

鼠尾藻中褐藻多酚化合物的抑菌活性研究

林超¹, 于曙光², 郭道森¹, 魏玉西¹, 艾桂花¹

(1. 青岛大学 生物系, 山东 青岛 266071; 2. 莱阳农学院 应用化学系, 山东 莱阳 266109)

摘要: 采用平板生长抑制法对鼠尾藻(*Sargassum thunbergii* Kuntze)中多酚化合物的抑菌活性进行研究。结果表明, 在一定浓度范围内试样对除大肠杆菌外的受试菌均有较明显的抑菌活性, 抑菌活性的大小与多酚浓度和分子质量密切相关。其中, 透析内液对溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和鳃弧菌(*V. anguillarum*)、透析外液对鳃弧菌和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)的抑制效果尤其明显。

关键词: 鼠尾藻(*Sargassum thunbergii* Kuntze); 褐藻多酚; 平板生长抑制法; 抑菌活性
中图分类号: O669 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)03-0094-04

在中国沿海品种纷繁的经济资源中, 海藻中褐藻门是藻类中比较高级的一大类群。由于其具有个体大、产量高、分布广等特点, 使之成为中国三大经济海藻之一。其中, 马尾藻属鼠尾藻, 因具有软坚散结、利尿消肿、消热化痰之功效, 已被收录于《中国海洋药物辞典》, 主治淋巴结核、淋病、甲状腺肿大、心绞痛等症^[1]。国内外学者对其所含的多糖及挥发性组分已有诸多报道^[2-4], 对其所含多酚化合物生物活性的报道仅见抗氧化活性等, 而对其抑菌活性却鲜有报道。作者探索了从鼠尾藻中提取的褐藻多酚对革兰氏阳性菌(枯草杆菌、金黄色葡萄球菌)和革兰氏阴性菌(大肠杆菌、鳃弧菌、溶藻胶弧菌、副溶血弧菌)的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海藻

新鲜鼠尾藻(*Sargassum thunbergii* Kuntze)2004年6~7月份采集于青岛太平角潮间带。由中国科学院海洋研究所陆保仁研究员鉴定。采集后, 除去附生生物, 淡水冲净后冷冻保存。用前取出解冻。

1.1.2 供试菌种

革兰氏阳性细菌: 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 革兰氏阴性细

菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 鳃弧菌(*V. anguillarum*), 溶藻胶弧菌(*V. alginolyticus*)。前3种菌由青岛大学生物系微生物实验室提供, 于37℃下牛肉膏蛋白胨琼脂培养基活化; 后3种由中国水产科学院黄海水产研究所提供, 于27℃下ZoBell 2216E琼脂培养基活化。

1.2 方法

1.2.1 多酚化合物的提取

取新鲜藻体顶部, 用组织捣碎机破碎, 用85%乙醇溶液室温避光提取12h得粗提液。海藻与乙醇溶液用量约为1:2(g/mL)经减压蒸馏除去乙醇后, 过滤, 所得滤液分别用1/2体积乙醚和氯仿各洗涤两次, 静置分层。弃去有机相, 水相减压蒸馏(浓缩)醇析(除甘露醇)再减压蒸馏(除乙醇)后, 得褐藻多酚精提液^[1,4]。将此精提液对蒸馏水透析, 透析内、外液分别经减压浓缩得褐藻多酚精提液和。用AOAC(1970)的标准分析方法, 即用Folin-Denis试剂在碱性条件下与多酚类物质形成蓝色复合物后,

收稿日期: 2005-03-14; 修回日期: 2005-07-08

基金项目: 山东省中青年科学家科研奖励基金

作者简介: 林超(1979-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学; 魏玉西, 通讯作者, E-mail: weiyuxi@sohu.com

