

虎耳草乙醇提取物对细菌生长曲线的影响

刘世旺 徐艳霞 石宏武 (黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北黄州 438000)

摘要 以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为试验菌株, 通过分析不同虎耳草乙醇提取物浓度下细菌生长曲线来研究虎耳草的抑菌作用。结果表明, 0.01、0.05、0.10 g/ml 3种较低浓度的提取物对摇床培养的金黄色葡萄球菌生长具有较强的抑制作用, 而0.25和0.50 g/ml 2种较高浓度的提取物对摇床培养的金黄色葡萄球菌生长有较强的促进作用; 这5种浓度的提取物均对摇床培养的大肠杆菌生长表现为抑制作用。所以, 虎耳草乙醇提取物具有明显的抑菌活性。

关键词 虎耳草; 乙醇提取物; 生长曲线; 抑菌作用

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)04-00943-02

Effect of Ethanol Extract of *Saxifraga stolonifera* Meerb on Growth Curve of Bacterium

LIU Shi-wang et al (Life Science and Engineering College, Huanggang Normal University, Huangzhou, Hubei 438000)

Abstract The growth curves of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were drawn to study the antimicrobial character. The results showed that 0.01, 0.05 and 0.10 g/ml extract of *Saxifraga stolonifera* Meerb had strong antimicrobial effect on *S. aureus*, but 0.25 and 0.50 g/ml extract had promotive effect on *S. aureus*. And the extract of *Saxifraga stolonifera* Meerb of different concentration had antimicrobial effect on *E. coli*. The ethanol extract of *Saxifraga stolonifera* Meerb had obvious antimicrobial effect.

Key words *Saxifraga stolonifera* Meerb; Ethanol extract; Growth curve; Antimicrobial effect

虎耳草(*Saxifraga stolonifera* Meerb)为虎耳草科虎耳草属的多年生常绿草本植物, 野生于阴湿山坡石缝中, 长江流域、华南、西南、华东、陕西等省区均有分布^[1], 在黄冈市大别山地区也很常见。其主要成分有岩白菜素、槲皮素-鼠李糖苷、槲皮素、原儿茶酸、没食子酸、琥珀酸、反甲基丁烯二酸等^[2]。虎耳草药用可治急性中耳炎、风热咳嗽等^[3], 农业上也可用于抑制葡萄霜霉病菌^[4]等。虎耳草繁殖力强, 自然资源贮量丰富, 在观赏、药用及绿色农药等方面都具有较好的开发利用前景^[5-6]。但目前关于虎耳草药理方面的研究还很少^[7]。为此, 笔者开展了虎耳草影响细菌生长曲线的研究, 旨在为进一步了解虎耳草抑菌机理和综合开发利用该植物资源具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 虎耳草采自湖北省黄冈师范学院生命科学与工程学院植物园。供试金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌种由黄冈师范学院省级生物实验教学示范中心提供。

1.2 仪器 分光光度计(752紫外可见分光光度计)、超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、恒温水浴培养摇床、旋转蒸发器、真空泵(SHZ-型循环水真空泵)、电子天平、移液枪等。

1.3 培养基配方 牛肉膏固体培养基: 牛肉膏3 g, 蛋白胨5 g, NaCl 5 g, 蒸馏水1 000 ml, 琼脂15~20 g, pH 7.4; 察氏液体培养基: NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 蔗糖30 g, 蒸馏水1 000 ml, pH 自然。

1.4 虎耳草水分含量的测定 将鲜采的植株全株洗净、晾干、剪碎。先称取20.00 g鲜采虎耳草, 置于75℃恒温烘箱中烘11 h左右, 使其达到恒重, 再次称重, 得干重6.67 g, 所以试验所用的虎耳草材料的含水量为66.65%。

1.5 虎耳草乙醇提取物的制备 取5 kg鲜采虎耳草, 置入95%酒精浸泡30 d, 期间经常搅拌, 然后用棉花阻隔过滤, 用旋转蒸发器蒸发浓缩, 得膏状物2 312 g。烘干后称重,

