

茶槲寄生“螃蟹脚”醇提正丁醇萃取相对金黄色葡萄球菌抑菌机理的研究

李娟¹, 薛桥丽², 肖蓉¹, 林奇¹, 徐志强¹, 胡永金¹

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 云南农业大学图书馆, 云南昆明 650201)

摘要: 本文研究了茶槲寄生“螃蟹脚”醇提各萃取相的抑菌作用及正丁醇萃取相 (NVBEs) 对金黄色葡萄球菌的抑菌机理。采用滤纸片扩散法测定抑菌圈直径 (DIZ) 的大小, 对倍稀释法测定最小抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC), 来评价“螃蟹脚”醇提各萃取相对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 4 种食源性腐败菌的抑制性; 通过光学显微镜和扫描电镜观察、胞膜通透性、胞壁完整性和酶活性等实验, 研究了 NVBEs 抑菌机理。结果表明, “螃蟹脚”醇提各萃取相对 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium* 和 *L. monocytogenes* 均有明显抑制效果, 其中 NVBEs 抑菌活性较好, 对 *S. aureus* 抑制效果最好, DIZ 为 9.84 ± 0.57 mm, MIC 为 3.52 mg/mL, MBC 为 7.04 mg/mL。抑菌机理结果表明: NVBEs 可增加 *S. aureus* 细胞壁及细胞膜的通透性, 破坏菌体细胞结构, 引起细胞内含物如核酸和蛋白质等外泄; 引起遗传物质 DNA 的改变, 使菌体细胞形态结构出现异常; 影响菌体酶的代谢活动, 从而抑制细菌的生长。

关键词: 茶槲寄生; 螃蟹脚; 正丁醇相; 金黄色葡萄球菌; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2017)9-28-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.005

Antimicrobial Mechanisms of the n-Butanol Phase from Tea Mistletoe *Viscum articulatum* Burm.F. Ethanol Extracts Against *Staphylococcus aureus*

LI Juan¹, XUE Qiao-li², XIAO Rong¹, LIN Qi¹, XU Zhi-qiang¹, HU Yong-jin¹

(1. Collage of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. Library, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The antibacterial activity of each phase from tea mistletoe *Viscum articulatum* Burm.F. ethanol extracts and the antibacterial mechanism of the n-butanol phase from *V. articulatum* Burm.F. ethanol extracts (NVBEs) against *Staphylococcus aureus* were studied. The antibacterial activities of each phase from *V. articulatum* Burm.F. ethanol extracts against food spoilage and pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*, were determined by measuring the diameter of inhibition zone (DIZ) using the disc diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC), and the minimum bactericidal concentration (MBC), as measured using a doubling dilution series. Furthermore, the antibacterial mechanism of NVBEs was explored using light microscopy, scanning electron microscopy, cell membrane permeability and integrity analysis, and enzyme activity assays. The results showed that each phase from *V. articulatum* Burm.F. ethanol extracts had significant antagonistic activity against four food-spoilage and pathogenic bacteria. Moreover, NVBEs showed relatively strong antibacterial activity, and the strongest antibacterial effect was observed for *Staphylococcus aureus*. The DIZ, MIC, and MBC values were 9.84 ± 0.57 mm, 3.52 mg/mL, and 7.04 mg/mL, respectively. The results showed that the NVBEs increased the permeability of the bacterial cell wall and membrane, destroyed the bacterial cell structure, and caused leakage of cellular contents, such as nucleic acids and proteins. The genetic material was altered, the cell morphology appeared to be abnormal, and the enzyme metabolic activity was affected, thus inhibiting bacterial growth.

Key words: tea mistletoe; *Viscum articulatum* Burm.F.; n-butanol phases; *Staphylococcus aureus*; antibacterial mechanisms

收稿日期: 2017-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260404)

作者简介: 李娟 (1991-), 女, 硕士, 主要从事食品质量及安全性研究

通讯作者: 胡永金 (1972-), 男, 博士, 教授, 硕导, 主要从事功能性食品与生物技术研究

茶藨寄生 (Tea Mistletoe) 系桑寄生科、藨寄生属植物, 多年生草本, 兼性半寄生、茎寄生, 形状像小珊瑚, 寄生枝杆节状带毫, 故民间常称之为“螃蟹脚”(Viscum articulatum Burm.f.)^[1,2]。在云南主要分布在丽江、迪庆、怒江、普洱、西双版纳和禄劝等地^[3]。《中华人民共和国药典》记载, 藨寄生 *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai 作为我国传统中药, 以干燥的带叶茎枝入药, 有祛风除湿、补肾安胎和强筋壮骨等功效。现代医学研究还表明, 藨寄生具有降压、护心及抗肿瘤等作用。“螃蟹脚”作为藨寄生属植物, 与藨寄生具有同等功效^[4]。曹朵^[5]对藨寄生属植物的化学成分及药理活性功能进行了研究, 其成分主要为黄酮类、三萜类和苯丙类等化合物, 并具有抗氧化、抗衰老和提高免疫力等功效。Yusuf^[6]等以寄生在咖啡树上的藨寄生植物为材料, 研究表明 60% 甲醇提取物对曲霉菌、尖孢镰刀菌和小孢子菌有抑菌性, Geetha^[7]等发现藨寄生属植物具有抗氧化活性, 可清除自由基, 延缓脂质氧化的功效。Kang^[8]等研究发现藨寄生乙醇提取物可有效延长冷冻储存猪肉的货架期, 抑制腐败菌的生长。张兴梅^[9]等研究了扁枝藨寄生 95% 乙醇粗提物的抑菌性, 结果表明“螃蟹脚”中存在抑制食源性腐败菌的活性成分。因此, 本文以云南普洱地区寄生在古茶树上的植物-“螃蟹脚”为材料, 95% 乙醇为提取剂, 并用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇极性由小到大有机溶剂依次进行萃取, 使抑菌活性成分得到进一步纯化, 并将“螃蟹脚”醇提各萃取相作用于 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium* 和 *L. monocytogenes* 4 种常见的食源性腐败菌, 以抑菌圈直径 (DIZ)、最小抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC) 为活性指标, 探明“螃蟹脚”醇提抑菌最优萃取相, 并以 *S. aureus* 为指示菌, 初步探究茶藨寄生“螃蟹脚”活性成分的抑菌机制, 为进一步分离、纯化“螃蟹脚”抑菌主体功效成分及其作用机理的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

