

氯化三苯四氮唑校正纸片扩散法检测 天然抗菌成分的误差

赵启美^{1,2}, 何佳^{3,*}, 朱文学³

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013 2. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471003

3. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 目的: 对现行纸片扩散法(K-B法)检测天然抗菌成分存在显著误差的原因进行分析, 提出改进方法。方法: 采用氯化三苯四氮唑(TTC)对指示菌显色、分析天然产物乙醇浸膏中抗菌成分的极性、样品在平板培养前适当扩散等方法, 对K-B法检测天然抗菌成分存在显著误差的原因进行了研究。结果: 天然产物中存在中极性、弱极性甚至非极性抗菌成分, 在培养基中扩散较慢, 现行K-B法以透明抑菌圈为判读抗菌活性依据, 会低估样品抗菌活性, 甚至出现假阴性结果, 造成漏筛。以不能被TTC显色的指示菌范围和透明抑菌圈之和来判读天然产物抗菌活性, 提高了K-B法检测天然抗菌成分的准确性和可靠性。结论: 现行K-B法不能直接应用于由有机溶剂提取的天然抗菌成分的活性检测, TTC显色K-B法可有效消除由样品扩散速度较慢引起的显著误差。

关键词: 现行K-B法; 氯化三苯四氮唑; 天然抗菌成分; 活性检测; 校正误差

Adjusting Error of Current K-B Method to Detect Natural Antibacterial Ingredients by TTC

ZHAO Qi-mei^{1,2}, HE Jia^{3,*}, ZHU Wen-xue³

(1. School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

3. School of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Objective: To analyze significant error's reasons of current K-B method for detecting antimicrobial activity of natural product, and introduce modified method. Method: The reasons for significant error were studied by adopting TTC chromogenic method, analyzing alcohol extract of natural antimicrobial component's polarity and making sample appropriate diffusion before plate cultivated. Result: There were many semipolar, low-polar and nonpolar antimicrobial components in natural products, they diffused slowly in medium, it was possible for false negative and leaked screening by inhibition zone size judging only, but TTC method was better precise and reliable with the sum of indicator size without dyed by TTC and inhibition zone size. Conclusion: It wasn't applied for current K-B method to detect antibacterial activity of organic solvent extracts until it was improved with TTC chromogenic method.

Key words current K-B method; TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride); natural antibacterial ingredients; to detect antibacterial activeness; adjusting error

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0333-04

目前, 从中草药中筛选、分离和提取天然抗菌成分已成为天然防腐剂和新药研发等研究领域的热点, 纸片扩散法(K-B法)以其操作简便、结果易于观察、容易掌握等特点, 被广泛作为抗菌活性初筛的首选方法。现行K-B法是将浸有样品的风干纸片贴在培养基平板上

后, 立即培养, 观察结果, 测量透明抑菌圈大小。然而, 这种方法要求样品必须具有极性大、水溶性好、易于在培养基中扩散等基本特点, 却被许多人所忽视。天然抗菌成分大都是用乙醇等有机溶剂浸提的, 其中相当一部分为中、小极性物质, 在培养基中扩散较慢,

收稿日期: 2007-01-19

基金项目: 江苏省2004年度博士研究生创新计划项目(xm04-57)

作者简介: 赵启美(1964-), 女, 副教授, 博士, 主要从事微生物来源活性物质的研究。E-mail: hejia@mail.haust.edu.cn

*通讯作者: 何佳(1963-), 男, 副教授, 博士, 主要从事微生物来源活性物质的研究。E-mail: hejia@mail.haust.edu.cn

因此,用现行K-B法筛选检测天然成分抗菌活性,在方法学上存在严重缺陷,会低估样品抗菌活性,甚至会出现假阴性结果,研究中发现,甚至一些已知具有抗菌活性的药用植物等天然产物乙醇浸膏样品,按现行K-B法却不产生透明抑菌圈,而若将贴有样品纸片的平板先低温放置一段时间后,再进行培养,才可出现透明抑菌圈,且在一定时间范围内,低温放置时间与透明抑菌圈直径成正比。针对现行K-B法不能完全准确地反映天然抗菌成分活性这一情况,纠正其试验方法上的缺陷,使之更加完善,本研究选取了一些具有抗菌活性的药用植物样品,对现行K-B法检测天然抗菌成分存在显著误差的原因进行了分析,阐明了问题的原因,提出了TTC显色K-B法,提高了K-B法检测天然抗菌活性成分的准确性。