被乙醇浸泡提取后的虎耳草残渣干重为1 371 g, 膏状物的含水量约为87.2%, 冷藏备用。

1.6 培养基及试验用品的灭菌方法 配制察氏液体培养基360 ml, 平均分装于36支试管中; 配制牛肉膏固体培养基500 ml。将上述2种培养基和若干包扎好的试管、小烧杯、移液枪枪头等置于高压灭菌锅内, 121℃湿热灭菌20 min; 然后在超净工作台上, 趁热将部分固体培养基分装于4支已灭菌的大试管中, 并且制成斜面。将所有分装好的培养基、斜面置于37℃恒温培养箱中, 做无菌检测试验。无污染斜面用于活化菌种, 液体培养基用于分组试验。

1.7 液体培养基分组 将装有察氏液体培养基的36支试管分为2组: A组即金黄色葡萄球菌组, B组即大肠杆菌组。每组设计6个虎耳草提取物浓度梯度: 0.50、0.25、0.10、0.05、0.01、0 g/ml。按照梯度要求, 分别称取冷藏的虎耳草乙醇提取物5.0、2.5、1.0、0.5、0.1 g, 煮沸并加入到对应试管中。然后, 向每支试管中接入已活化的对应菌液0.1 ml, 适当振荡混匀。每组重复3次。

1.8 OD₄₂₀值的测定和微生物培养 制成混合培养液后即进行第1次OD₄₂₀值的测定, 测定后将试管置于37℃恒温培养摇床中培养, 每间隔2.5 h测定并记录OD₄₂₀值1次。以未接种且未加入虎耳草提取物的察氏液体培养基作空白(CK)。在测定过程中, 应尽量减少培养液在空气中暴露的时间, 在每次吸取液体后应更换所用枪头和移液管, 在吸取前应适当振荡试管中的液体。每次测定完毕, 用液体培养基涮洗比色杯3次。每次读出的OD₄₂₀值最好不超过0.40, 超出时应适当稀释并重新测定。

1.9 细菌生长曲线的绘制 根据3次重复测定所得的数据, 求出OD₄₂₀平均值, 然后以OD₄₂₀为纵坐标、时间为横坐标绘出生长曲线。

2 结果与分析

由于虎耳草提取物本身会对OD值产生影响, 而每支试管中加入提取物的量不相同, 所以图1和图2中各条曲线的起点不同。这样的曲线虽然可以清晰地显示培养液OD值的变化情况, 但是难以比较不同提取物浓度组的