茶藨寄生“螃蟹脚”样品: 采自云南普洱古茶树上。

供试细菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC(B)26003)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC25922)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC19114)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* CMCC(B)50115) 均由云南农业大学微生物实验室提供。

培养基: 营养琼脂 (NA)、营养肉汤 (NB)、PCA 平板计数琼脂培养基、Baird-Parker 琼脂基础培养基、结晶紫中性红胆盐琼脂 (VRBA)、HE 琼脂培养基、PALCAM 琼脂培养基, 均购于广州环凯微生物科技有限公司。

试剂: 无水乙醇、乙酸乙酯、正丁醇等均属于分析纯, 购自天津市风船化学试剂科技有限公司; 碱性磷酸酶试剂盒, 南京建成生物研究所。

1.1.2 仪器

SHP 型生化培养箱, 北京中兴伟业有限公司; HX121-0054 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海华线医疗设备厂; SW-CJ-2D 型无菌操作工作台, 苏州净化; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化有限公司; 分光光度计, 上海精密仪器有限公司; Nikon eclipse 50i 光学显微镜, 上海衡浩仪器有限公司; S-3000N 扫描电镜, 日本, 日立公司。

1.2 试验方法

1.2.1 “螃蟹脚”醇提不同溶剂萃取相物质的制备^[10]

“螃蟹脚”样品经烘箱 40 °C 干燥 72 h 至恒重, 植物粉碎机粉碎成粉, 过 80 目筛备用。

精确称取 500 g 粉末, 按料液比 1:10 的比例, 加入 95% 乙醇于室温下浸泡 12 h, 室温冷浸提 3 次, 过滤收集合并 3 次冷浸提液, 经布氏漏斗抽滤 4 次除去滤渣; 抽滤后的滤液用旋转蒸发器 40 °C 旋转蒸发浓缩成浸膏, 冷冻干燥后保藏于 4 °C 冰箱备用。

精确称取醇提物 200 g, 按固液比 1:2 的比例加入 UP 水混合; 再按 1:2 的比例, 极性由小到大的顺序加入石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇有机溶剂萃取分层, 每种极性溶剂萃取 2 次, 合并相同极性萃取液, 经旋转蒸发器浓缩、冷冻干燥后保藏于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 受试细菌的活化、纯化及菌悬液的制备^[10]

细菌的活化、纯化: 从保藏的试管斜面上挑取 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium*、*L. monocytogenes*, 分别转接到 100 mL NB 培养基中, 37 °C、120 r/min 在恒温摇床中扩增培养 24 h 后, 以无菌生理盐水分别进行 10 倍梯度的菌液稀释, 吸取适当稀释梯度 (10^{-5} 或 10^{-6}) 的菌液 200 μ L 均匀涂布于选择性培养基

(Baird-Parker 琼脂基础培养基、VRBA 培养基、HE 琼脂培养基、PALCAM 琼脂培养基) 平板上, 倒扣平板于 37 °C 培养 24 h, 用接种环挑取相应细菌的单菌落, 分别划线于选择性试管斜面培养基上, 37 °C 培养 24 h, 取出后置于 4 °C 冰箱保存备用。

菌悬液的制备：用接种环从上述纯化好的试管斜面上，分别挑取适量的受试细菌，转接到 100 mL NB 培养基中，37 °C、120 r/min 在恒温摇床中扩增培养至对数期，用无菌生理盐水分别进行菌液稀释，吸取适当稀释梯度（ 10^{-3} 或 10^{-4} ）的菌液 200 μ L 均匀涂布于 PCA 培养基上，37 °C 培养 24 h 后观察平板，要求在此稀释梯度（约为 10^6 CFU/mL）下，200 μ L 的稀释菌液可以均匀铺满直径为 90 mm 的培养皿，选择各自适宜的稀释菌液进行下一步实验。

1.2.3 抑菌圈直径（DIZ, diameter of inhibition zone）的测定

采用滤纸片扩散法测定 DIZ 大小^[11,12]。向培养皿（90 mm）中倒入 20 mL 已灭菌的 NA 培养基，待其凝固后，加入 200 μ L 菌液（浓度为 10^5 CFU/mL 左右），均匀涂布，静置 15 min。将灭菌、加药后直径为 6 mm 的滤纸片，置于培养基表面并静置 5 min，37 °C 培养 24 h 后，用游标卡尺十字交叉法，测量抑菌圈直径大小，以无菌水作为对照。

1.2.4 最小抑菌浓度（Minimal inhibition concentration, MIC）和最低杀菌浓度（Minimal bactericidal concentration, MBC）的测定

采用对倍稀释法^[13,14]将 NVBEs 稀释为不同浓度的药液，吸取各浓度药液 1 mL，分别加入到无菌平板中，再加入 19 mL 经高压灭菌、冷却到 50 °C 左右的 PCA 培养基，两者充分混合均匀，待培养基冷凝后，吸取 200 μ L 适宜浓度的受试菌液均匀涂布，以无菌水作为对照。37 °C 培养 24 h，无细菌生长的培养皿即为最小抑菌浓度的培养基，此皿的药物浓度即为 MIC 值。将无细菌生长的平皿，37 °C、24 h 进行二次培养，仍无细菌生长的平皿，其加药浓度为最低杀菌浓度，即为 MBC 值。

1.2.5 NVBEs 对 *S. aureus* 生长动力学的影响^[15]

按 1% 接种量（每 mL 稀释菌液中含菌体 10^7 CFU）将培养至对数期的 *S. aureus*，分别接种到加入 0 MIC（加入无菌水）、1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs 的 NB 培养基中，37 °C、120 r/min 恒温摇床培养 48 h，在 0 h~48 h 中每 2 h 取样一次，用紫外可见分光光度计于 $\lambda=580$ nm 下测定其 OD 值，以取样时间为 X 轴，OD_{580nm} 为 Y 轴绘制生长曲线。

