

酢浆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: 研究酢浆草乙醇提取物的抑菌活性。以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为实验菌株, 通过比较和分析不同酢浆草提取物浓度下细菌生长曲线的变化来研究酢浆草的抑菌作用特点。结果表明, 0.01g /mL 的提取物对摇床培养的金黄色葡萄球菌生长具有明显的抑制作用; 但各种浓度的提取物对摇床培养的大肠杆菌生长均无抑制作用。得到结论, 酢浆草乙醇提取物具有选择性抑菌作用。

关键词: 酢浆草; 乙醇提取物; 生长曲线; 抑菌作用

中图分类号: Q 949.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-009(2007)03-0113-03

酢浆草(*Oxalis corniculata* L.), 又名三叶草、幸运草, 按植物学分类, 它属于酢浆草科酢浆草属多年生宿根草本植物。酢浆草广布于世界各地, 因其具有植株低矮、整齐, 花多叶繁, 花期长, 花色艳, 覆盖地面迅速, 又能抑制杂草生长等诸多优点, 所以很适合在花坛、花径、疏林地及林缘大片种植, 是一种极好的地被和盆栽植物。同时, 酢浆草全草均可入药, 有清热解毒、利尿消肿、散瘀止痛作用, 主治尿路感染、肝炎、跌打损伤、疮节肿痛诸症^[1]。《本草纲目》说它“主小便诸淋, 赤白带下。”但目前, 酢浆草药理方面的相关研究报道很少^[2-4], 开展酢浆草乙醇提取物影响细菌生长曲线的研究, 对于进一步了解药用机理和综合开发利用具有重要意义。

1 试验条件

1.1 试验材料

酢浆草采自湖北省黄冈师范学院生命科学与工程学院植物园。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和大肠杆菌(*E. coli*)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 试验仪器

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、旋转蒸发仪、真空泵(SHZ-II型循环水真空泵)、电子天平、移液枪等。

第一作者简介: 刘世旺, 男, 1965 年生, 医学硕士, 副教授。现从事生物化学和植物资源学方面的教学与科研工作, E-mail: swlsw@hgnu.net。

基金项目: 湖北省教育厅重点科研项目, 编号: 2000A47003; 黄冈师范学院自然科学重点项目, 编号: 06CA23。

收稿日期: 2006-10-11

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。

2 试验方法

2.1 酢浆草水分含量测定及酢浆草乙醇提取物制备

将鲜采的植物全株洗净、晾干、剪碎, 称取 20.00 g, 置于 75℃恒温烘箱中烘 15 h 左右, 使其达到恒重, 再次称重得 3.91g, 所以试验所用的酢浆草材料的含水量为 80.45%。另取 10 kg 酢浆草(折算后干重为 1 955 g)置入 95%酒精中浸泡 30 d, 期间经常搅拌。然后用棉花阻隔过滤, 滤液用旋转蒸发仪蒸发浓缩, 得膏状物 4 147 g。通过烘干和称重得知被乙醇浸泡提取后的酢浆草残渣干重为 1 700 g, 可见酢浆草原材料中有 255 g 成分被提取进入膏状物中, 膏状物的含水量约为 93.8%, 1 g 膏状物相当于 0.47g 干燥酢浆草。膏状物冷藏备用^[5]。

2.2 培养基及试验用品灭菌

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; 将以上两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; 然后于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制成斜面。将所有分装好的培养基及斜面置于 37℃恒温培养箱中做无菌检测试验, 无污染的斜面用于活化菌种、液体培养基用于后述分组试验。

2.3 液体培养基分组

将准备好的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 0.50 g/mL、0.25 g/mL、0.10 g/mL、0.05 g/mL、0.01 g/mL、0 g/mL(空白对照)等 6 个酢浆草提取物浓度梯度, 并按照梯度要求分别称取冷藏备用的酢浆草乙醇提取物 5.0g、2.5g、1.0g、0.5g、0.1g 等分别煮沸并加入到对应试管中。由于每支试管中已有察氏液体培养基 10 mL, 所以提取物加毕即符合上述设计的浓度梯度要求。然后再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。贴上标签, 准备进行 OD₄₂₀ 测定和摇床培养。

2.4 OD₄₂₀ 值的测定和微生物培养

制成上述混合培养液后即进行第一次 OD₄₂₀ 值的测定, 测定后将试管置于 37℃ 恒温培养摇床中培养。之后每间隔 2.5 h 测定并记录 OD₄₂₀ 值一次, OD₄₂₀ 值测定时以未接种且未加入酢浆草提取物的察氏液体培养基作空白。在测定过程中应尽量减少培养液在空气中的暴

