

血根碱体外抑菌作用及其对细菌生物被膜的影响

王静慧, 韩剑众*, 曲道峰

(浙江工商大学食品质量安全系, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江杭州 310035)

摘要: 试验旨在了解血根碱的体外抑菌能力及对细菌生物被膜的作用。通过管碟法测定不同浓度的血根碱对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌能力, 并与国家允许添加的饲用抗生素盐酸金霉素比较; 构建3种致病菌的细菌生物被膜; 研究血根碱对其作用效果。结果表明: 0.32 g/L的血根碱抑菌效果明显, 并且优于盐酸金霉素; 采用刚果红平板法及银染法鉴定细菌生物被膜; 通过菌落计数发现, 0.16 g/L血根碱可以清除细菌生物被膜。血根碱具有较强的体外抑菌能力, 又能有效清除大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌形成的细菌生物被膜。

关键词: 血根碱; 细菌生物被膜; 抑菌; 药敏反应

中图分类号: S816.7

文献标识码: B

文章编号: 0258-7033(2012)19-0067-04

抗生素作为饲料添加剂, 对畜禽有保健促长作用, 但同时也会造成耐药细菌的大量产生, 并在动物体内残留, 从而影响动物源性的食品安全^[1]。此外, 对细菌生物被膜(BBF)的研究^[2]证实, BBF可以保护细菌逃逸宿主免疫和抗菌药物的杀伤作用, 使游离菌致死的抗菌药物剂量往往对BBF中的细菌无效, 导致临床感染的难治性, 使治疗和用药更为棘手^[3]。有文献表明^[4], 人使用抗生素后, 在肠道内形成生物被膜, 妨碍了肠道炎症的治疗, 因此, 畜禽抗生素的大量使用, 必然也会引起畜禽胃肠道内的细菌形成生物被膜, 使得细菌的耐药性大幅提高, 因此, 迫切需要开发新的无药物残留、无污染、不易产生耐药性并能有效清除生物被膜的绿色抗生素用于畜牧养殖业。欧盟的大量研究表明, 植物源性的天然抗菌物质在动物抗菌、抗锥虫、促

进食欲及降解无残留等方面具有很大的优势^[5-7]。来源于中草药博落回 (*Macleaya cordata*) 的血根碱 (*Sanguinarine*), 是一种天然的抗生素, 使用后易降解, 对环境污染小, 其成分特殊, 作用机理独特^[8], 对病虫害有较高的毒杀能力^[9], 而且开发和利用成本较低。博落回在我国分布广泛, 资源丰富, 提取得到的血根碱含量高。目前, 郁建生等^[10]已经研究得到了血根碱的分离纯化方法。周立刚^[11]完善了博落回生物碱制备方法, 并测定了其抵抗病原真菌的能力^[12]。

近年来, 关于植物抗生素的抑菌试验报道较多^[13], 但目前尚没有研究血根碱对细菌生物被膜作用的相关报道。本试验在对血根碱体外抑菌作用的基础上, 通过构建细菌生物被膜, 研究其对细菌生物被膜的影响, 期望为血根碱作为饲用抗生素的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 菌种: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), ATCC6538、大肠埃希氏菌 (*Es-*

收稿日期: 2012-02-26; 修回日期: 2012-05-03

资助项目: 浙江省“食品质量与安全”重点专业建设经费资助

作者简介: 王静慧(1987-), 女, 硕士研究生

*通讯作者

goats in the two treating groups were fed the basal diets with different Chinese medicine prescriptions supplied with 15 g per day per goat, such as prescription I and prescription II, which composed of *Herba Agastachis*, *Rhizoma Atractylodis*, *Cortex Phellodendri* and *Gypsum Fibrosum* with different proportions, respectively. The results showed that every prescription could decrease the serum concentrations of adrenocorticotrophic hormone, aldosterone, corticosteroid and glucagon, and increase growth hormone, insulin, thyroid stimulating hormone, triiodothyronine and tetraiodothyronine; every prescription could increase the partial pressure of CO₂ and O₂, saturation O₂, and the concentrations of total CO₂, actual bicarbonate, buffer excess, Ca²⁺, P⁵⁻ and Mg²⁺ except for pH in the whole blood; in conclusion, the effect of the prescription I was better than that of the prescription II.