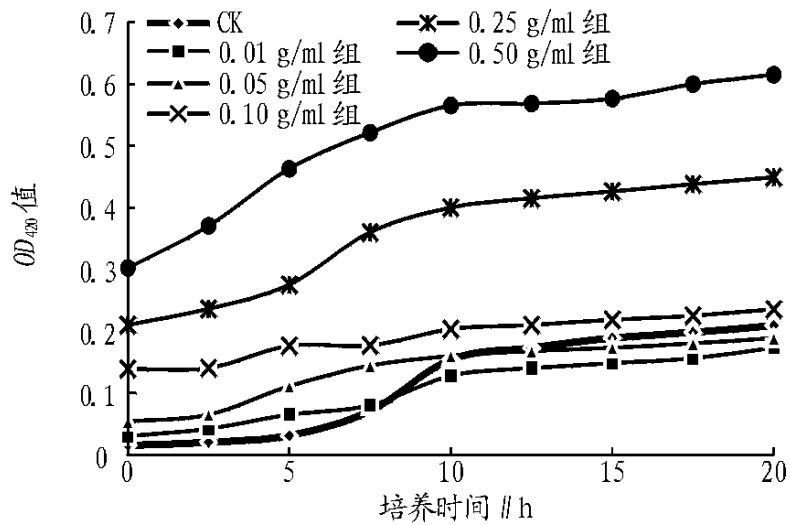


图1 不同提取物浓度下金黄色葡萄球菌的生长曲线

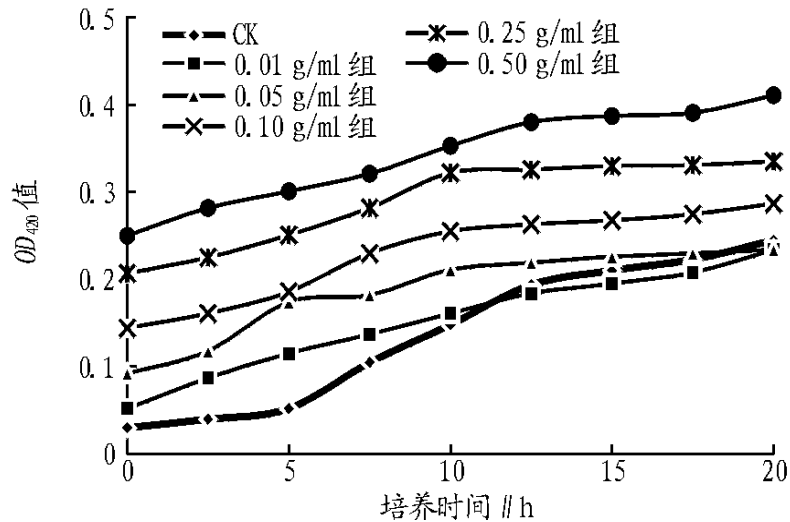


图2 不同提取物浓度下大肠杆菌的生长曲线

细菌生长曲线。剔除提取物对 OD 值的影响,把各条曲线置于同一起点上,将有利于生长曲线间的比较。从图1和图2可以看出,0 g/ml 浓度组(CK)0 h 时的 OD 值是培养基和起始菌液吸光度的总和,而其余各浓度组0 h 时的 OD 值则是培养基、起始菌液和虎耳草提取物吸光度的总和。上述2个总和的差值即可近似地认为是虎耳草提取物的吸光度。将虎耳草提取物各浓度组的 OD 值减去虎耳草提取物本身的 OD 值,即可近似的反映出不同时间培养液中菌体的实际浓度,由此作出的生长曲线将具有相同的起点。按照这一处理方法,分别得出A组、B组的校正生长曲线,见图3和图4。

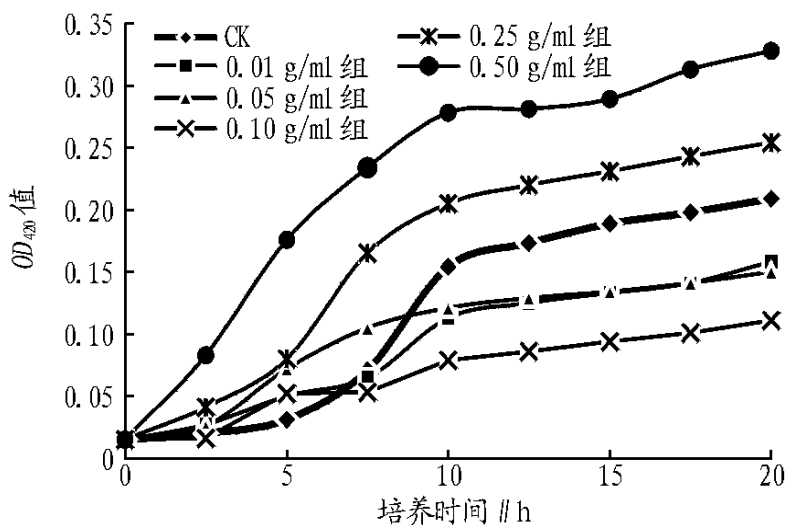


图3 不同提取物浓度下金黄色葡萄球菌的校正生长曲线

从图3可以看出,0.01、0.05、0.10 g/ml 虎耳草提取物3组生长曲线的稳定期区段均位于对照组之下,表明此时葡萄球菌生长均受到明显抑制,且以0.10 g/ml 组抑制作用最强;而0.25和0.50 g/ml 虎耳草提取物则相反,生长曲线的稳定期区段均位于对照组之上,表明此时菌体生长不但未受到抑制,反而受到促进,并且浓度越高,促进作用越强。