1.2.6 NVBEs 对 *S. aureus* 培养液中蛋白质含量的影响

按 1% 接种量（每 mL 稀释菌液中含菌体 10^7 CFU）将培养至对数期的 *S. aureus*，分别接种到加入 0 MIC

（加入无菌水）、1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs 的 NB 培养基中，37 °C、120 r/min 恒温摇床培养 24 h，每 2 h 取样一次，3500 r/min 离心 10 min，取上清液用考马斯亮蓝法^[16,17]，测定培养液中蛋白质的含量，以取样时间为 X 轴，蛋白质含量为 Y 轴绘图。

1.2.7 NVBEs 对 *S. aureus* 细胞壁完整性的影响

按 1% 接种量（每 mL 稀释菌液中含菌体 10^7 CFU 个）将培养至对数期的 *S. aureus*，分别接种到加入 0 MIC（加入无菌水）、1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs 的 NB 培养基中，37 °C、120 r/min 恒温摇床培养，定时取样，3500 r/min 离心 10 min，取上清液用碱性磷酸酶试剂盒方法，测定碱性磷酸酶（AKP）含量的变化情况，以取样时间为 X 轴，AKP 含量为 Y 轴绘图。

1.2.8 NVBEs 对 *S. aureus* 培养液中 DNA 和 RNA 等大分子含量的影响

参考卢晓^[15]等方法，略有改动；按 1% 接种量（每 mL 稀释菌液中含菌体 10^7 CFU）将培养至对数期的 *S. aureus*，分别接种到加入 0 MIC（加入无菌水）、1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs 的 NB 培养基中，37 °C、120 r/min 恒温摇床培养，每 2 h 取样一次，3500 r/min 离心 10 min，用紫外分光光度计于 $\lambda=260$ nm 下测定上清液中 DNA、RNA 等大分子物质的吸光值，以取样时间为 X 轴，吸光值（OD_{260nm}）为 Y 轴绘图。

1.2.9 NVBEs 对 *S. aureus* 抑制作用的形态学观察

1.2.9.1 光学显微镜（LM）观察

S. aureus 经 NB 培养基，37 °C、120 r/min 培养 18 h 至对数期，以无菌生理盐水稀释菌液，吸取适当稀释梯度（ 10^{-5} 或 10^{-6} ）的菌液 200 μ L 均匀涂布于 PCA 培养基平板上，37 °C 培养 24 h 后，往培养皿内注入 1 MIC NVBEs 药液 2 mL，以正常未处理作为对照，37 °C 下继续培养 8 h 后，分别挑取加药组、空白组的单菌落，进行革兰氏染色、镜检。用 LM 镜观察细胞形态，并拍照。

1.2.9.2 扫描电镜（STM）观察^[18,19]

S. aureus 经 NB 培养基，37 °C、120 r/min 培养 18 h 至对数期。取 10 mL 菌液加入 NVBEs，使其终浓度为 1 MIC NVBEs，37 °C 处理 4 h 后，4500 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀，0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液洗涤三次，再使用 3.5%（V/V）戊二醛（电镜级）于室温下固定 12 h，1%（V/V）锇酸 4 °C 浸泡过夜进行二次固定，冲洗并用乙醇梯度脱水，涂到金属箔片上，真空干燥固定、喷金，扫描电镜下观察并拍摄菌体细

胞形态, 以未处理的菌体细胞作为对照。

1.3 数据统计与分析

数据以平均值(mean)±标准差(SD)表示。用 Origin 8.0 软件作图和 SPSS 19.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 “螃蟹脚”不同溶剂萃取相对细菌的抑制作用

“螃蟹脚”95%乙醇粗提物与各溶剂萃取相对 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium* 和 *L. monocytogenes* 的抑制作用, 其 DIZ 如表 1 所示。各萃取相作用于 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium* 和 *L. monocytogenes* 的 MIC、MBC 结果如表 2 所示。正丁醇萃取相作用于 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium* 和 *L. monocytogenes*, 其 DIZ 如图 1 所示。

从表 1 中可以看出, “螃蟹脚”95%乙醇粗提取物,

表 1 “螃蟹脚”各萃取相对 4 种受试菌的抑制效果

Table 1. Antibacterial effects of each phase from *Viscum articulatum* Burm.F. ethanol extracts against four bacteria

受试菌	DIZ/mm					
	粗提物	石油醚相	氯仿相	乙酸乙酯相	正丁醇相	水相
<i>S. aureus</i>	8.32±0.74 ^{Ba}	6.37±0.32 ^{Ca}	6.31±0.23 ^{Ca}	9.48±0.72 ^{Aa}	9.84±0.57 ^{Aa}	6.36±0.21 ^{Ca}
<i>E. coli</i>	7.74±0.97 ^{Ca}	6.32±0.27 ^{Da}	6.25±0.16 ^{Da}	8.68±0.62 ^{Bb}	8.98±0.67 ^{Ab}	6.28±0.22 ^{Da}
<i>S. typhimurium</i>	8.02±0.55 ^{Ba}	6.29±0.23 ^{Ca}	6.32±0.22 ^{Ca}	8.98±0.49 ^{Aab}	9.35±0.62 ^{Aab}	6.38±0.23 ^{Ca}
<i>L. monocytogenes</i>	6.78±0.47 ^{Bb}	6.14±0.12 ^{Ca}	6.19±0.11 ^{Ca}	7.35±0.62 ^{ABc}	7.52±0.32 ^{Ac}	6.21±0.15 ^{Ca}

注: 表 1 中, 测定抑菌圈直径的加药浓度均为 0.45 g/mL。用不同的大写字母(A~D)表示同一行中的显著差异($p<0.05$); 用不同的小写字母(a~c)表示同一列中的显著差异($p<0.05$)。

表 2 各萃取相对 4 种细菌的 MIC 和 MBC 测定结果

Table 2. MICs and MBCs of each phase from *Viscum articulatum* Burm.F. ethanol extracts against four bacteria