Key words: Chinese medicine prescription; blood gas; hormone; goat

cherichia coli, *E.coli*), ATCC25922、甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi A*, *S. paratyphi A*), ATCC50001, 以上菌种均由浙江省疾控中心提供。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, *B.subtilis*), 凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*, *B.coagulans*) 由实验室分离得到。

饲用添加剂: 血根碱(江西中科联合生化营养公司赠与), 盐酸金霉素(USP级, 阿拉丁试剂有限公司, 饲料中允许添加的抗生素)

1.2 体外抑菌试验 采用管碟法^[14], 测定血根碱对菌产生的抑菌圈大小, 判断抑菌效果。制备菌悬液(金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌)。配制0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.0025 g/L的血根碱溶液。配制0.32 g/L的盐酸金霉素溶液。

1.3 细菌生物被膜构建 参照Brown等^[15]方法, 分别构建金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌生物被膜。无菌操作将菌种接种于新鲜的胰酶大豆肉汤(TSB)中, 37℃, 24 h孵育, 至细菌对数生长中期(A600=1.6)。吸取0.2 mL菌液于10 mL TSB液体培养基中, 再将无菌盖玻片置于菌液中37℃培养48 h, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)轻轻冲洗3次, 去除浮游细菌, 隔天换一次培养基, 连续培养7 d, 即可形成细菌生物被膜。

1.4 细菌生物被膜检测和鉴定 参照Oliveira等^[16]的刚果红(CRA)平板法检测生物被膜。取出生长有成熟的细菌(金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌)生物被膜的盖玻片, 用无菌PBS漂洗3次, 去除游离菌。挑取细菌生物被膜菌及游离菌接种于CRA平板, 37℃培养24 h后观察平板上菌落颜色。

参照李乃静等^[17]的快速银染法鉴定生物被膜。取出生长有成熟的细菌生物被膜的盖玻片, 无菌PBS漂洗3次, 2.5%戊二醛PBS固定1 h; 饱和CaCl₂结合15 min; 5% AgNO₃染色5 min; 1%对苯二酚显色2 min; 5% Na₂S₂O₃固定2 min; 待盖玻片干后, 置于光学显微镜下观察, 并做对照试验。

1.5 血根碱对细菌生物被膜的作用

1.5.1 CRA平板法鉴定血根碱与盐酸金霉素对细菌生物被膜的作用 利用CRA平板法鉴定血根碱作用于细菌(金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌)生物被膜产生的影响, 并与盐酸金霉素对照。取出生长有成熟细菌生物被膜的盖玻片, 用无菌PBS漂洗3次。采用增减一倍的方法, 用MH肉汤

将血根碱和金霉素分别配制3个浓度(1/2C, C, 2C): 0.16、0.32、0.64 g/L, 并做空白对照, 加入到培养皿中37℃孵育24 h。再用PBS漂洗, 挑取细菌接种于CRA平板, 37℃培养24 h后观察平板上菌落颜色。

1.5.2 血根碱对细菌生物被膜的杀伤能力测定 取出经0、0.16、0.32、0.64 g/L血根碱MH肉汤孵育后的金黄色葡萄球菌、甲型副伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌生物被膜盖玻片, 用PBS充分清洗, 加入新鲜MH肉汤然后置于超声脱气仪120 W, 15 min超声振荡, 使生物被膜上的细菌剥脱, 进行配比稀释后, 加入MH琼脂, 进行菌落计数, 每管计数3次, 取平均值。并换算成常用对数(lgCFU/mL)。

1.6 统计方法 试验中所得数据用SPSS软件进行方差分析, 结果均平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 管碟法进行体外抑菌试验 血根碱对甲型副伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌作用呈现随浓度梯度而提高, 结果如图1。随着血根碱的浓度增加, 抑菌圈直径在增大。在0.32 g/L浓度时, 5种菌处于敏感或者极敏感(抑菌圈直径>10 mm为敏感; >20 mm为极敏感)($P<0.05$), 在0.64 g/L下抑菌效果变化不大, 故选择0.32g/L 进行对比试验。

