

枸杞提取液对球形红细菌生长的影响

杜文婷^{1,2}, 韩宝龙¹, 刘亚妮¹, 李建文¹, 李 军¹, 杨官娥^{1*}

1. 山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001

2. 寿阳县第二人民医院, 山西 寿阳 035400

摘要: **目的** 考察枸杞提取液对球形红细菌生长的影响。 **方法** 在不同质量浓度的常规培养基中添加不同质量浓度的枸杞提取液, 培养球形红细菌, 比较球形红细菌的活菌数、生长曲线和脱氢酶活性, 考察枸杞提取液对球形红细菌生长的影响。 **结果** 在培养基中添加枸杞提取液可缩短球形红细菌生长延迟期, 使其提前进入指数期和稳定期; 当质量浓度为 12.5 g/L 时, 球形红细菌活菌数增加到之前的 1.5 倍, 使球形红细菌脱氢酶活性提高到之前的 3.3 倍。 **结论** 培养基中添加一定量的枸杞提取液可以促进球形红细菌的生长, 使球形红细菌生长周期缩短、活力提高。

关键词: 枸杞; 光合细菌; 球形红细菌; 脱氢酶活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2014)01 - 0036 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.01.008

Effects of *Lycium barbarum* extract on growth of *Rhodobacter sphaeroides*

DU Wen-ting^{1,2}, HAN Bao-long¹, LIU Ya-ni¹, Li Jian-wen¹, Li Jun¹, YANG Guan-e¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. Second People's Hospital of Shouyang County, Shouyang 035400, China

Abstract: Objective To study the effects of *Lycium barbarum* extract on the growth of *Rhodobacter sphaeroides*. **Methods** Adding *L. barbarum* extract into general culture medium at different concentration, the effects of *L. barbarum* extract on the growth of *R. sphaeroides* were investigated by culturing *R. sphaeroides* and comparing living *R. sphaeroides* bacteria number, growth curve, and dehydrogenase activity. **Results** After adding *L. barbarum* extract into the culture medium, the growth delay period of *R. sphaeroides* was shortened and the exponential and stationary periods were advanced. When the concentration of *L. barbarum* extract was 12.5 g/L, the number of living *R. sphaeroides* was increased in 1.5 times, and the dehydrogenase activity of *R. sphaeroides* was improved in 3.3 times as much as before. **Conclusion** When *L. barbarum* extract is added into the culture medium, the growth and the activity of *R. sphaeroides* could be improved, and the growth cycle could be shortened.

Key words: *Lycium barbarum* L.; photosynthetic bacteria; *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff, Truper et Pfennig; dehydrogenase activity

光合细菌分布广泛, 遍及江河、沼泽、湖泊和海洋等, 具有固氮、制氢、固碳、脱硫等作用^[1], 广泛应用于水产养殖、畜禽饲养、新能源生产、环境保护及保健品等方面^[2]。球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff, Truper et Pfennig 为光合细菌紫色非硫菌群红细菌属, 可以转化中药中的部分成分^[3-4]。本课题组前期研究表明, 经球形红细菌转化的枸杞提取液中枸杞多糖等成分发生了一定

变化, 明显提高了对铅中毒小鼠排铅、抗氧化等作用; 另外研究了几种中药对球形红细菌生长的影响, 影响规律各不相同^[5-6]。本实验考察了枸杞提取液对球形红细菌生长的影响, 对球形红细菌转化枸杞提取液排铅、抗氧化作用机制提供理论依据。

1 实验药材与仪器

1.1 材料

枸杞购自亳州市国苑中药材饮片有限公司, 为

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173473); 山西省自然科学基金资助项目 (2010011048-2); 太原市科技项目人才专项明星课题项目 (120247-08); 山西医科大学青年基金 (02201128, 02201124)

作者简介: 杜文婷, 女, 研究方向为天然药物化学。Tel: 13027041521 E-mail: 349726398@qq.com

*通信作者 杨官娥, 教授, 从事天然药物化学及生物转化研究。Tel: (0351)4690143 E-mail: yangguane@hotmail.com

茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实。球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff, Truper et Pfennig 是光合细菌系紫色非硫菌群红细菌属, 由山西大学光合细菌研究室分离、鉴定、保藏^[5]。

培养基配方: 乙酸钠 1 640 mg、酵母膏 1 000 mg、CaCl₂•2H₂O 75 mg、EDTA 20 mg、K₂HPO₄ 900 mg、KH₂PO₄ 600 mg、MgSO₄•7H₂O 200 mg、FeSO₄•7H₂O 11.8 mg、(NH₄)₂SO₄ 1 320 mg、微量元素 1 mL、去离子水定容至 1 L, 调 pH 值为 7.0, 分装, 121 °C 灭菌 25 min。