各萃取相	浓度/(mg/mL)	受试细菌			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
石油醚相	MIC	>25	>25	>25	>25
	MBC	>50	>50	>50	>50
氯仿相	MIC	>25	>25	>25	>25
	MBC	>50	>50	>50	>50
乙酸乙酯相	MIC	3.93	6.75	5.68	13.7
	MBC	7.86	13.5	11.36	27.3
正丁醇相	MIC	3.52	6.25	4.29	12.5
	MBC	7.04	12.5	8.58	25
水相	MIC	>50	>50	>50	>50
	MBC	>100	>100	>100	>100

经不同极性有机溶剂萃取分层后, 抑菌活性成分得到分离, 主要存在于乙酸乙酯、正丁醇两萃取相中, 且对 *S. aureus* 抑制作用最好, DIZ 分别为 9.48±0.72 mm 和 9.84±0.57 mm, 而石油醚相、氯仿相、剩余水相几乎不含抑菌活性成分, 其中 4 种腐败菌的 DIZ 均小于 6.5 mm。DIZ (抑菌圈直径) 可以较为直观的区别物质抗菌能力的大小, DIZ 直径越大, 则抗菌效果越强。

从图 1 中可以看出, NVBEs 相对 4 种受试菌均有一定的抑制作用, 其中 *S. aureus*>*S. typhimurium*>*E. coli*>*L. monocytogenes*。表 2 研究各有机溶剂萃取相对 4 种常见食源性腐败菌的 MIC、MBC, 试验结果表明“螃蟹脚”抑菌活性成分主要存在于乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相中, 且 NVBEs 的抑菌性略好于乙酸乙酯相, 这与表 1 中试验结果一致。其中 *S. aureus* 的 MIC、MBC 为 3.52 mg/mL 和 7.04 mg/mL, 均小于其余 3 种菌。据上述试验结果, 将 *S. aureus* 作为后续分离、纯化茶藨寄生“螃蟹脚”抑菌主体功效成分的受试菌, 并以醇提正丁醇萃取相 (NVBEs) 为材料, 初步探究其抑菌机理。

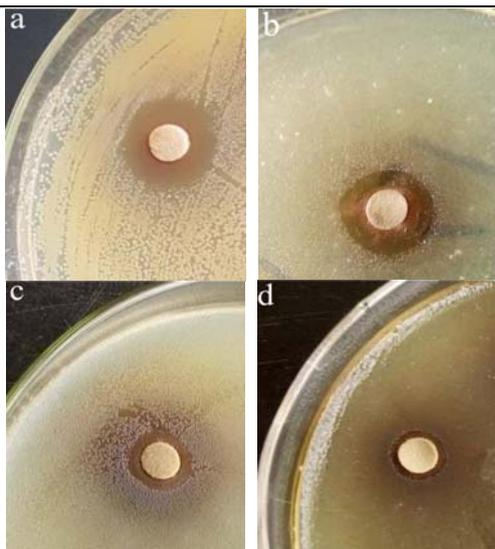


图1 NVBEs对4种受试菌的抑菌效果

Fig. 1. Antibacterial activity of NVBEs against four bacteria

注：图1中图片放大倍数为1.4倍。a, *S. aureus*; b, *S. typhimurium*; c, *E. coli*; d, *L. monocytogenes*。

2.2 NVBEs对*S. aureus*生长动力学的影响

菌悬液的光密度(OD值)可用来衡量菌液中细菌数目的多少,因此,OD值的变化间接反应“螃蟹脚”醇提正丁醇萃取相(NVBEs)对*S. aureus*生长情况的影响。以正常未加药(0 MIC NVBEs、加入无菌水)*S. aureus*生长曲线为空白对照,测定加入不同浓度NVBEs后,*S. aureus*生长曲线变化情况,通过加入培养液中药物量(1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs)的不同,研究NVBEs对*S. aureus*菌体细胞生长的抑制作用能力大小,试验结果如图2所示。

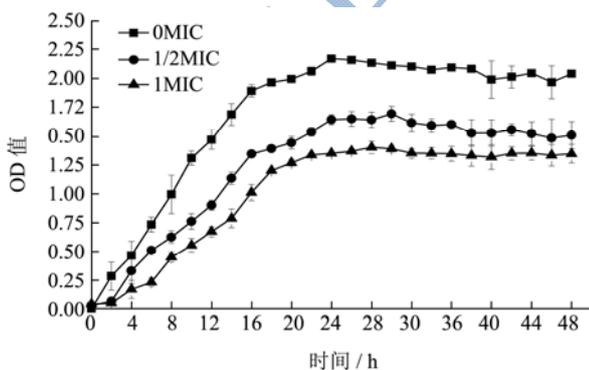


图2 NVBEs对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

Fig. 2. Effects of NVBEs on the growth of *S. aureus*

从图2中可以看出,空白组(0 MIC NVBEs、加入无菌水)呈现细菌典型的生长曲线,4 h起菌体进入生长对数期,18~24 h达到生长高峰期,26 h~40 h进入生长稳定期,40 h后进入菌体凋亡期;而加药组(1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs)中,*S. aureus*的整个生长阶段明显受到抑制;与0 MIC组相比,当药物处理

24 h, 1/2 MIC 加药组 OD_{580nm} 降低了 23.43%, 1 MIC 加药组 OD_{580nm} 降低了 38.03%; 且相同时间点,加药组 OD_{580nm} 均低于 0 MIC 组 ($p < 0.05$),加药组中菌体没有达到 0 MIC 组中正常的生长峰值,便趋于稳定,进入生长衰亡期。因此, NVBEs 可抑制 *S. aureus* 的正常生长, 1 倍 MIC (3.52 mg/mL) 加药组抑制作用强于 1/2 MIC 倍的加药组,由上述可得, NVBEs 对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 正常生长有抑制作用,且抑制效果与其加药浓度呈正相关关系。