1 材料与方法

1.1 中药及样品制备

将丹参、藿香、土荆皮、肉桂、丁香、陈皮等6种已知具有抗菌活性的中药,置50℃烤箱4h,碾碎至20目以下,称重后装入三角瓶中,加入5倍95%乙醇浸泡3d,不时摇动,收集滤液后重复提取一次,过滤,去渣,挥干乙醇,制成乙醇浸膏。将乙醇浸膏进行系统分离,分为石油醚相、乙醚相、乙酸乙酯相和萃余相,挥干溶剂,加入甲醇,制成浓度为128mg/ml甲醇溶液样品,密封置4℃保存。

1.2 试剂与仪器

TTC 上海试剂三厂;肉汤培养基、营养琼脂 国药集团化学试剂有限公司;沙堡氏培养基 南京普朗医用设备有限公司。

直径5.5mm中速新华滤纸片;SPX-250B生化培养箱 上海跃进集团;SW-CJ-2FD超净工作台 苏净集团。

1.3 指示菌

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 江苏大学药学院。

1.4 方法

1.4.1 指示菌菌液准备

将枯草芽孢杆菌接种在肉汤液体培养基中,36℃培养12h,以生理盐水将其浓度调整为 10^7 CFU/ml。将酿酒酵母接种于沙堡氏液体培养基中,28℃培养24h,将浓度调整为 10^5 CFU/ml。

1.4.2 样品纸片制备

将灭菌纸片浸在甲醇溶液样品中2h,放入无菌培养皿中,晾干,备用。

1.4.3 抑菌实验

倒制4mm厚的培养基,待培养基凝固后,在超净

工作台中,开盖干燥以去除冷凝水。用无菌棉签沾取菌液,在管内壁将多余菌液旋转挤去后,在平板表面均匀涂布接种3次,每次旋转平皿60度,最后沿平板内缘涂抹一周,用无菌镊子将含样品纸片紧贴于培养基平板表面,贴上后用镊子轻轻压一下纸片。细菌平板36℃培养12h,真菌平板28℃培养24h,测量透明抑菌圈。在平板上喷加0.25% TTC,细菌继续培养2h,酵母继续培养3h,测量样品实际抑菌圈直径。每个实验重复3次,3个平行。取不能被TTC染色的细菌菌落在肉汤平板上划线,36℃培养20h。取不能被TTC染色的酵母菌菌落在沙堡氏平板上划线,28℃培养20h。无菌体生长者表明菌体已被杀灭。

1.4.4 扩散对透明抑菌圈的影响

先将已贴样品纸片的上述平板放置在4℃冰箱中,再将已放置不同时间的平板移入培养箱中培养。其他操作同上。

2 结果与分析

2.1 TTC用于K-B法检测抗菌活性的可行性

TTC可被活菌细胞内的琥珀酸脱氢酶等呼吸酶还原成不溶性的红色颗粒,使活细胞显红色,死细胞不能被染色,可以准确地鉴别菌体细胞活性,已被应用于鉴别细胞活性的研究中^[1-3]。