1.2 仪器

YS100 型显微镜(日本尼康公司), RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), 超净工作台(上海新苗医疗器械有限公司), HH-2 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司), DL-5-B 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂), 752 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 对球形红细菌生长的影响

称取枸杞 450 g, 剪碎, 加 10 倍量水 70 °C 水浴提取 1 h, 双层纱布滤过, 滤渣加入 8 倍量水 70 °C 水浴提取 1 h, 双层纱布滤过, 合并两次滤液, 旋蒸浓缩到 287.5 mL。分别取 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、64 mL 枸杞浓缩液到注射瓶中, 加常规培养基至 100 mL, pH 值调至 7.0, 即制得质量浓度为 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、1 000 g/L 的全量常规培养液。分别取上述同样体积浓缩液, 加双蒸水至 100 mL, pH 值调至 7.0, 即制得同质量浓度的无常规培养液。分别取上述 1/2 体积浓缩液, 加常规培养液至 100 mL, pH 值调至 7.0, 即制得同质量浓度半量常规培养液。所有培养液及实验仪器 121 °C 高温灭菌 25 min, 然后置于超净工作台上紫外线灭菌 30 min, 无菌条件下接入 1/5 体积的球形红细菌菌液, 平行样品 3 次。培养 3、4、5 d 时, 用血球计数法测定菌液活菌数。实验数据取 3 个平行样品的平均值。

在全量常规培养基中培养 3 d 时, 枸杞质量浓度由 3.125 g/L 到 6.25 g/L 时, 球形红细菌活菌数由 1.64×10^9 /mL 增加到 3.89×10^9 /mL; 随着枸杞质量浓度由 6.25 g/L 增加到 1 000 g/L 时, 球形红细菌活菌数由 3.89×10^9 /mL 降为 8.8×10^8 /mL; 枸杞质量浓度在 12.5~1 000 g/L 时, 球形红细菌活

菌数低于原球形红细菌培养液活菌数 1.64×10^9 个, 说明在全量常规培养基中随着枸杞质量浓度的增加, 对球形红细菌的生长表现为先促进后抑制的作用, 当质量浓度为 12.5 g/L 时, 基本和原菌液菌数相同, 当质量浓度继续增加时, 表现为比较强的抑制作用。半量常规培养基和全量培养基规律基本相同, 但活菌数普遍低于全量常规培养基。在无常规培养基条件下, 枸杞提取液对球形红细菌活菌数影响不明显。当枸杞药材质量浓度达到 25 g/L 时, 活菌数达到一个稳定的值。

球形红细菌培养 4 d 时, 全量培养液和半量培养液的趋势与 3 d 时基本相同。在全量培养液中, 4 d 时原菌液活菌数增长到 4.49×10^9 个, 半量培养液中原菌液活菌数增长到 2.91×10^9 个, 无常规培养基在所有枸杞质量浓度下均表现为抑制作用, 并且随着枸杞质量浓度增加, 抑制作用越明显。培养 5 d 时, 趋势与 4 d 时基本相同, 说明全量常规培养液为合适的培养液, 当枸杞提取液质量浓度在 3.125~6.25 g/L 时最适合球形红细菌生长。当枸杞药材质量浓度达到 25 g/L 时, 活菌数亦达到一个稳定的值。见图 1。

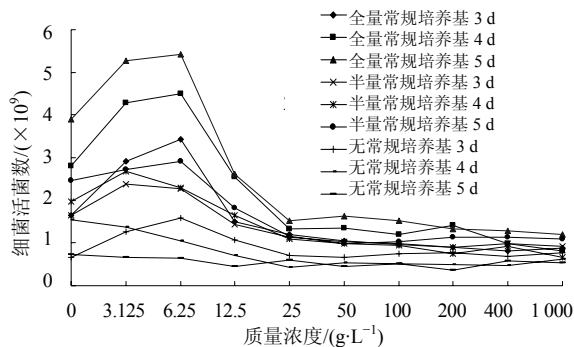


图 1 枸杞取液对球形红细菌活菌数的影响

Fig. 1 Effect of *L. barbarum* extract on number of living *R. sphaeroides*

2.2 对球形红细菌生长曲线的影响

称取枸杞 460 g, 剪碎, 加 10 倍量水 70 °C 水浴提取 1 h, 双层纱布滤过, 滤渣加入 8 倍量水 70 °C 水浴提取 1 h, 双层纱布滤过, 合并两次滤液, 旋蒸浓缩至 714 mL。分别取 0、1、2、32 mL 浓缩液到注射瓶中, 加常规培养基到 100 mL, pH 值调至 7.0, 每个样品平行 21 份。所有培养液及实验仪器 121 °C 高温灭菌 25 min, 然后置于超净工作台上紫外线灭菌 30 min, 无菌条件下接入 1/5 体积的球形红细菌菌液, 平行样品 3 次。从接种时开始计时, 每隔 6 h