2.3 NVBEs对*S. aureus*培养液中蛋白质含量的影响

菌体正常生长情况下,培养液中蛋白含量保持稳定,当菌体细胞结构受到破坏后,细胞壁膜透性增加,胞内含物如蛋白质会外泄漏到培养液中,使培养液中蛋白含量增加^[9]。以正常未加药(0 MIC NVBEs、加入无菌水)*S. aureus*培养液中蛋白含量变化为空白对照,测定加入不同浓度 NVBEs 后,*S. aureus*培养液中蛋白含量的变化情况,同时利用加入培养液中药物量(1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs)的不同,研究 NVBEs 对 *S. aureus* 菌体细胞壁膜损坏程度的大小,试验结果如图3所示。

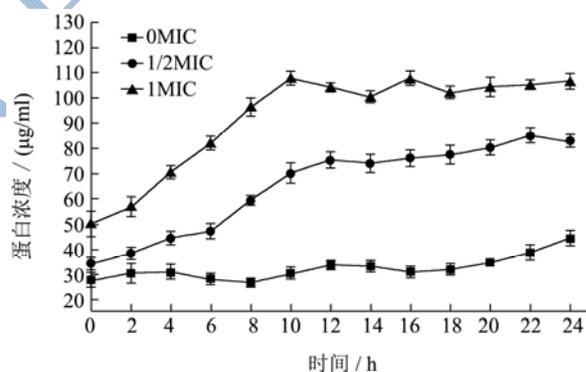


图3 NVBEs对胞外蛋白质量浓度的影响

Fig. 3. Effects of NVBEs on extracellular protein content

从图3可以看出,随培养时间延长,空白组(0 MIC NVBEs、加入无菌水)蛋白含量变化较为平缓,而加药组(1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs)培养液中蛋白质含量逐渐增加且一直高于 0 MIC 组 ($p < 0.05$)。当药物处理 10 h, 1 MIC 加药组的胞外蛋白含量为 106.18 μg/mL,比 1/2 MIC 加药组高出 1.6 倍($p < 0.05$),比 0 MIC 组高出 3.7 倍 ($p < 0.05$)。原因可能是经 NVBEs 加药处理后,*S. aureus* 在生长过程中不仅对蛋白质的利用能力降低,而且菌体细胞壁膜结构受到损坏,细胞壁膜通透性增加、细胞内含物蛋白质大分子外泄到培养液中,使培养液中蛋白含量增加。

从图 3 中也可以看出, 随菌体培养时间的延长, 1 MIC 处理组胞外蛋白浓度的增加速度明显高于 1/2 MIC 处理组 ($p < 0.05$), 由上述可得, NVBEs 对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 细胞壁膜结构有破坏作用, 且损害程度与加药浓度呈正相关关系。

2.4 NVBEs 对 *S. aureus* 细胞壁完整性的影响

碱性磷酸酶 (AKP) 是存在于细胞壁与细胞膜之间的一种酶, 正常情况下在细胞外不能检测到其活性。但当细胞壁遭到破坏后, 胞壁透性增加, 将 AKP 泄漏到细胞外, 通过检测胞外 AKP 含量的变化可反映出细胞壁的破坏情况^[20,21]。以正常未加药 (0 MIC NVBEs、加入无菌水) *S. aureus* 胞外菌悬液中 AKP 含量变化为空白对照, 测定加入不同浓度 NVBEs 后, *S. aureus* 胞外菌悬液中 AKP 含量的变化情况, 同时利用加入培养液中药物量 (1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs) 的不同, 研究 NVBEs 对 *S. aureus* 菌体胞壁的损坏程度大小, 试验结果如图 4 所示。

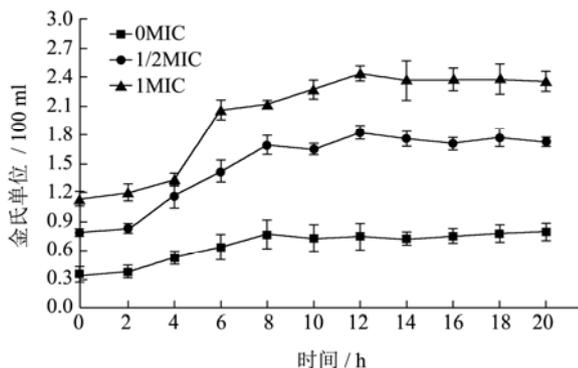


图 4 NVBEs 对胞外碱性磷酸酶含量的影响

Fig. 4. Effects of NVBEs on extracellular AKP content

从图 4 中可以看出, 0~2 h, 加药组 (1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs) 培养液中 AKP 含量的变化情况与空白组 (0 MIC NVBEs、加入无菌水) 相近; 2 h 后, 加药组中 AKP 含量逐渐增加, 12 h 到达最高点, 此时 1 MIC 加药组胞外菌悬液中 AKP 含量为 2.44 金氏单位/100 mL, 比 1/2 MIC 加药组高出 1.35 倍 ($p < 0.05$), 比 0 MIC 组高出 3.27 倍 ($p < 0.05$); 12 h 后 AKP 含量趋于稳定, 或许是加药浓度已不能对菌体起到大的破坏性, 但加药组培养液中 AKP 的含量一直高于 0 MIC 组 ($p < 0.05$), 由上述可得, NVBEs 可破坏金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 细胞壁的完整性, 造成菌体细胞壁通透性增加, 从而在 *S. aureus* 培养液中检测到 AKP 酶活性, 且随着药物浓度的增加对细胞壁的破坏性增大。

2.5 NVBEs 对 *S. aureus* 培养液中 DNA 和

RNA 等大分子含量的影响

菌体细胞正常生长情况下, 培养液中 DNA 和 RNA 等大分子含量保持稳定, 当细胞膜结构受到破坏后, 细胞内 DNA 和 RNA 等大分子物质会外泄漏到菌悬液中, 因 DNA 和 RNA 等大分子物质在 $\lambda = 260 \text{ nm}$ 处有较强的吸收值, 所以通过测定 OD_{260 nm} 的变化可推测 VBNEs 对菌体细胞膜完整性的影响情况。以正常未加药 (0 MIC NVBEs、加入无菌水) *S. aureus* 培养液中 OD_{260 nm} 为空白对照, 测定加入不同浓度 VBNEs 后, *S. aureus* 培养液中 OD_{260 nm} 的变化情况, 同时利用加入培养液中药物量 (1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs) 的不同, 研究 NVBEs 对 *S. aureus* 菌体细胞膜完整性的影响情况大小, 试验结果如图 5 所示。

