

胡桃醌抑制细菌生长作用的研究

吴朝霞^{1,2}, 金楠¹, 张敏¹, 张旋¹

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;

2. 沈阳农业大学营养、质量与安全研究所, 辽宁沈阳 110866)

摘要:目的:以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为研究对象,探讨胡桃醌对微生物不同阶段生长及形态特征的影响,为胡桃醌抑菌机理的研究奠定基础。方法:采用紫外分光光度计和平板计数法绘制生长曲线,通过透射电镜观察菌体形态特征的变化。结果:大肠杆菌的迟缓期和对数期受到胡桃醌的抑制作用明显;处于对数期的金黄色葡萄球菌对胡桃醌的抑制作用更为敏感。透射电镜的结果表明,最低抑菌浓度下的胡桃醌作用大肠杆菌 2h,菌体即出现细胞质壁分离现象,细胞质分布不均匀;8h 后,细胞壁破坏严重,内容物流出。胡桃醌作用金黄色葡萄球菌 4h,菌体细胞吸水膨胀,部分细胞隔膜已被破坏。8h 后,菌体互相粘连,细胞与细胞间的界限变得模糊。结论:胡桃醌的抑菌效果主要表现在细菌生长的对数期,并可能通过破坏菌体的细胞壁或细胞膜结构来抑制细菌的生长。

关键词:胡桃醌, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, MIC, 细菌形态

Study on the effect of juglone on inhibiting bacterial growth

WU Zhao-xia^{1,2}, JIN Nan¹, ZHANG Min¹, ZHANG Xuan¹

(1. Food Science College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Institute of Food Nutrition, Quality and Safety of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Objective: The effect of juglone on *S. aureus* and *E. coli* growth in different stages and morphological characteristics were studied, so as to discover the antibacterial mechanism of juglone. Method: The UV spectrophotometer and enumeration platecount method were used to determine cell growth curves. Observations of bacteria morphological characteristics were conducted by Transmission electron microscopy (TEX). Result: The result showed that the growth of *E. coli* in lag phase and log phase were obviously influenced by juglone. While for *S. aureus*, its growth in log phase was more sensitive to juglone. Result from observation by TEX showed that the cytoplasm was concentrated and the cell was plasmolysed 2 hours after adding juglone to cultivative medium at minimum inhibition concentration (MIC). The cell wall was damaged seriously and the contents were leaked out after 8 hours. While for *S. aureus*, the cells absorbed water to expand, and part of the cell membrane was destroyed 4 hours after adding juglone to cultivative medium at MIC. Eight hours later, bacterial were adherent and boundaries tended to be illegible. Conclusion: It was suggested that juglone might influence bacterial growth at logarithmic stage. Also, it might inhibit growth of bacteria through damaging cell wall or cell membrane.

Key words: juglone; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; MIC; bacteria morphological

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)06-0131-04

胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)是从核桃楸中提取出来的一种萘醌类活性物质,具有明显抑菌和抗瘤作用^[1-5]。同时对害虫^[6]、微生物^[7]等显示卓越的影响,其生物活性探讨也倍受注目^[8-9]。胡桃醌的抗菌

活性可应用于天然防腐剂方面^[10]。目前,国内对胡桃醌的研究内容包括胡桃醌检测方法、抑菌作用、抑制植物病原菌的生长、杀虫、杀螨、抗肿瘤、对某些人类病原菌的作用效果及机理、安全性等方面。该物质对食品中常见细菌和真菌的作用机理研究报道的很少,其抑菌防腐的机理仍不明确。本研究将以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌做为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的代表进行抑制细菌生长作用的研究,为

收稿日期: 2011-06-28

作者简介: 吴朝霞(1971-),女,副教授,研究方向: 食品营养,天然产物研究。

基金项目: 辽宁省科学技术基金项目(20102195)。

of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906-912.

[12] 刘桂敏, 赵秀梅, 陈菊娣, 等. 刺参酸性粘多糖的质量标准及稳定性研究[J]. 河北医药, 2004, 26(5): 398-399.