露时间, 所用枪头和移液管应在每次吸取液体后进行更换, 试管中的液体在吸取前应适当振荡。每次测定完毕后, 须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, 应进行适当稀释并重新测定, 测定的 OD 值乘以稀释倍数后即为实际的 OD 值^[9]。

2.5 绘制细菌生长曲线

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、时间为横坐标分别绘出生长曲线。

3 结果与讨论

3.1 试验测得的生长曲线

试验测得 A 组的生长曲线见图 1, 测得 B 组的生长曲线见图 2。

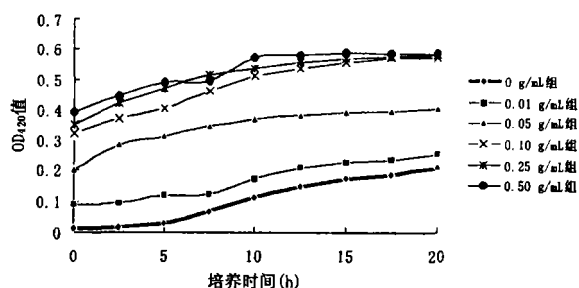


图 1 不同提取物浓度下葡萄球菌的生长曲线

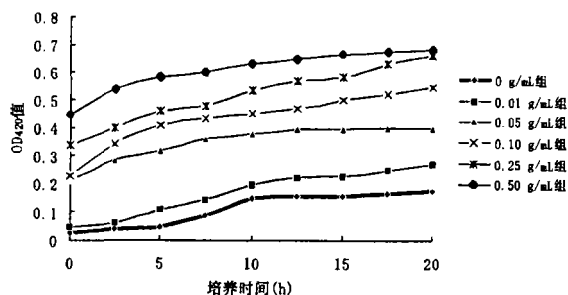


图 2 不同提取物浓度下大肠杆菌的生长曲线

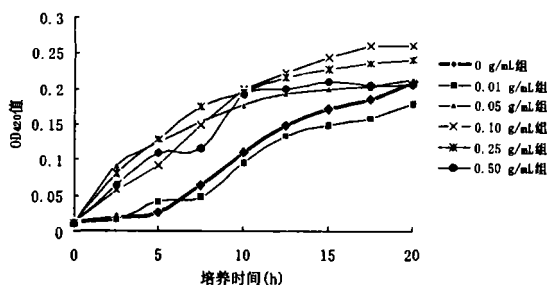


图 3 不同提取物浓度下葡萄球菌生长曲线的比较图

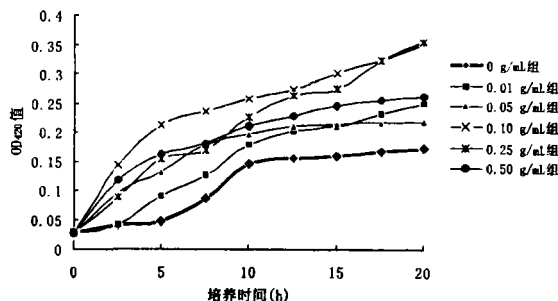


图 4 不同提取物浓度下大肠杆菌生长曲线的比较图

3.2 结果分析

由于酢浆草提取物本身对 OD 值会产生影响, 而每支试管中加入的提取物的量又各不相同, 所以使得图 1 和图 2 中各条曲线的起点高低不同。这样的曲线虽然可以清晰地显示每支试管中培养液 OD 值的变化情况, 但是难以比较不同提取物浓度组的细菌生长曲线。设法剔除提取物对 OD 值的影响, 并使各条曲线处于同一起点上, 将有利于生长曲线的比较和分析。我们发现, 图 1 和图 2 中 0 g/mL 浓度组 0 h 时的 OD 值(图中曲线加粗显示)是培养基和起始菌液二者吸光度的总和, 而其余各浓度组 0 h 时的 OD 值则是培养基、起始菌液和

酢浆草提取物三者吸光度的总和。上述两个总和的差值即可近似地认为是酢浆草提取物的吸光度。将含酢浆草提取物的各浓度组的数据均减去酢浆草提取物本身的 OD 值(即上述差值), 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 组的生长曲线比较图如图 3 和图 4。

从图 3 中可以看到: 酢浆草提取物 0.01g/mL 组生长曲线的对数期和稳定期区段均位于对照组之下, 表明此时葡萄球菌生长受到明显抑制; 但其余 4 个高浓度组则相反, 生长曲线的稳定期区段均位于对照组之上, 表