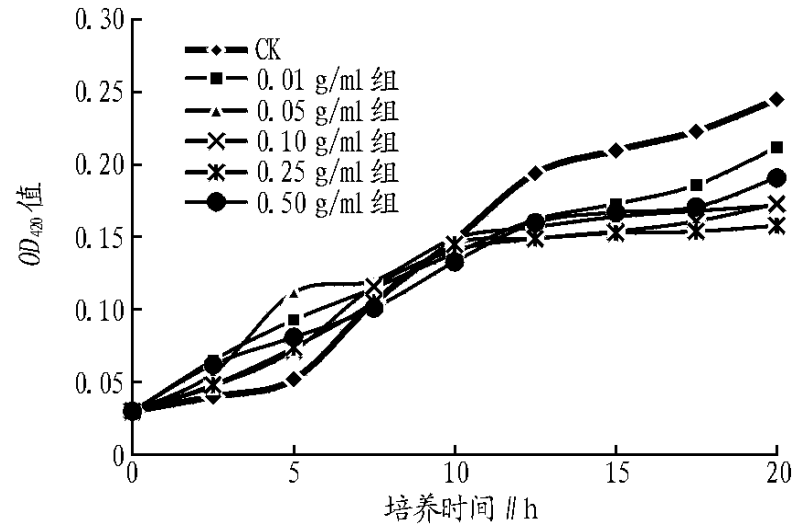


图4 不同提取物浓度下大肠杆菌的校正生长曲线

所以,0.10 g/ml 是虎耳草提取物抑制葡萄球菌的最佳浓度。从图4可以看出,虎耳草提取物各浓度组生长曲线的稳定期区段均位于对照组之下,表明虎耳草提取物对大肠杆菌也具有一定的抑制作用,且以0.25 g/ml 为最佳抑菌浓度。

3 讨论

(1) 通过生长曲线的变化揭示药物的抑菌效果,不同于以往直接求MC(最小抑菌浓度)的方法。MC法只能定性判断药物对细菌的作用,却无法揭示药物对细菌群体整个生长增殖周期的影响情况。相反,生长曲线可以反映微生物的群体生长规律。通过生长曲线可以了解微生物对环境的适应程度、微生物对培养基成分的利用情况、药物中不同成分对微生物产生的作用以及药效最强、最弱的时间等。研究表明,0.10 g/ml 虎耳草提取物对葡萄球菌的抑制作用最强,而0.25 g/ml 虎耳草提取物对大肠杆菌的抑制作用最强,并且这种抑制作用必须在菌体进入对数生长期后才显示出来。

(2) 虎耳草提取物加入后,菌体的生长曲线都发生了变化,其中比较普遍的变化是对数生长期提前,尤其是较高浓度组曲线的迟缓期几乎为零。生长曲线迟缓期的长短因菌种、接种菌量、菌龄以及营养物质等不同而异。该试验中迟缓期缩短甚至消失的原因可能是虎耳草提取物中的某些成分不但可作为菌体生长的“营养物质”,而且还可刺激菌体发生应激反应。

(3) 植物提取物中的天然成分种类繁多,活性作用千差万别。有些成分可以作为菌体生长的“营养物质”,刺激菌体发生应激反应,促进细菌生长繁殖;相反,另一些成分可以作为菌体生长的抑制成分,影响菌体正常的生长和增殖。此外,在某些成分作用下菌种会产生钝化酶、菌膜等,进而出现耐药性^[8]。综合研究药用植物成分对菌体生长的作用已成为一个新的研究方向。

参考文献

- [1] 中国植物志编写委员会. 中国植物志 M. 北京: 科学出版社, 1995: 225 - 228.
- [2] 罗厚蔚, 吴葆金, 陈节庵. 虎耳草有效成分研究 J. 中国药科大学学报, 1988, 19(1): 1.
- [3] 丁家欣, 张秋海, 张玲, 等. HPLC 法测定不同产地与采收期虎耳草中岩白菜素的含量 J. 中国中药杂志, 2002, 27(10): 792 - 793.
- [4] 陈娇, 代光辉, 顾振芳, 等. 58 种植物提取液对葡萄霜霉病菌的抑菌活性筛选研究 J. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 9 - 13.
- [5] 林绍生, 陈义增, 饶炯. 虎耳草生长习性及其开发利用 J. 中国中药杂志, 1999, 24(5): 318 - 319.

(上接第944 页)

[6] 薛伟,宋宝安,周霞,等.抗菌植物的研究新进展J].农药,2005,44(6):241-246.

[7] 钮绪燕,吴文君,刘虎奇,等.虎耳草科植物杀菌活性的初步研究J].

西北农业大学学报,1996,5(2):61-65.

[8] 路振香,谢文科.八味中药提取物的体外抑菌试验J].中西医医药杂志,2005(3):37-39.