[13] 冯婷玉, 薛长湖, 孙通, 等. 燕窝中唾液酸的 DAD/FLD 串

联 HPLC 测定方法研究[J]. 食品科学, 2010(8): 233-236.

[14] 武履青. 开发氨基酸营养保健制剂提高国民健康素质[J]. 中国制药信息, 2010, 26(6): 38-40.

[15] 任国艳, 李八方, 侯玉泽, 等. 海蜇头糖蛋白基本组成及结构[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 121-125.

胡桃醌抑菌机理的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胡桃醌 sigma 公司,纯度为 99%;磷钨酸 上海衍胜实业有限公司,纯度 >99.94%;金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 沈阳农业大学微生物实验室;营养琼脂培养基 (pH 7.0 ~7.2) 国药集团化学试剂有限公司,牛肉膏 3.0g、蛋白胨 10.0g、氯化钠 5.0g、琼脂 17.0g、蒸馏水 1000mL。

洁净工作台 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;手提式不锈钢蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司;HZP-250 型全温振荡培养箱 上海精宏实验设备有限公司;7200 型紫外分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;JEM-100CX II 透射电镜 日本电子有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定 平板法:将胡桃醌对两种被试菌进行抑菌实验,将胡桃醌溶液添加到营养琼脂培养基中,再加入菌悬液,混匀后倒平板,使平板中菌体浓度为 1×10^6 cfu/mL,胡桃醌浓度分别为 600、300、150、75、37.5、18.75、9.375 $\mu\text{g/mL}$ 。同时设以等体积 pH 为 7.0 的无水乙醇(与培养基 pH 相同)溶液取代胡桃醌溶液的平板为实验阳性对照;以纯培养基平板为空白对照,每种处理均作 2 个平行样。将平板置于 37℃ 条件下,培养 24h 后观察平板菌落生长情况,以无菌落生长的平板中胡桃醌最小浓度为最低抑菌浓度。

1.2.2 MIC 下的胡桃醌对两种微生物生长周期的影响 在大肠杆菌分别处于迟缓期、对数期、稳定期时加入 MIC 浓度的胡桃醌,摇床培养,摇床转速为 130r/min。迟缓期每隔 1h 取样,对数期每隔 2h 取样,以未加胡桃醌的菌悬液为对照,测定吸光值,波长为 430nm;稳定期每隔 2h 取样,采用平板法计算大肠杆菌数量。

在金黄色葡萄球菌分别处于迟缓期、对数期、稳定期时加入 MIC 下的胡桃醌,摇床培养。迟缓期每隔 1.5h 取样,对数期每隔 3h 取样。以未加胡桃醌的菌悬液为对照,测定吸光值,波长为 520nm。稳定期每隔 3h 取样,采用平板法计算金黄色葡萄球菌的数量。

制作对照生长曲线和加胡桃醌样品作用下的生长曲线。分析胡桃醌作用于细菌前后其生长曲线的变化。重复 3 次。

1.2.3 透射电镜负染色观察菌体形态 分别取三种浓度的胡桃醌处理处于对数期的两种微生物。分别摇床培养 2、4、8h。取样做透射电镜负染色,观察菌体形态,以不加胡桃醌的菌悬液为对照。

负染色前处理方法:将稀释好的样品铺展在 200 目铜网上,用重金属盐磷钨酸对其进行染色;吸去染料,样品干燥后,进行透射电镜观察^[11]。

2 结果与分析

2.1 MIC 的测定

胡桃醌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 75 $\mu\text{g/mL}$ 和 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 胡桃醌对两种微生物敏感性的研究

2.2.1 MIC 的胡桃醌对大肠杆菌生长周期的影响

由图 1a 可以看出 MIC 的胡桃醌对大肠杆菌迟缓期抑制作用明显。胡桃醌作用 2h 后,微生物数量有所减少;胡桃醌作用 3h 时,微生物数量开始略微增长但不能正常进入对数期。

图 1b 对比了胡桃醌处理对数期大肠杆菌生长的影响。以正常培养的大肠杆菌对数期生长曲线为对照,当加入胡桃醌后其生长曲线变化明显。对比曲线表明胡桃醌处理后细菌数量明显减少,微生物不能达到对数期生长高峰,说明胡桃醌明显抑制了大肠杆菌对数期的菌体分裂。