K-B法是以样品扩散为基本原理的,通过抗菌样品在培养基中逐渐扩散,从而在最小抑菌浓度(MIC)范围内,使菌体生长受到抑制而形成透明抑菌圈,根据抑菌圈的大小判定该抗菌样品的抑菌能力。然而,按现行K-B法进行抗菌实验后,我们对平板喷加TTC,发现大多数样品除透明抑菌圈之外,还有一圈不能被TTC染色的菌落,即双圈现象,划线法证明未被TTC染色的菌落为死菌落。双圈外是被染成红色的具有活性菌落,见图1、2。这表明仅以透明抑菌圈来判定样品抗菌活性是不准确的,现行K-B法对天然抗菌成分的检测不能准确地反映样品的抗菌性能,样品的实际抑菌能力,即MIC范围,应该包括透明抑菌圈和不能被TTC染色的白色菌圈两部分。

形成双圈现象的原因是:当样品中的抗菌成分已扩散到某一区域时,该区域指示菌尚未形成肉眼可见的菌落,且该区域抗菌成分浓度大于MIC,菌体生长被完全抑制,从而形成透明抑菌圈;透明抑菌圈之外的一定区域,指示菌在样品抗菌成分扩散到之前,已形成肉眼可见的菌落,当样品抗菌成分扩散到该区域后,且该区域样品抗菌成分浓度大于MIC,菌体被杀死,不能被TTC染色,形成白色菌圈;白色菌圈之外的区域,由于样品抗菌成分浓度小于MIC,指示菌生长不能被抑

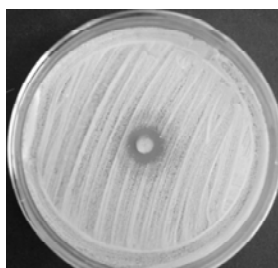


图1 未喷 TTC 之前土槿皮乙醇浸膏样品对酿酒酵母抑菌圈

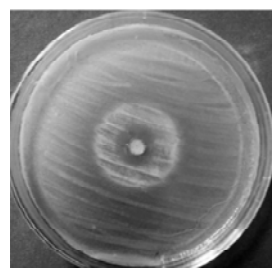
Fig.1 Inhibition zone of pseudolaricis ethanol extract to *saccharomyces cerevisiae* without TTC coloration

图2 喷加 TTC 之后土槿皮乙醇浸膏样品对酿酒酵母抑菌圈

Fig.2 Inhibition zone of pseudolaricis ethanol extract to *Saccharomyces cerevisiae* with TTC coloration

表1 扩散对中药乙醇浸膏抑菌活性判读的影响

Table 1 Effects of ethanol extracts diffusion to inhibition zone

样品	时间 (h)	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		透明圈 直径(cm)	实际抑菌圈 直径*(cm)	透明圈 直径(cm)	实际抑菌圈 直径*(cm)
丁香	0	0.9	1.3	0.7	1.0
	0.5	1.0	1.3	0.7	1.0
	1	1.0	1.3	0.8	1.0
	1.5	1.1	1.3	0.8	1.0
	2	1.3	1.3	0.9	1.0
土槿皮	0	0	0.8	1.2	2.6
	0.5	0.6	0.8	1.4	2.6
	1	0.6	0.8	1.4	2.6
	1.5	0.7	0.8	1.6	2.6
	2	0.7	0.8	1.6	2.6
藿香	0	0.8	1.0	0.8	2.7
	0.5	0.8	1.0	0.9	2.7
	1	0.9	1.0	1.0	2.7
	1.5	0.9	1.0	1.0	2.7
	2	1.0	1.0	1.2	2.7
陈皮	0	0.7	1.2	0	1.4
	0.5	0.9	1.2	0.6	1.4
	1	1.0	1.2	0.6	1.4
	1.5	1.2	1.2	0.7	1.4
	2	1.2	1.2	0.7	1.4
肉桂	0	0.7	1.5	0.6	1.1
	0.5	0.8	1.5	0.6	1.1
	1	0.8	1.5	0.8	1.1
	1.5	0.9	1.5	0.9	1.1
	2	1.2	1.5	0.9	1.1
丹参	0	0.8	1.4	0	1.2
	0.5	0.8	1.4	0.7	1.2
	1	0.9	1.4	0.7	1.2
	1.5	1.0	1.4	0.9	1.2
	2	1.2	1.4	0.9	1.2