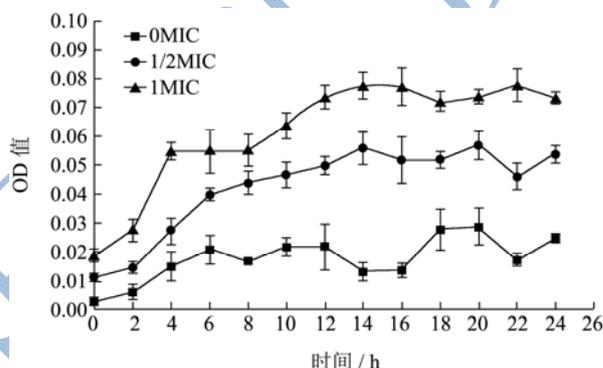


图 5 NVBEs 对金黄色葡萄球菌的大分子物质吸光值的变化

Fig. 5. Changes in the ODs of large molecules in *S. aureus* in response to NVBE treatment

从图 5 中可以看出, 随菌体培养时间的延长, 培养液中 DNA 和 RNA 等大分子物质的吸光值均呈增加趋势, 且加药 (1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs) 组的 OD_{260 nm} 均高于空白 (0 MIC NVBEs、加入无菌水) 组 ($p < 0.05$)。当药物作用 14 h, 1 MIC 的加药组培养液中吸光值达到最大, 比 1/2 MIC 加药组高出 1.4 倍, 比 0 MIC 组高出 6.7 倍 ($p < 0.05$)。由上述可得, NVBEs 可破坏金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 细胞壁膜结构的完整性, 导致 *S. aureus* 菌体细胞内 DNA 和 RNA 等大分子物质发生泄漏。但从图 5 中 OD_{260 nm} 的增加程度来看, DNA 和 RNA 等大分子物质外渗量的增加趋势较平缓; 或许 NVBEs 影响菌体细胞的遗传物质 DNA, 导致细胞形态发生异常, 故下述试验从形态学方面观察菌体细胞, 探究 NVBEs 对 *S. aureus* 细胞形态结构的影响情况。

2.6 NVBEs 对 *S. aureus* 光学显微镜(LM)的观

察结果

革兰氏染色过程中,脱色剂(95%乙醇)作为脂溶剂,破坏 G^- (革兰氏阴性菌)的外膜、肽聚糖层和细胞质膜,使得易溶于乙醇的结晶紫和碘的复合物从细胞壁中渗漏出来,当再用番红复染时,菌体显现红色;对于 G^+ (革兰氏阳性菌),95%乙醇使厚的肽聚糖层脱水,致孔隙变小,由于结晶紫和碘的复合物分子较大,不能透过细胞壁,即使番红复染,仍显紫色现象。*S. aureus*属于 G^+ ,菌体经革兰氏染色正常情况下呈现紫色,但如果菌体细胞受到损坏,染色镜检会观察到,细胞呈现不规则的形状或浅紫色、红色现象^[22]。为观察NVBEs对*S. aureus*形态学结构的影响,将正常的菌体细胞(图6a,未加入NVBEs)与加药处理的菌体细胞(图6b、c和d,加入1 MIC NVBEs)分别进行革兰氏染色,用LM进行观察,试验结果如图6所示。

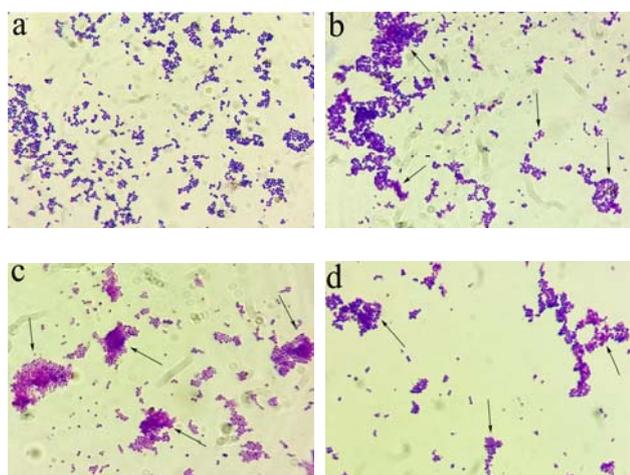


图6 不同处理下金黄色葡萄球菌的革兰氏染色

Fig. 6. Gram staining of *S. aureus* cells treated with or without NVBEs

注:图中照片均放大1000倍,黑色箭头为形态异常的*S. aureus*菌体细胞。

从图6中可以看出,空白组的*S. aureus*经革兰氏染色后,菌体细胞呈现完整、正常的球状,且排列紧密,呈均匀的紫色(图6a);而加药组中菌体细胞排列疏松、呈现出浅紫色、红色两种颜色,有的菌体细胞出现变形、破损,没有呈现正常的球状(图6b、c和d)。原因可能是经NVBEs加药处理后,菌体细胞外膜、肽聚糖层及细胞质膜发生损坏,导致细胞壁膜通透性发生变化,使结晶紫和碘的复合物从细胞壁中渗漏出来,再用番红复染时显现红色,使*S. aureus*经革兰氏染色后呈现假阴性。由上述可得,NVBEs可破坏金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)细胞壁膜结构的完整性。

2.7 NVBEs对*S. aureus*扫描电镜(SEM)的观察结果

观察结果

扫描电镜(SEM)可使菌体细胞放大上万倍,故通过SEM可更清晰的观察菌体细胞的结构变化,正常的*S. aureus*菌体细胞(图7a,未加入NVBEs)与加药处理的菌体细胞(图7b、c和d,加入1 MIC NVBEs),SEM观察结果如图7所示。