取各浓度 1 份，用血球计数法测定菌液活菌数，实验数据取 3 个平行样品的平均值。

为初步探索其影响生长机制，在常规培养基，6.25、12.5、200 g/L 枸杞全量常规培养基条件下，制作球形红细菌生长曲线，见图 2。光合细菌在常规培养基中延迟期约为 24 h，以后为指数期，约 60 h 进入稳定期；6.25、12.5 g/L 全量常规培养基中球形红细菌几乎没有延迟期，直接进入指数期，约 50 h 进入稳定期；200 g/L 全量常规培养基中球形红细菌亦没有延迟期，直接进入指数期，约 50 h 进入稳定期，但是细菌数量低于全量常规培养基，这些实验结果说明低质量浓度枸杞提取液适合光合细菌的生长，可使其生长周期缩短，跳过延迟期提前进入指数期，菌数大约 1.5 倍的增加；高质量浓度枸杞提取液可以抑制球形红细菌的生长。

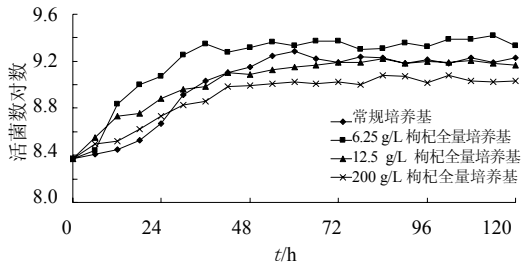


图 2 枸杞提取液对球形红细菌生长曲线的影响
Fig. 2 Effect of *L. barbarum* extract on growth curve of *R. sphaeroides*

2.3 对球形红细菌脱氢酶活性的影响

2.3.1 固定化培养 将已培养好的球形红细菌培养液在 5 000 r/min 下离心 30 min，菌体用生理盐水洗涤 2 次，收集湿菌体。将最终浓度 10% 的聚乙烯醇 (PVA) 加水加热溶解，冷却到 35 °C，加入终浓度为 30% 的湿菌体，搅匀，注射器滴入 pH 值为 6.5 (用 NaOH 调节) 的饱和硼酸水溶液，形成 3 mm 左右的固定化球形红细菌小球，将形成的小球放入 4 °C 冰箱中固定化 24 h^[7-8]。取 5 g 接种于质量浓度分别为 0、6.5、12.5、200 g/L 枸杞提取液全量常规培养基中，培养 3 d 即得固定化球形红细菌。

2.3.2 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 标准曲线制备 称取 TTC 100 mg 于 100 mL 量瓶中定容，得 1 mg/mL 储备液。分别取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 储备液加到 10 mL 量瓶中定容，得 20、40、60、80、100、120 μg/mL 系列工作液。取 1 mL 0.36% Na₂SO₃、3 mL Tris-HCL (pH 8.4)、1 mL 水、1 mL 不同质量浓度 TTC 溶液于离心管中，混匀，空白对照不加

TTC，(37±1) °C 恒温水浴震荡培养，30 min 后加入 0.6 mL 甲醛溶液，4 800 r/min 离心 5 min，弃去上清液，向每支离心管中加入 80% 丙酮 3 mL，搅拌均匀，在 (37±1) °C 条件下水浴震荡 10 min，离心 5 min，分别取其上清液，用紫外分光光度仪于波长 485 nm 处测吸光度 (A) 值，得标准曲线方程 $A=0.0116C+0.0203$ ($r=0.9939$)。