处于稳定期的大肠杆菌,当加入胡桃醌后生长曲线变化不明显,细菌数略少于对照菌数,作用 8h 后,细菌数略有增加,胡桃醌抑制效果不明显(见图 1c)。

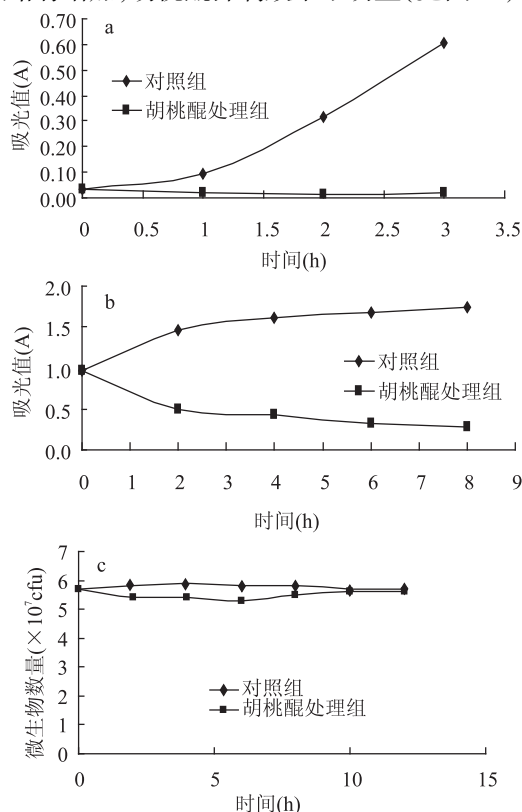


图 1 胡桃醌对大肠杆菌生长周期的抑制作用

Fig.1 The inhibition of juglone on *E.coli* growth cycle

注:a.迟缓期,b.对数期,c.稳定期;图 2 同。

2.2.2 MIC 的胡桃醌对金黄色葡萄球菌生长周期的影响 以正常培养的金黄色葡萄球菌迟缓期生长曲线为对照,当胡桃醌样品加入 1.5h,菌体数目基本没有显著变化,样品作用 3.0~4.5h 菌体数目增加,但未达到对照组的细菌数目(见图 2a)。由图 2b 可以看出胡桃醌作用处于对数期的金黄色葡萄球菌的菌体数目开始减少,并且一直下降,没有达到对数期的生长高峰。处于稳定期的金黄色葡萄球菌,对照组与胡桃醌作用的细菌数相差不大,胡桃醌对处于稳定期的金黄色葡萄球菌敏感性较差(见图 2c)。

2.3 透射电镜检测菌体外部形态特征

采用透射电镜中的负染色技术,比较了不同浓

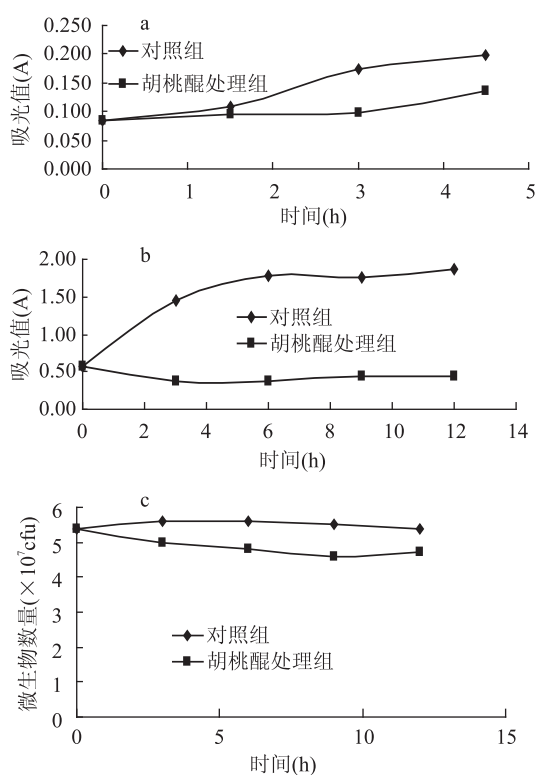


图2 胡桃醌对金黄色葡萄球菌生长周期的抑制作用

Fig.2 The inhibiton of juglone on *S.aureaus* growth cycle

度胡桃醌处理条件下,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌随时间的推移其外部形态特征的变化,结果如图3~图6所示。

