结果表明,细菌和处理时间均对 GPT 活性有显著影响($P<0.05$)。

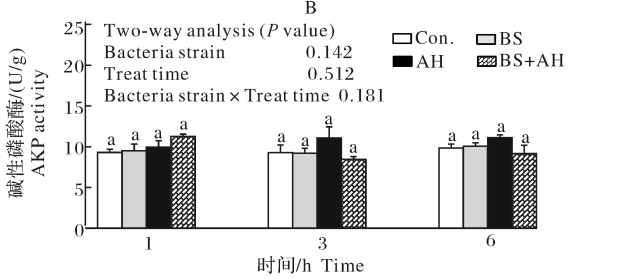


图 3 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞 Na^+ , K^+ -ATP 酶和碱性磷酸酶活性的影响

Fig.3 The influence of *B. subtilis* and *A. hydrophila* on Na^+ , K^+ -ATPase and AKP activity in the intestinal epithelial cells of grass carp

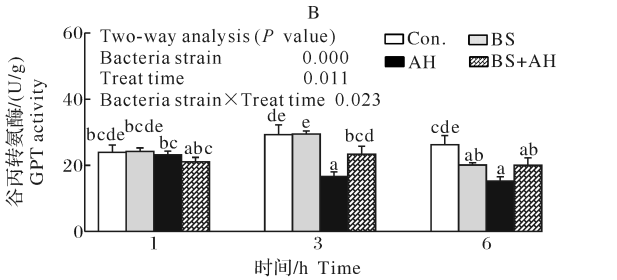


图 4 枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性的影响

Fig.4 The influence of *B. subtilis* and *A. hydrophila* on GOT and GPT activity in the intestinal epithelial cells of grass carp

3 讨论

病原菌多数是通过黏附并定植在肠上皮细胞,引起细胞代谢紊乱^[16]或入侵细胞后改变细胞骨架的结构^[17],从而损伤宿主细胞导致肠道炎症。王彦波等^[18]报道,益生菌 PSB0201 可以使罗非鱼肠上皮细胞的细胞轮廓变得模糊,但细胞形态正常。本试验中枯草芽孢杆菌黏附于草鱼肠上皮细胞并没有改变细胞形态,仅观察到细胞轮廓变得模糊,与上述报道相同,同时枯草芽孢杆菌可减少由嗜水气单胞菌引起的细胞形态变化。

研究表明,长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*) SBT2928 可以分泌一种黏附抑制因子,有效地抑制肠毒性大肠杆菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*)对肠上皮样细胞 HCT-8 的黏附^[19];益生菌有很强的黏附能力,通过占据黏附位点,从而抑制病原菌在肠上皮细胞表面的黏附、入侵和破坏^[20]。枯草芽孢杆菌的培养上清液中存在某些抗生素类的杀菌物质,从而抑制病原菌对肠上皮细胞的黏附和入侵^[12]。本试验显示,该枯草芽孢杆菌可以在一定程度上抑制嗜水气单胞菌对草鱼肠上皮细胞的黏附和损伤,但其抑制黏附的机制有待进一步的研究。

MTT OD 值可反映活细胞数量及细胞代谢的活力。有报道表明,致病性大肠杆菌 SW0309 可以显著降低肠上皮样细胞 HT-29 细胞的活力($P < 0.05$),而用益生菌路氏乳杆菌 JCM1081 或嗜酸乳杆菌 La111878 处理后,细胞活力并无显著变化;路氏乳杆菌 JCM1081 或嗜酸乳杆菌 La111878 与致病性大肠杆菌 SW0309 共同孵育细胞后,对细胞活力影响明显小于致病性大肠杆菌 SW0309 处理组^[21]。在本试验中,与枯草芽孢杆菌孵育后细胞 MTT OD 值没有明显变化,而嗜水气单胞菌孵育组显著降低了细胞 MTT OD 值($P < 0.05$),枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌共孵育组细胞 MTT OD 值也略有降低,但降低幅度明显要小于嗜水气单胞菌孵育组。