2.3.3 脱氢酶活性的测定 采用 TTC 法，取上述固定化细菌，剪碎，用蒸馏水洗 3 次，分别加入 9 mL Tris-HCL (pH 8.4)、3 mL 0.4% TTC、3 mL 0.36% Na₂SO₃、3 mL 水，混匀，(37±1) °C 恒温水浴震荡培养，5 min 后用吸管迅速吸取 6 mL 培养液置于 10 mL 离心管中，加入 0.6 mL 甲醛溶液，作为空白对照。样品培养时间从吸出 6 mL 培养液时开始计时，培养 30 min 后，加入 1.2 mL 甲醛溶液混合均匀，与空白对照一起 4 800 r/min 离心 5 min，弃去上清液，向每支离心管中加入 6 mL 80% 丙酮，搅拌均匀，在 (37±1) °C 条件下水浴震荡 10 min，离心 5 min，分别取其上清液，485 nm 波长处进行比色分析，将所测 A 值代入标准曲线方程，计算样品的 TTC-脱氢酶活性。以每小时每毫升球形红细菌菌液产生的 TF 为 1 个活力单位。实验重复 3 次，取平均值^[6,9]。

固定化球形红细菌脱氢酶活性在质量浓度为 6.25、12.5 g/L 枸杞提取液中分别是常规培养液中的 3.3、2.6 倍，200 g/L 枸杞提取液中固定化细胞脱氢酶活性比常规培养液中稍有降低。见表 1。

表 1 枸杞提取液对球形红细菌脱氢酶活性的影响
Table 1 Effect of *S. miltiorrhiza* extract on dehydrogenase activity of living *R. sphaeroides*

质量浓度/(g·L ⁻¹)	A 值	TF 的浓度/(μg·mL ⁻¹ ·h ⁻¹)
0	1.114	94.28
6.25	3.635	311.61
12.5	2.904	248.59
200	0.920	77.56

3 讨论

枸杞多糖是枸杞水提取液的主要成分，枸杞多糖可以抑制常见细菌和霉菌 (大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、产黄青霉) 的生长^[10]。本实验中，一定质量浓度的枸杞提取液可用作球形红细菌的生长促进剂，但是高质量浓度的枸杞提取液反而可以抑制其生长，另外，枸杞提取液不能作

为球形红细菌的唯一培养基。脱氢酶反映活性微生物量及其对污染物的降解活性,是微生物用于生物合成和维持细胞的生命活动的一类酶^[11]。脱氢酶活性测定结果显示,低质量浓度枸杞提取液可以提高球形红细菌的脱氢酶活性,高质量浓度枸杞提取液对球形红细菌脱氢酶活性有一定影响,但影响不大;由此推测一定质量浓度枸杞提取液的加入可能会转化枸杞多糖,从而改变细菌的代谢途径,影响其脱氢酶同工酶的生成。

本实验仅研究枸杞提取液对球形红细菌生长的影响,但是具体影响机制还有待进一步研究。在生物转化中,枸杞提取液质量浓度要根据情况而定。在3.13~6.25 g/L枸杞提取液全量常规培养基条件下,球形红细菌菌体增加、培养周期缩短,这可以应用于饲料、肥料的生产中;但是用于生物转化制备排铅制剂时,不仅要考虑枸杞提取液对球形红细菌活菌数的影响,同时还要考虑对枸杞生物转化及排铅、抗氧化活性的影响。

参考文献

- [1] Wu J, Bauer C E. RegB/RegA, a global redox-responding two-component system [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 631: 131-148.
- [2] 何若天. 光合细菌在种植业上的应用研究进展 [J]. *广西农业生物科学*, 2007, 26(1): 76-82.
- [3] 曾宇, 段巧红. 利用光合细菌发酵转化麸皮 [J]. *生物技术*, 2001, 11(5): 44-46.
- [4] 王兴红, 李祺德, 曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容 [J]. *中草药*, 2001, 32(3): 267-268.
- [5] 杨官娥, 张肇铭, 王玉军, 等. 槲寄生对光合细菌生长的促进作用 [J]. *中草药*, 2006, 37(8): 1241-1244.
- [6] 张辉, 李建文, 宋艳红, 等. 丹参提取液对球形红细菌生长的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(7): 1413-1416.
- [7] 侯晓峰, 郑庆红, 漆小梅, 等. 球形红细菌生物转化槲寄生中总三萜类化合物的测定 [J]. *中国医药导报* 2011, 35(3): 29-31.
- [8] 刘建红. 混凝吸附-固定化光合细菌处理垃圾渗滤液的研究 [D]. 太原: 山西大学, 2004.
- [9] 周春生, 尹军. TTC-脱氢酶活性检测方法的研究 [J]. *环境科学学报*, 1996, 16(4): 400-405.
- [10] 李瑜, 周玉, 江冠民, 等. 徐芳菲枸杞多糖与黄芪多糖抑菌活性的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 26(3): 5061-5063.
- [11] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭, 等. 环境工程微生物检验手册 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 163-165.