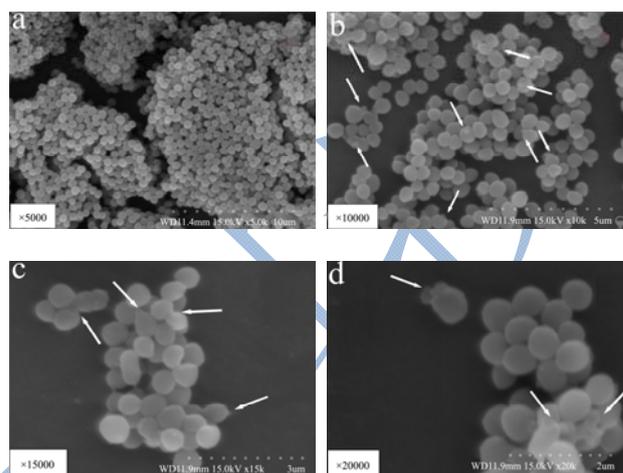


图7 金黄色葡萄球菌扫描电镜观察

Fig. 7. Scanning electron microscopy images of *S. aureus*

注:白色箭头为形态异常的*S. aureus*菌体细胞;图中左下角为图片放大倍数。

从图7中可以看出,在扫描电镜下,空白组的*S. aureus*细胞排列紧密且大小一致,呈现典型的葡萄球状(图7a),经NVBEs处理过的菌体细胞形态发生改变,细胞结构发生不同程度的破坏(图7b、c和d)。空白组菌体细胞紧密簇状排列(图7a),而处理组中*S. aureus*细胞形态不均一,有较小的细胞出现;进一步观察,空白组*S. aureus*菌体细胞排列紧密形状一致,细胞结构完整、无内容物溢出,未见任何细胞残体及碎片(图7a),而处理组菌体细胞排列松散,部分细胞出现收缩、凹陷或破损,细胞壁膜界限不清晰,有些菌体细胞出现内容物泄漏、呈空洞状,可观察到大量细胞残体和碎片(图7b、c和d),从图7b中可观察到,*S. aureus*细胞上出现小突起,或许是药物处理作用,使遗传物质DNA发生改变,而使菌体细胞出现异常形态。SEM观察结果表明NVBEs对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)细胞结构有较强的破坏作用。

3 讨论

3.1 在测定菌体生长曲线时,我们发现加药组*S. aureus*的整个生长阶段均受到抑制,相同时间点 OD_{580nm} 均低于空白组($p < 0.05$),且没达到空白组(0 MIC NVBEs)正常的生长高峰期,便趋于稳定;利用

加药量(1/2 MIC NVBEs、1 MIC NVBEs)的不同,我们得出 NVBEs 对 *S. aureus* 菌体细胞生长的抑制作用与加药浓度呈正相关关系。随加药处理时间的延长,培养液中蛋白含量增加, AKP 酶活性加大, DNA 和 RNA 等大分子的 OD_{260nm} 也增大,由此我们判定茶槲寄生“螃蟹脚”抑菌活性最优萃取相-NVBEs,通过破坏菌体细胞壁膜结构,致通透性增加,细胞内含物外渗,来抑制 *S. aureus* 的正常生长。钱丽红等^[23]研究茶多酚是通过破坏细胞膜结构、致透性增加、胞内容物外泄,来抑制金黄色葡萄球菌的生长,与本文对 *S. aureus* 抑制机理的研究结果相似,因“螃蟹脚”为茶树寄生植物,与普洱茶抑菌活性成分及抑制机理是否一致,需进一步深入探究。

3.2 进一步利用光学显微镜(LM)、扫描电镜(SEM)从细胞形态学方面进行研究,经 1 MIC NVBEs 处理后,镜检观察到 *S. aureus* 细胞形态异常,革兰氏染色呈浅紫色、红色两种颜色,出现假阴性反应,这或许是由于药物处理的原因,破坏了菌体细胞的外膜、肽聚糖层及细胞质膜结构,使结晶紫和碘的复合物外渗,番红复染而显红色^[22];从 SEM 中观察到, *S. aureus* 细胞出现收缩、凹陷及破损,壁膜界限不清晰,内容物泄漏等现象^[24],菌体细胞上出现小突起,或许 NVBEs 引起遗传物质 DNA 的改变,使细胞形态出现异常,这是“螃蟹脚”抑菌机制的首次发现,但如何影响遗传物质 DNA,需深入探究其抑菌机理。

4 结论

本文以云南普洱地区古茶树上寄生植物-“螃蟹脚”为材料,利用不同极性有机溶剂石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇对 95%乙醇粗提物依次进行萃取分层后,发现“螃蟹脚”抑菌活性成分主要存在于乙酸乙酯、正丁醇两萃取相中,且正丁醇相抑菌活性较好,对 *S. aureus*、*E. coli*、*S. typhimurium*、*L. monocytogenes* 均有抑制作用,其中 *S. aureus* 敏感性最好, DIZ 为 9.84±0.57 mm, MIC 为 3.52 mg/mL, MBC 为 7.04 mg/mL。故选取抑菌活性最优萃取相-正丁醇相(NVBEs),以敏感菌 *S. aureus* (金黄色葡萄球菌)为受试菌,探究茶槲寄生“螃蟹脚”抑菌活性成分作用机制,结果表明 NVBEs 可影响菌体细胞内酶的代谢活动,破坏细胞壁膜系统,使 *S. aureus* 细胞壁膜通透性增大,致内含物如蛋白质、DNA、RNA 大分子物质外渗,从而抑制菌体的正常生长^[25]。通过 SEM 观察,首次发现“螃蟹脚”抑菌成分可使 *S. aureus* 细胞形态结构出现异常,需进一步探究是否由遗传物质 DNA 发生改变所引起的。本文研究结果为进一步分离、纯