明此时葡萄球菌生长不但未受到抑制, 反而还受到促进, 其中以 0. 10 g/mL 组的促进作用最强; 同时, 4 个高浓度组的生长曲线对数期均比对照组提前, 表明各试管中葡萄球菌均只需较短的时间就能达到稳定期。

从图 4 中可以看到: 酢浆草提取物各浓度组的生长曲线均位于对照组之上, 表明各试验浓度组中的酢浆草提取物不仅对大肠杆菌生长无抑制作用, 反而还有促进生长的作用, 其中尤以 0. 10g/mL 组的促进作用最强, 其他实验组的浓度值越偏离 0. 10 g/mL, 则其促进作用越弱。

3.3 讨论

利用生长曲线的变化揭示药物的抑菌效果, 不同于以往直接求 MIC(最小抑菌浓度) 的方法。MIC 只能定性的判断药物对细菌有无作用, 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, 生长曲线法则可通过生长曲线反映微生物的群体生长规律, 并从中探知微生物对环境的适应快慢程度、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不同作用以及药效最强和最弱的时间等多种有意义的信息。例如从图 3 中我们可以看出 0. 01 g/mL 的酢浆草提取物对葡萄球菌具有很明显的抑制作用, 但这种抑制作用必须要等到菌体进入对数生长期后才能显现出来。

加入酢浆草提取物后菌体的生长曲线都发生了变化, 其中比较普遍的现象是对数生长期提前, 尤其是 0. 10g/mL 浓度组的曲线, 迟缓期几乎为零, 菌体生长几乎直接进入对数期。生长曲线迟缓期的长短一般可因菌种、接种菌量、菌龄以及营养物质等不同而异, 试验中迟缓期缩短甚至消失的原因可能是酢浆草提取物中的某些成分直接刺激了菌体, 诱发菌体提前进入对数生长状态。

提取物抑制或促进细菌生长的活性与其浓度之间并不呈正比关系, 而是表现成一种最适的峰值浓度, 如 0. 10g/mL 浓度的提取物不管是对葡萄球菌还是对大肠杆菌都表现出最强的促进生长作用, 高于或低于这一浓度时, 其促进作用明显减弱。

综合研究药用植物成分对菌体生长的不同作用是一个新的研究方向。例如, 提取物中有些成分可能会作为菌体生长的“营养物质”被其利用或刺激菌体发生应激反应, 从而促进细菌生长繁殖; 相反, 另一些成分可能作为菌体生长的抑制成分而作用于细菌, 影响菌体正常的生长和增殖; 还有, 所用菌种在某些成分作用下都会产生钝化酶、菌膜等进而出现耐药性^[7]。那么, 以上三种因素的综合作用, 此消彼长, 将使药物作用过程和机理更加复杂, 但同时也给我们提供了广阔的研究思路和研究方向, 生长曲线研究法的引入, 必将吸引更多的学者开展这方面的研究和探讨。

参考文献:

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第二册)[M] . 北京: 科学出版社, 1980: 581-582.
[2] 龙金花. 彩蝶纷飞的三角紫叶酢浆草[J] . 植物杂志, 2000, (2): 48.
[3] 沈思生, 孙灏. 中国酢浆草一新种[J] . 云南植物研究, 2003, 25(1): 39-40.
[4] 李霖, 宋宜颖, 鲁润龙, 等. 紫叶酢浆草的组织培养[J] . 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 360-361.
[5] 段纲, 代飞燕, 朱春贤, 等. 中草药复方提取物的体外抑菌试验[J] . 黑龙江畜牧兽医, 2005, (7): 71.
[6] Thrope TC, Wilson ML, Tumer JE, et al. Back/Alertan automated colorimetric microbial detection system[J] . J Clin Micro, 1990, 28(7): 1608-1610.
[7] 路振香, 谢文科. 八味中药提取物的体外抑菌试验[J] . 中西医结合杂志, 2005(3): 37-39.

Effect of the Ethanol Extract of *Oxalis corniculata* L on the Growth Curve of Bacterium

LIU Shi wang, XU Yan xia, SHI Hong wu

(Life Science and Engineering College, Huanggang Normal University, Huangzhou 438000)

Abstract: Investigated the antimicrobial effect of *Oxalis corniculata* L. . Drew the growth curve of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by determining OD₂₀, and studied the affect according to the change of the growth curve. Results showed that 0. 01g/mL extract of *Oxalis corniculata* L. had obvious antimicrobial effect on *S. aureus*, but all extract of *Oxalis corniculata* L. has not any antimicrobial effect on *E. coli*. The ethanol Extract of *Oxalis corniculata* L. had selective antimicrobial effect.

Key words: *Oxalis corniculata* L. ; Ethanol extract; Growth curve of bacterium; Antimicrobial effect