注:实际抑菌圈直径指不能被 TTC 显色的指示菌宽度与透明圈直径之和。

制,菌体可正常生长,可被 TTC 着色。

从表1可以看出,在0h,6种样品对细菌、酵母指示菌大都有双圈现象;土槿皮对细菌指示菌,丹参、陈皮对酵母指示菌都未产生透明抑菌圈,喷加TTC后,出现未被着色的白色菌圈,即假阴性结果。所以,TTC显色K-B法可校正现行K-B法在检测天然产物抗菌活性

中产生的误差,提高了K-B法的准确性和可靠性,抑菌效果直观易辨,可操作性强。

2.2 产生双圈现象的物质基础

从表2可以看出,样品中抗菌活性成分分布在非极性、弱极性、中极性和大极性部位中的一相或其中几相中,抗菌活性成分,土槿皮仅存在于乙酸乙酯相中,丁香、藿香和肉桂存在于石油醚和乙酸乙酯两相中,陈皮存在于乙醚和乙酸乙酯两相中,丹参存在于石油醚、乙醚和乙酸乙酯三相中。抗真菌活性成分,陈皮存在于石油醚相中,藿香存在于乙酸乙酯相中,丁香和丹参存在于石油醚和乙醚两相中,肉桂存在于石油醚和乙酸乙酯两相中,土槿皮存在于石油醚、乙醚和乙酸乙酯三相中。石油醚非极性相中的抗菌成分产生的透明抑菌圈与它们实际抗菌活性差距最大,乙醚弱极性相中的抗菌成分产生的透明抑菌圈与它们实际抗菌活性差距次之,乙酸乙酯中极性相中的抗菌成分产生的透明抑菌圈与它们实际抗菌活性差距再次之,极性最大的萃余相中的抗菌成分产生的透明抑菌圈与它们实际抗菌活性相当,这是由于不同极性成分在培养基上的扩散速度不同,极性越小,扩散速度越慢,其产生的透明抑菌圈大小与实际抑菌能力相差越大,此时,以透明抑菌圈判读样品抗菌能力的常规做法的所得结果就越小于真实值。当抗菌样品的扩散速度很慢时,则不产生透明抑菌圈,喷加TTC后,可产生白色菌圈,即产生假阴性结果。当抗菌样品的扩散速度很快时,则不会产生白色菌圈,只产生透明抑菌圈,此时,透明抑菌圈反映样品真实抗菌能力。所以,抗菌样品的扩散速度,对透明抑菌圈能否准确反映天然产物样品的抗菌活性起着决定性作用。

2.3 扩散对透明抑菌圈的影响

从表1可以看出,在0h,虽然土槿皮对细菌指示菌,丹参、陈皮对酵母指示菌并未表现出透明抑菌圈,但随着低温扩散时间的增加,产生了透明抑菌圈,且在0~2h范围内,6种药用植物样品对细菌和真菌指示菌的透明抑菌圈,随着低温扩散时间的增加,透明抑菌圈的直径有一个逐渐增加的趋势。在2h,丁香、藿

表2 中药乙醇浸膏不同极性部位的抗菌活性
Table 2 Antibacterial activity of different locum of ethanol extracts