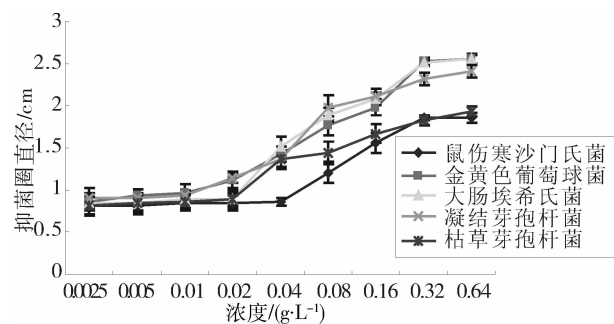


图1 血根碱的抑菌效力

由表1可以看出, 在最佳抑菌浓度0.32 g/L下, 血根碱和金霉素对于沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌都有抑菌效果, 但抑菌效果之间有显著差异($P<0.05$)。血根碱对于 *S. aureus* (ATCC6538)、*E. coli* (ATCC25922)、*S. paratyphi A* (ATCC50001) 作用强于金霉素; 对于 *Bacillus subtilis*、*Bacillus coagulans* 作用, 金霉素强于血根碱, 其中 *Bacillus subtilis*、*Bacillus coagulans* 属于非致病菌。

表1 0.32g/L血根碱和盐酸金霉素抑菌效果对比表(n=3)cm

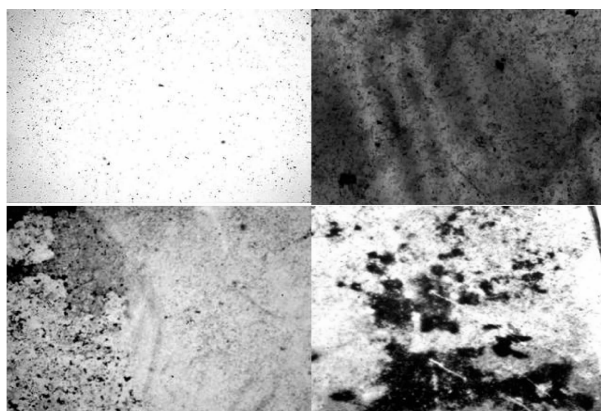
菌种	血根碱抑菌圈直径	盐酸金霉素抑菌圈直径
甲型副伤寒沙门氏菌	1.85±0.06	1.23±0.05*
金黄色葡萄球菌	2.52±0.14	1.92±0.12*
大肠埃希氏菌	2.51±0.03	2.33±0.05*
凝结芽孢杆菌	2.32±0.11	2.85±0.18*
枯草芽孢杆菌	1.82±0.08	2.20±0.10*

注:*表示同行数据差异显著($P<0.05$)

2.2 细菌生物被膜鉴定

2.2.1 刚果红(CRA)平板法检测细菌生物被膜 通过CRA平板法鉴定发现,沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌生物被膜在CRA平板上的菌落均呈现黑色圆点状或黑色团块状,为细菌生物被膜阳性;游离菌在CRA平板上菌落为红色,为阴性。

2.2.2 细菌生物被膜的快速银染法鉴定 通过光学显微镜($\times 400$)观察,细菌生物被膜在盖玻片下呈絮状黑色物质团聚,偶有散落的黑点或黑斑,游离细菌呈散状分布(见图2)。



注:A为对照组,B为生物被膜沙门氏菌,C为生物被膜大肠埃希氏菌,D为生物被膜金黄色葡萄球菌

图2 银染法鉴定细菌生物被膜对比图($\times 400$)

2.3 血根碱对细菌生物被膜的作用

2.3.1 CRA平板法鉴定血根碱对细菌生物被膜的作用 通过CRA平板法鉴定发现,对于大肠杆菌、沙门氏菌生物被膜,血根碱在0.16 g/L浓度下可以清除,盐酸金霉素在0.16 g/L浓度下还不能完全清除。对于金黄色葡萄球菌,血根碱和金霉素在低浓度下均可以清除。