细胞浆内的大分子物质 LDH 能够较好地反映细胞膜的损伤程度^[22],LDH 在正常情况下是不能通过细胞膜到达细胞外,当细胞膜受到损伤而通透性增加时,LDH 能迅速溢到胞外,从而导致胞外 LDH 活性增加。与对照组相比,用益生菌 PSB0201 与罗非鱼肠上皮细胞共孵育,培养液上清 LDH 的

活性略有上升,但差异不显著^[18],而致病性鳃弧菌与鲫肠上皮细胞共孵育后,培养液上清 LDH 的活性显著增加^[23]。本试验的结果与此一致:与对照组相比,枯草芽孢杆菌对细胞培养上清 LDH 活性无显著影响,嗜水气单胞菌可以引起草鱼肠上皮细胞培养上清中 LDH 活性显著升高,而枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌共孵育组的细胞培养上清 LDH 活性也有升高趋势,但升高幅度明显小于嗜水气单胞菌处理组。

研究表明 AKP、 Na^+ , K^+ -ATP 酶、GPT 和 GOT 皆与细胞分化、凋亡和蛋白质代谢密切相关^[20, 24-25]。在本试验中,各处理组细胞 AKP 的活性没有发生显著变化,说明各菌株对细胞的分化并未产生显著影响。与对照组相比,枯草芽孢杆菌在一定程度上降低了细胞中 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性,但多数时间点上无显著差异,而嗜水气单胞菌在各时间点上都显著降低细胞中 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性。此外,与对照组相比枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌共孵育组,细胞中 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性在 1、3 和 6 h 时显著降低,但其活性降低的程度小于嗜水气单胞菌处理组。说明枯草芽孢杆菌减缓了嗜水气单胞菌所引起的细胞凋亡。

细胞中的 GPT 和 GOT 在氨基分解代谢中起着至关重要的作用。在本试验中,嗜水气单胞菌显著降低了细胞中 GPT 和 GOT 的活性;枯草芽孢杆菌和嗜水气单胞菌共孵育组细胞 GPT 和 GOT 活性降低程度低于嗜水气单胞菌处理组。说明嗜水气单胞菌影响了肠上皮细胞蛋白质的代谢水平,枯草芽孢杆菌对这种影响起到了一定的抑制作用。

参 考 文 献

- [1] LEE K K, LIU P C, CHUANG W H. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish [J]. Marine biotechnology, 2002, 4(3):267-277.
- [2] CASCON A, YUGUEROD J, TEMPRANO A, et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. Infection & immunity, 2000, 68(6):3233-3241.
- [3] SESHADRI R, JOSEPH S W, CHOPRA A K, et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trade [J]. Journal of bacteriology, 2006, 188(23):8272-8282.
- [4] KHUSHIRAMANI R M, MAITI B, SHEKAR M, et al. Re-

- combinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* [J]. Research in microbiology, 2012, 163(4):286-291.
- [5] JUTFELT F, SUNDH H, GLETTE J, et al. The involvement of *Aeromonas salmonicida*, virulence factors in bacterial translocation across the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum), intestine [J]. Journal of fish diseases, 2008, 31(2):141-151.
- [6] SCHROERS V, MAREL M V D, NEUHAUS H, et al. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila*, to common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquaculture, 2009, 288(3/4):184-189.
- [7] BHAVSAR A P, GUTTMAN J A, FINLAY B B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogen [J]. Nature, 2007, 449(7164):827-834.
- [8] LA RAGONER M, WOODWARD M J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens [J]. Veterinary microbiology, 2003, 94(3):245-256.
- [9] LA RAGONER M, CASULA G, CUTTING S M, et al. *Bacillus subtilis*, spores competitively exclude *Escherichia coli*, O78:K80 in poultry [J]. Veterinary microbiology, 2001, 79(2):133-142.
- [10] 沈智华, 沈锦玉, 尹文林, 等. 枯草芽孢杆菌 B115 优化培养及其对气单胞菌的抗菌效果的研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4):79-84.
- [11] 黄剑飞, 李健, 刘淇, 等. 一株芽孢杆菌的分离、鉴定及其抗菌效果研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(6):2321-2322.
- [12] 叶小兰, 李鹏成, 杨倩. 枯草芽孢杆菌拮抗病原菌黏附和入侵 Caco-2 细胞的研究[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(6):81-84.
- [13] WU Z X, FENG X, XIE L L, et al. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch₉ for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora [J]. Journal of applied ichthyology, 2012, 28(5):721-727.
- [14] INGRASSIA I, LEPLINGARD A, DARFEUILLEMICHAUD A. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells [J]. Applied & environmental microbiology, 2005, 71(6):2880-2887.
- [15] GUZMAN-MURILLO M A, MERINO-CONTRERAS M L, ASCENCIO F. Interaction between *Aeromonas veronii*, and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture [J]. Journal of applied microbiology, 2000, 88(5):897-906.
- [16] FLECKENSTEIN J M, HARDWIDGE P R, MUNSON G P, et al. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli*, infection [J]. Microbes & infection, 2010, 12(2):89-98.
- [17] SCHMIDT L D, KOHRT L J, BROWN D R. Comparison of growth phase on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) and mucosal explants from porcine small intestine [J]. Comparative immunology microbiology & infectious diseases, 2008, 31(1):63-69.
- [18] 王彦波, 许梓荣. 益生菌 PSB0201 对原代培养罗非鱼肠道上皮细胞的影响[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(2):233-236.
- [19] FUJIWARA S. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor [J]. International journal of food microbiology, 2001, 67(1/2):97-106.
- [20] CHOW A, ZHANG R. Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells [J]. Journal of nutrition, 1998, 128(8):1296-1301.
- [21] 王斌, 但国蓉, 袁静, 等. 乳杆菌黏附抑制致病性大肠杆菌对肠上皮样细胞侵袭的初步研究[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(6):550-552.
- [22] KONJEVIC G, JURISIC V, SPUZIC I. Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity [J]. Journal of immunological methods, 1997, 200(1/2):199-201.
- [23] 宋增福, 吴天星, 潘晓东. 丁酸梭菌对肠道上皮细胞黏附及对鳃弧菌抑制的研究[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(8):9-12.
- [24] YOKOYAMA T, KAYA S K, TANIGUCHI K, et al. Acid-labile ATP and/or ADP/P(i) binding to the tetraprotomeric form of Na/K-ATPase accompanying catalytic phosphorylation-dephosphorylation cycle [J]. Journal of biological chemistry, 1999, 274(45):31792-31796.
- [25] CUVIER-PERES A, KESTEMONT P. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae, *Perca fluviatilis* [J]. Fish physiology and biochemistry, 2001, 24(4):279-285.

**Adherence of *Bacillus subtilis* to intestinal epithelial cells
of grass carp and its inhibition to *Aeromonas hydrophila***

KONG Weiguang WU Zhixin LI Sisi ZHAO Hui LI Xige CHEN Xiaoxuan

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/

Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic

Animal Diseases Control and Prevention/

Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture/

National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education

(Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070, China

Abstract To investigate the adherence of *Bacillus subtilis* and its inhibitory of *Aeromonas hydrophila*, the adherence rate of *B. subtilis*, its inhibition rate of *A. hydrophila*, and various physiological and biochemical indexes were detected in the intestinal epithelial cells of grass carp. The results showed that after treatment of *B. subtilis* alone, cell morphology, methyl thiazolyl tetrazolium optical density (MTT OD) value, lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AKP) and glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) activity were unsignificantly changed ($P>0.05$), but the activities of Na^+ , K^+ -ATPase and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) significantly increased ($P<0.05$) at 3 h and 6 h, respectively. The cell shape was obviously changed by *A. hydrophila* from ellipse to irregular shape and the number of dead cells in the culture medium increased. Meanwhile, *A. hydrophila* could significantly increase MTT OD value and LDH activity in the culture medium, and significantly decrease the activities of Na^+ , K^+ -ATPase, GOP and GPT in the cells ($P<0.05$). The adherence experiment showed that *B. subtilis* could significantly reduce the adhesion of *A. hydrophila* to grass carp intestinal cells. In brief, adhesion and damage of *A. hydrophila* to intestinal epithelial cells were inhibited by *B. subtilis*.

Keywords *Bacillus subtilis*; *Aeromonas hydrophila*; adherence; cell damage; intestinal epithelial cells; grass carp

(责任编辑:边书京)