样品	部位	<i>Bacillus subtili</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		透明圈	实际抑菌圈	透明圈	实际抑菌圈
		直径(cm)	直径(cm)	直径(cm)	直径(cm)
丁香	石油醚相	0	1.2	0.8	1.2
	乙醚相	0	0	0.9	1.1
	乙酸乙酯相	1.2	1.4	0	0
	苯余相	1.0	1.0	0	0
土槿皮	石油醚相	0	0	0	2.3
	乙醚相	0	0	0.9	2.5
	乙酸乙酯相	0.7	0.8	1.8	2.6
	苯余相	0	0	0	0
藿香	石油醚相	0.7	1.4	0.7	2.7
	乙醚相	0	0	0	0
	乙酸乙酯相	0.9	1.5	0	0
	苯余相	0	0	0	0
陈皮	石油醚相	0	0	0	0
	乙醚相	0.6	1.1	0	1.4
	乙酸乙酯相	0.7	0.9	0	0
	苯余相	0	0	0	0
肉桂	石油醚相	0.8	1.6	0.6	1.3
	乙醚相	0	0	0	0
	乙酸乙酯相	0.6	0.9	0.7	0.8
	苯余相	0	0	0	0
丹参	石油醚相	0.8	1.2	0	1.4
	乙醚相	1.0	1.3	0.7	1.4
	乙酸乙酯相	0.6	0.7	0	0
	苯余相	0	0	0	0

注：实际抑菌圈直径指不能被 TTC 显色的指示菌宽度与透明圈直径之和。

香、陈皮对细菌指示菌的透明抑菌圈增大到与它们实际抑菌圈直径相同的大小，而 6 种样品对酵母指示菌的透明抑菌圈都小于它们实际的抑菌能力，这一现象与它们抗菌成分在不同极性部位的分布是相对应的。在相同的扩散时间内，非极性、小极性抗菌成分扩散不足，而中、大极性的抗菌成分可能扩散过度，所以，由于不同样品中的天然抗菌活性成分极性及其组成不同，以增加扩散时间来提高 K-B 法准确性的措施，在实际操作中很难准确把握，是不可取的。

3 讨论

K-B 法原本是临床常用的药敏试验检测方法，它的检测对象是水溶性很好的药品，在培养基上扩散速度快，不会出现双圈现象。而从天然产物抗菌成分研究情况看，具有抗菌活性的成分大都存在于乙醇等有机溶剂的提取物中，其中不乏极性较弱的抗菌成分^[4-6]，因此，完全照搬 K-B 法药敏试验做法，对天然产物乙醇等有机溶剂的提取物进行抗菌活性筛选、检测，或者对天然产物不同极性部位进行抗菌活性追踪^[7-8]，势必会低估非极性、弱极性乃至中极性天然抗菌成分的抗菌活性，甚至造成漏筛，所以，在使用 K-B 法、管碟法和打孔法等以样品扩散为基本原理的抗菌研究方法时，都应考虑到样品的极性和扩散速度问题。

4 结论

分析了天然抗菌成分扩散速度对现行 K-B 法检测抗菌活性结果的影响以及产生误差的物质基础。提出了 TTC 显色的改进方法，以透明抑菌圈部分和不能被 TTC 染色的白色菌圈部分之和，代替透明抑菌圈判读天然产物抗菌活性，改变了判读标准，从根本上解决了天然抗菌产物扩散速度对检测结果的影响，消除了试验误差，使改进后的方法适于天然抗菌活性成分的检测。

参考文献：

- [1] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册[M]. 北京：中国科学技术出版社，1992：189-190.
- [2] HOLETZ F B, PESSINI G L, SANCHES N R, et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002, 97(7): 1027-1030.
- [3] 李桂生. 细菌总数测定方法的改进[J]. 微生物学通报, 1979, 6(6): 22-25.
- [4] 卢成英, 徐东翔, 杜勇, 等. 槲木叶抑菌活性成分提取分离及活性检测[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 740-742.
- [5] 纪莉莲, 张强华, 崔桂友, 等. 柿叶抗菌活性的研究及活性成分的分离鉴定[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 129-131.
- [6] 周建新, 嵇美华, 汪海峰, 等. 花生壳乙醇提取物 (EEPH) 抗菌性的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 64-65.
- [7] 马小军, 赵玲, 杜程芳, 等. 滇白珠提取物抗细菌活性的筛选[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(4): 223-225.
- [8] 王跃华, 徐文俊, 何俊蓉, 等. 川黄柏离体培养及药用成分的抑菌试验研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(10): 1002-1003.