在图3中,不经胡桃醌处理的正常大肠杆菌在整个实验期间均呈长杆状,细胞质分布均匀,细胞壁清晰完整,细胞壁与细胞膜结合紧密,细胞壁与细胞质之间没有明显的空隙。

图3 未加胡桃醌处理的大肠杆菌形态(29000 $\times$)Fig.3 The *E.coli* morphological characteristics without juglone (29000 $\times$)

经37.5 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用2、4h细胞两端通透,细胞两端发生质壁分离(见图4A,4B)。经37.5 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用8h细胞通透面积变大,质壁分离现象由两端扩大到四周(见图4C)。经75 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用2h,菌体细胞变形,边缘不圆滑,细胞质分布不均匀(见图4D)。经75 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用4h,细胞壁破损,内容物流出。这说明胡桃醌可直接破坏大肠杆菌细胞壁的结构,引起细胞壁通透性发生变化(见图4E)。经75 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用8h,细胞壁全部被破坏,菌体形态完全丧失(见图4F)。经150 $\mu\text{g/mL}$ 胡

桃醌作用2h,部分细胞壁残留(见图4G)。经150 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用4h,细胞形态发生变化,细胞壁模糊,内容物流出(见图4H)。经150 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用8h,没有完整的细胞壁,呈不规则形态,个别菌体发生自溶现象(见图4I)。

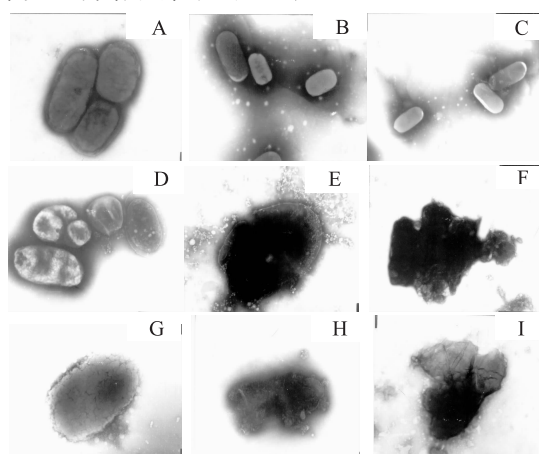
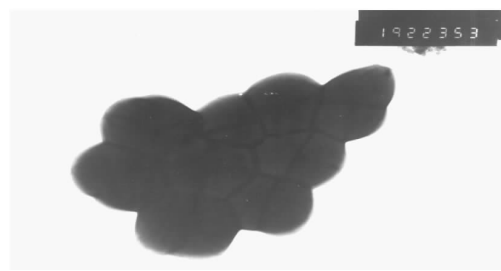


图4 胡桃醌作用的大肠杆菌形态变化

Fig.4 The *E.coli* morphological characteristics with juglone

注:A.37.5 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用2h的大肠杆菌(29000 $\times$); B.37.5 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用4h的大肠杆菌(14000 $\times$); C.37.5 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用8h的大肠杆菌(14000 $\times$); D.75 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用2h的大肠杆菌(19000 $\times$); E.75 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用4h的大肠杆菌(29000 $\times$); F.75 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用8h的大肠杆菌(29000 $\times$); G.150 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用2h大肠杆菌(29000 $\times$); H.150 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用4h大肠杆菌(29000 $\times$); I.150 $\mu\text{g/mL}$ 样品作用8h大肠杆菌(29000 $\times$)。

在图5中,不经胡桃醌处理的正常金黄色葡萄球菌的菌细胞形态大小基本一致,排列整齐,细胞壁完整,细胞表面光滑、圆润,呈球状,细胞与细胞间界限分明。细胞排列呈明显的葡萄串状^[12]。