2.3.2 血根碱对细菌生物被膜的杀伤能力测定 血根碱可以影响生物被膜菌的生长,清除生物被膜菌。由表2可见,0.16、0.32、0.64 g/L血根碱作用沙门氏菌生物被膜、金黄色葡萄球菌生物被膜、大肠埃希氏菌生物被膜与其对照组(血根碱剂量为0)相比有显著

表2 血根碱用于细菌生物被膜后对其中细菌数的影响(n=3)

BBF菌种	血根碱剂量/(g·L ⁻¹)	细菌对数/(lgCFU·mL ⁻¹)
大肠埃希氏菌	0.00	6.77±0.21
	0.16	5.74±0.08*
	0.32	5.22±0.03*
	0.64	5.13±0.17*
	0.16	5.45±0.14*
	0.32	5.07±0.03*
金黄色葡萄球菌	0.00	6.44±0.08
	0.16	5.45±0.14*
	0.32	5.07±0.03*
	0.64	4.87±0.17*
	0.16	5.37±0.13*
	0.32	4.83±0.02*
沙门氏菌	0.00	6.95±0.08
	0.16	5.37±0.13*
	0.32	4.83±0.02*
	0.64	4.30±0.06*

注:*表示与同组的对照组相比差异显著($P<0.05$)

差异($P<0.05$)。经过统计学分析发现,0.16、0.32、0.64 g/L血根碱溶液作用BBF后的细菌数与其对照组有显著差异($P<0.05$),即0.16g/L血根碱对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌生物被膜就具有清除作用。随着血根碱浓度的提高,清除作用逐渐增强,且对于沙门氏菌和金黄色葡萄球菌生物被膜清除作用较强。

3 讨论

3.1 管碟法进行体外抑菌试验 赵东亮等^[18]研究发现,血根碱抗菌效力强,抗菌谱广,对球菌和杆菌、革兰氏阳性和阴性都有抗菌活性,且对有些菌的活性强于常用药盐酸小檗碱及青霉素。本试验进一步验证了血根碱的抑菌能力,随浓度增加而增强。盐酸金霉素是国家允许添加的饲用抗生素,但对与*S.aureus*(ATCC6538)、*E.coli*(ATCC25922)、*S.paratyphi A*(ATCC50001)等病原菌的抑制效果,血根碱强于盐酸金霉素;而且发现作为一种植物源性抗生素对于畜禽肠道的一些正常菌群如枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌等益生菌的抑制作用却较小。

3.2 细菌生物被膜鉴定 细菌生物被膜菌在CRA平板上呈现黑色圆点状或斑块状,游离菌不呈黑色。其原理:在形成细菌生物被膜的过程中,细菌粘附于聚合物表面后,附着在聚合物表面的细菌相互分化、增殖,形成多层细胞并产生大量黏液,多层细胞镶嵌在黏液中形成生物被膜。黏液的主要成分为一种多糖-一胞间多糖黏附素(PIA),是形成生物被膜的关键物质,Freeman等^[19]研究发现,刚果红可以与生物被膜细菌表面PIA反应,使菌落变成黑色,从而鉴定

细菌生物被膜。

细菌形成生物被膜过程、效果有很大差异,如细菌群落数量,体积大小以及代谢活性等的不同,且生物被膜的成熟度、被膜稳定性这些因素都会影响银染法的鉴定结果,但是银染法操作简单,价格低廉,结果直观,方便快捷,目前被广泛引用。结果表明,该法可以直观辨别生物被膜菌和游离菌,判断细菌是否形成生物被膜。银染法结合CRA平板鉴定,进一步证实成功构建得到了这些细菌的生物被膜。

3.3 血根碱对细菌生物被膜的作用 细菌生物被膜是细菌为适应环境,通过粘附组织和其他物质表面分泌多糖基质、纤维蛋白脂蛋白等多种糖蛋白复合物使它们相互粘连,并将自身克隆聚集缠绕其中形成的膜状物,与浮游细菌相比,生物被膜细菌对药物的抗性可提高10~1000倍。有研究表明^[20],一般合成的抗生素对细菌生物被膜作用较小。