化茶槲寄生“螃蟹脚”抑菌主体功效成分提供理论依据,也为将其开发成植物源食品防腐剂提供了参考。

参考文献

- [1] 倪婷婷,李璐,赵明,等.茶槲寄生“螃蟹脚”中黄酮醇及黄烷醇类化合物的分析[J].天然产物研究与开发,2013,25(4): 484-488
NI Ting-ting, LI Lu, ZHAO Ming, et al. Analysis of flavonols and flavanols in tea mistletoe *Viscum articulatum* burm [J]. Natural Product Research & Development, 2013, 25(4): 484-488
- [2] 关玥,孙长波,李慧萍,等.槲寄生的化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2016,5:102-105
GUAN Yue, SUN Chang-bo, LI Hui-ping, et al. Advances on chemical constituent and pharmacology of *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 5: 102-105
- [3] 王青,张媛,陈剑,等.扁枝槲寄生在茶树群落中分布的影响因子[J].北京林业大学学报,2015,37(10):117-124
WANG Qing, ZHANG Yuan, CHEN Jian, et al. Major factors affecting the distribution of *Viscum articulatum* burm in an ancient cultivated tea plantation [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(10): 117-124
- [4] 郝彬秀,应剑,孟庆佳,等.螃蟹脚全粉的急性毒性和遗传毒性[J].食品科学,2016,37(21):248-251
HAO Bin-xiu, YING Jian, MENG Qing-jia, et al. Acute and genetic toxicity of whole powder of *Viscum liquidam baricolum hayata* [J]. Food Science, 2016, 37(21): 248-251
- [5] 曹朵,翁志洁,李建其,等.槲寄生属植物化学成分及药理活性研究进展[J].中草药,2015,46(10):1562-1570
CAO Duo, WENG Zhi-jie, LI Jian-qi, et al. Research progress on chemical constituents in plants from *Viscum L.* and their pharmacological activities [J]. Chinese Traditional & Herbal Drugs, 2015, 46(10): 1562-1570
- [6] Yusuf L, Oladunmoye M K, Ogundare A O. *In-vivo* antibacterial activities of mistletoe(*viscum album*) leaves extract growing on cocoa tree in akure north, Nigeria [J]. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 2013, 1(1): 37-42
- [7] Geetha K M, Bindu V, Murugan V. Antioxidant potential of *Viscum articulatum* burm [J]. Drug Discovery and Therapeutics, 2013, 4(1): 32
- [8] Kang S N. Ethanol extracts from mistletoe (*Viscum album* L.) act as natural antioxidants and antimicrobial agents in uncooked pork patties during refrigerated storage [J].

- Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2015, 29(1): 109-118
- [9] 张兴梅,薛桥丽,胡永金,等.扁枝槲寄生提取物对金黄色葡萄球菌抑菌机理的研究[J].现代食品科技,2016,32(1):82-88
ZHANG Xing-mei, XUE Qiao-li, HU Yong-jin, et al. Antimicrobial mechanisms of mistletoe (*Viscum articulatum*) extracts against *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science & Technology, 2016, 32(1): 82-88
- [10] 吉杰丽,薛桥丽,胡永金,等.普洱茶醇提不同萃取物的体外抑菌活性研究[J].郑州轻工业学院学报自然科学版,2015, 30(3):15-19
JI Jie-li, XUE Qiao-li, HU Yong-Jin, et al. Antibacterial activity of different extracts of Pu'er tea alcohol extraction in vitro [J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science Edition), 2015, 30(3): 15-19
- [11] Ajay Sharma, Vivek K, Bajpai, Kwang-Hyun Baek. Determination of antibacterial mode of action of *Allium Sativum* essential oil against foodborne pathogens using membrane permeability and surface characteristic parameters [J]. Journal of Food Safety, 2013, 33(2): 197-208
- [12] Hu Y, Qiao J, Ge C, et al. Antimicrobial activity of magnolia officinalis extracts *in vitro* and its effects on the preservation of chilled mutton [J]. Journal of Food Biochemistry, 2011, 35(2): 425-441
- [13] Sharma A, Gupta S, Sarethy I P, et al. Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 672-675
- [14] Bancirova M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea [J]. Food Research International, 2010, 43(5): 1379-1382
- [15] 卢晓,周磊,谢鲲鹏,等.没食子酸对金黄色葡萄球菌抑菌活性及机制研究[J].中国食用菌,2012,31(4):54-56,61
LU Xiao, ZHOU Lei, XIE Kun-peng, et al. Antibacterial activity and mechanism of Gallic acid on *Staphylococcus aureus* [J]. Edible Fungi of China, 2012, 31(4): 54-56, 61
- [16] Bradford M M. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem. [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254
- [17] 张赟彬,缪存铅,宋庆,等.荷叶精油对肉类食品中常见致病菌的抑菌机理[J].食品科学,2010,31(19):63-66
ZHANG Yun-bin, MIAO Cun-qian, SONG Qing, et al. Anti-bacterial mechanism of essential oil from lotus leaves on commonly found pathogens in meat foods [J]. Food Science, 2010, 31(19): 63-66
- [18] Sangetha S, Zuraini Z, Suryani S, et al. *In situ* TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract [J]. Micron., 2009, 40(4): 439-443
- [19] Monson B K, Stringham J, Jones B B, et al. Scanning electron microscopy visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after contact with gatifloxacin with and without preservative [J]. Journal of Ocular Pharmacology, 2010, 26(2): 133-136
- [20] 孙京新,王文娟.茶多酚对假单胞菌抑菌机理研究[J].肉类研究,2009,4(10):48-51
SUN Jing-xin, WANG Wen-juan. Action mechanism of antimicrobial tea polyphenols on *Pseudomonad* [J]. Meat Research, 2009, 4(10): 48-51
- [21] Hara S, Yamakawa M. Moricin, A novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(50): 29923-29927
- [22] Hu Y, Qiao J, Zhang X, et al. Antimicrobial effect of *Magnolia officinalis* s extract against *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2011, 91(6): 1050-1056
- [23] 钱丽红,陶妍,谢晶.茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J].微生物学通报,2010,37(11):1628-1633
QIAN Li-jiang, TAO Yan, XIE Jing. Bacteriostatic mechanism of tea Polyphenols on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology China, 2010, 37(11): 1628-1633
- [24] Kaya I, Yigit N, Benli M. Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy [J]. African Journal of Traditional Complementary & Alternative Medicines, 2007, 5(4): 363-369
- [25] Zhang Y B, Liu X Y, Jiang P P, et al. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science & Technology, 2015, 31(5): 31-35, 11