图5 未加胡桃醌处理的金黄色葡萄球菌(29000 $\times$)形态Fig.5 The *S.aureaus* morphological characteristics without juglone (29000 $\times$)

经18.75 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用2h,金黄色葡萄球菌细胞菌体没有明显变化(见图6A)。经18.75 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用4h,细胞中间开始通透,细胞壁变薄(见图6B)。经18.75 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用8h,细胞大面积通透,细胞壁、细胞膜变薄(见图6C)。经37.5 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用2h,细胞颜色染色深浅程度有差异,说明细胞内部成分分布不均匀(见图6D)。经37.5 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用4h,菌体细胞吸水膨胀,部分细胞隔膜已被破坏(见图6E)。经37.5 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用8h,细胞与细胞间界限模糊,说明部分细胞膜已经破裂,菌

体互相粘连(见图 6F)。经 $75\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用 2、4h, 菌体细胞明显变形, 呈椭圆形并且菌体四周通透, 说明细胞壁、细胞膜变薄并且细胞质分布不均匀(见图 6G、6H)。经 $75\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌作用 8h, 金黄色葡萄球菌形态学结构被破坏, 磷脂双分子层破碎, 碎片分离, 细胞质开始泄露。可见, 胡桃醌破坏了细胞膜结构, 导致细胞死亡(见图 6I)。

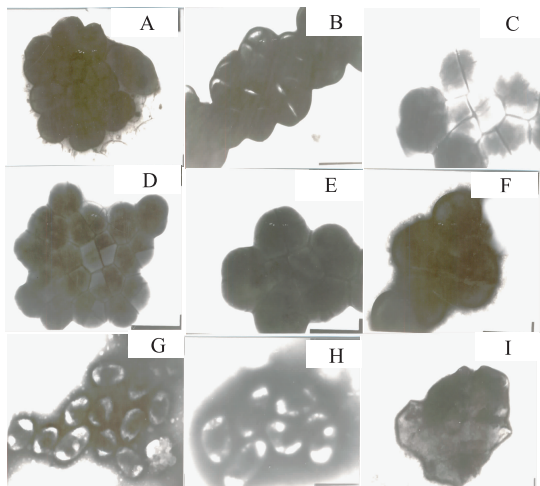


图 6 加胡桃醌处理的金黄色葡萄球菌形态变化

Fig.6 The *S.aureus* morphological characteristics with juglone

注:A. $18.75\mu\text{g/mL}$ 样品作用 2h 的金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); B. $18.75\mu\text{g/mL}$ 样品作用 4h 的金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); C. $18.75\mu\text{g/mL}$ 样品作用 8h 的金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); D. $37.5\mu\text{g/mL}$ 样品作用 2h 的金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); E. $37.5\mu\text{g/mL}$ 样品作用 4h 的金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); F. $37.5\mu\text{g/mL}$ 样品作用 8h 的金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); G. $75\mu\text{g/mL}$ 样品作用 2h 金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); H. $75\mu\text{g/mL}$ 样品作用 4h 金黄色葡萄球菌 ($29000\times$); I. $75\mu\text{g/mL}$ 样品作用 8h 金黄色葡萄球菌 ($29000\times$)。

3 讨论

Ivo Oliveira^[13]等从 5 个品种的胡桃醌青果皮中提取酚类物质并检测了抗氧化和抗微生物活性, 发现所有的提取物均对革兰氏阳性菌具有抗微生物活性, 金黄色葡萄球菌对其尤其敏感, MIC 值在 0.1mg/mL 左右, 其结果高于本研究结果, 说明金黄色葡萄球菌对胡桃醌更为敏感。