CRA平板法鉴定验证了在低浓度下盐酸金霉素不能完全清除沙门氏菌、大肠埃希氏菌生物被膜,但是血根碱可以有效去除细菌生物被膜,说明血根碱清除沙门氏菌、大肠埃希氏菌形成的生物被膜的能力较盐酸金霉素强。血根碱对细菌生物被膜的杀伤能力测定能够定量地表示出血根碱清除生物被膜的能力大小,对于沙门氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌生物被膜在0.16 g/L浓度下就有杀伤能力,随着浓度升高清除,能力增强。

4 小 结

本试验进一步证实,血根碱具有较强的抑菌作用,特别是对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌等病原菌的效果强于盐酸金霉素;而且对于正常菌群如枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌等益生菌的抑制作用却较小。寻找并开发能抑制细菌生物被膜生长的药物已经成为国内外相关研究的焦点课题,本研究通过构建病原菌生物被膜模型,探索血根碱对细菌生物被膜的作用,结果表明,血根碱对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌生物被膜有较强的清除作用,这为解决畜牧养殖业抗生素滥用导致耐药性及生态污染问题提供了新的途径。

参考文献:

[1] Sasidharan S, Prema B, Yoga Latha L. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2011, 1(2): 130-132.

[2] 屈常林,高洪,赵宝洪,等.细菌生物被膜与抗生素耐药机制研究进展[J].动物医学进展,2008,29(3):86-90.

[3] 胡金树,王彦荣,赵建宏.细菌生物被膜的防治进展[J].中国误诊学杂志,2009,9(10):2283-2284.

[4] Swidsinski A, Loening-Baucke V, Bengmark S, et al. Bacterial biofilm suppression with antibiotics for ulcerative and indeterminate colitis: consequences of aggressive treatment [J]. Arch Med Res, 2008, 39: 198-204.

[5] Kosina P, Gregorova J, Gruz J, et al. Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb[J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 1006-1012.

[6] Kosina P, Walterová D, Ulrichová J, et al. Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment[J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42(1): 85-91.

[7] Zdarilova A, Vrublova E, Vostalova J, et al. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: Safety assessment in rats a 90-day feeding experiment[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(12): 3721-3726.

[8] Blank R, Müller-Siewardt B, Wolfram S. Sanguinarine does not influence availability or metabolism of tryptophan in pigs[J]. Livestock Sci, 2010, 134(1-3): 24-26.

[9] 罗国富,肖世玖.血根碱的药理作用及其应用[J].兽药与饲料添加剂,2009,14(5):22-24.

[10] 郁建生,郁建平.博落回总生物碱分离纯化工艺研究[J].中药材,2007,30(8):1008-1012.

[11] 周立刚.用于抑制植物病原真菌的博落回生物碱及其制备方法:中国,CN200810119947.9[P].2009-1-28.

[12] 刘浩,谈满良,周立刚.博落回、虎杖和黄芩提取物对植物病原菌的抑制作用[J].天然产物研究与开发,2009,(21)400-403.

[13] Alvarez M L, Pinyerd H L, Crisantes J D, et al. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice[J]. Vaccine, 2006, 24(14): 2477-2490.

[14] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,2000.

[15] Brown M R W, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents[J]. J Appl Bacteriol, 1993, 74: 87.

[16] Oliveira M, Bexiga R, Nunes S F, et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates[J]. Vet Microbiol, 2006, 118(1-2): 133-140.

[17] 李乃静,李胜崎,何平,等.银染法鉴定细菌生物被膜[J].辽宁药物与临床,2003,6(1):37-38.

[18] 赵东亮,郁建平,周晓秋,等.博落回生物碱的抑菌作用研究[J].食品科学,2005,26(1):45-47.

[19] Freeman D J, Falkiner F R, Keane C T. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*[J]. Clin Pathol, 1989, 42(8): 872-874.

[20] Shafahi M, Vafai K. Synthesis of biofilmresistance characteristics against antibiotics[J]. Int J Heat Mass Transfer, 2010, 53(15-16): 2943-2950.