微生物在稳定期时, 少量菌体已经开始死亡, 吸光值不能准确地反映出活菌数量, 所以本文采用平板法记活菌数, 研究胡桃醌对处于稳定期的两种微生物生长曲线的影响。

胡桃醌对大肠杆菌的抑制作用主要表现在细菌生长的迟缓期和对数期, 细菌数没有正常增长而直接进入衰亡期。胡桃醌作用于大肠杆菌稳定期时, 抑制作用主要表现在 0~6h, 而 8~12h 出现反弹, 分析其原因可能有两点: 一是溶剂对胡桃醌的稳定性影响较大, 随着存放时间的加长胡桃醌会分解^[14]。胡桃醌可与水蒸气一同挥发, 能升华。当胡桃醌作用 10h, 培养基中胡桃醌的含量已经很少, 抑菌性能自然降低。另外, 菌体细胞在受到抑制后, 会激发自我修复机制。经历一段时间的自我修复, 少量菌体能恢复活力, 在适合条件下继续生存并繁殖。

胡桃醌对金黄色葡萄球菌的抑菌作用主要表现在细菌生长的对数生长期, 即分裂增生期。这与曾亮指出的儿茶素主要抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的对数生长期结论一致^[15]。胡桃醌作用 9h 细菌数量开始有所回升其原因与大肠杆菌相同。但在稳定期, 胡桃醌作用 9h, 细菌数还是继续下降, 其原因是细菌处于稳定期即将进入衰亡期, 正常细菌菌体数量也在下降。胡桃醌对金黄色葡萄球菌迟缓期的作用效果没有大肠杆菌的明显, 原因在于对照的正常金黄色葡萄球菌迟缓期生长更为缓慢。

由于金黄色葡萄球菌的菌体互相聚集呈葡萄串状, 负染色时容易染色, 所以照片颜色较深。

从透射电镜照片可知, 随胡桃醌浓度的增大, 菌体细胞破坏的更加严重。胡桃醌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制可能源于其对菌体细胞壁和细胞膜的破坏。其深入的抑菌机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 彭少麟, 邵华. 化感作用的研究意义及发展前景[J]. 应用生态学报, 2001, 12(5): 780-785.
- [2] 张野平. 胡桃醌对肿瘤细胞的增值抑制作用和抗菌作用[J]. 沈阳医学院学报, 1987, 4(3): 166-169.
- [3] 王少东, 脱朝伟. 核桃楸青果皮抗肿瘤作用的药理研究[J]. 辽宁中医杂志, 1990, 14(11): 37-39.
- [4] 张明晓, 李学刚. 乙酸酐、双氧水和 1,5-二羟基萘酚一锅合成胡桃醌[J]. 应用化学, 2007, 12(24): 1470-1472.
- [5] 许绍惠, 许泓. 胡桃属植物毒性成分及其应用[J]. 沈阳农业大学学报, 1990, 21(2): 167-170.
- [6] Christopher A M, Azucena GC, Carmen G, et al. Antifeedant effects of some novel terpenoids on Chrysomelidae beetles: comparisons with alkaloids on an alkaloid - adapted and nonadapted species[J]. J Chem Ecol, 1997, 23(7): 1851-1866.
- [7] Akellavbs, Trichinapallyns, Anlisi. Fungicidal activity of some naturally occurring naphthaquinones [J]. Pestic Sci, 1975, 6: 165-168.
- [8] Giovannim, Francked, Davidew. Activity of quinones on Colletotrichum species [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 3824-3828.
- [9] Riffela, Medinalf, Stefaniv, et al. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones [J]. Bra J Med Biol Res, 2002, 35: 810-818.
- [10] Qadan F. The antimicrobial activities of Psidium guava and Juglans regia leaf extraction [J]. Am J Chin Med, 2005, 33(2): 197-204.
- [11] 范秀容, 沈萍. 微生物学实验方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 1980: 58-76.
- [12] 应国华, 李向印, 马洪骏, 等. 医学生物学电镜技术与细胞超微结构[M]. 香港: 香港现代出版社, 1993: 31-79.
- [13] Ivo Oliveira, Anabela Sousa, Isabel C F R Ferreira, et al. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 2326-2331.
- [14] 李福荣, 史卫锋, 等. 不同采摘时期的青龙衣中胡桃醌的含量比较[J]. 中国现代医生, 2007, 45(2): 6-7.
- [15] 曾亮, 黄建安, 李赤翎, 等. 儿茶素的抑菌效果及机理研究[J]. 食品工业科技, 2009(5): 89-92.