在 $\lambda = 709 \text{ nm}$ 处作比色分析,以间苯三酚为标准绘制标准曲线,由此计算出褐藻多酚的相对含量^[5]。将和 分别配成一定浓度溶液,即为供试样品,4 保存。由于透析外液可能含有氯化钠和甘露醇等小分子化合物,故配制 5%氯化钠和 3%甘露醇作对照()。实验前,取各供试样品经 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径无菌过滤器过滤除菌,用于以下实验。

1.2.2 培养基制备

牛肉膏蛋白胨琼脂^[6]:牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2。该培养基用于培养枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌;ZoBell2216E 琼脂^[7]:蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸铁 0.1 g, 琼脂 15 g, 过滤陈海水 1 000 mL, 调 pH 至 7.6~7.8。该培养基用于培养副溶血弧菌、鳃弧菌和溶藻弧菌。

1.2.3 含供试细菌平板的制备

取活化好的菌种,枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌用无菌水,副溶血弧菌、鳃弧菌和溶藻弧菌用无菌海水,制成一定密度($10^8 \sim 10^9 \text{ cfu/mL}$)的菌悬

液。取菌悬液 0.2 mL,加至无菌平皿中,立即倒入溶化后冷却至 45 左右的培养基 15 mL,随即快速而轻巧地晃动平皿,使菌液与培养基充分混均后平置,备用。

1.2.4 抑菌活性测定

主要参照 Bulet 等的平板生长抑制法(Plate Growth Inhibition Assay)^[8]进行。用无菌玻璃吸管在含菌平板上打直径 3 mm 的孔穴,每孔穴加样品 10 μL ,每一样品加 2 个孔穴,平行做 3 组。加样后,枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌置于 37 培养 24 h,量取抑菌圈直径(扣除所打孔径);副溶血弧菌、鳃弧菌和溶藻弧菌置于 28 培养 48 h,量取抑菌圈直径(扣除所打孔径),取所测的抑菌圈直径的平均值。

2 结果与讨论

鼠尾藻中褐藻多酚化合物对受试菌的抑菌效果实验结果见表 1、图 1 和图 2。

表 1 不同浓度的褐藻多酚抑菌效果

Tab. 1 Antibacterial activity of different concentrations of phlorotannins samples

样品	质量浓度 (mg/L)	抑菌圈直径 (mm)					
		枯草杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	溶藻胶弧菌	鳃弧菌	副溶血弧菌
	4 800	5	6	-	6	8	4
	3 600	2	3	-	5	6	2
	2 400	-	-	-	3	3	2
	13 000	6	10	2	3	10	6
	6 500	4	7	-	-	6	4
	3 250	2	5	-	-	5	3
	3%甘露醇	-	-	-	-	-	-
	5%氯化钠	-	-	-	-	-	-

由表 1 可见,就整体而言,随着鼠尾藻中褐藻多酚化合物浓度的升高,其对受试菌的抑制效果也随之提高,而且,透析内液与透析外液相比其活性更强,说明鼠尾藻中褐藻多酚化合物的抑菌活性与其分子量大小、浓度密切相关。鼠尾藻的褐藻多酚化合物的透析内液(高分子量部分)在一定的浓度下,对除大肠杆菌外的其它供试细菌都有着较明显的抑菌活性,

对金黄色葡萄球菌(图 1)和两种海洋菌——溶藻胶弧菌和鳃弧菌(表 1,图 2)的抑制效果尤其明显。当浓度降至 2 400 mg/L 时,对供试枯草杆菌和金黄色葡萄球菌均失去抑菌活性,但是对溶藻胶弧菌、鳃弧菌和副溶血弧菌 3 种海洋菌仍保留一定活性;鼠尾藻的褐藻多酚化合物的透析外液(低分子量部分)对革兰氏阳性菌有较强的抑菌活性,对革兰氏阴性菌的

抑制作用亦因菌种而异,对大肠杆菌和溶藻胶弧菌的抑制作用在多酚化合物的质量浓度高达 13 000 mg/L 才显现出来(表 1,图 1),而对鳗弧菌和副溶血弧菌则有着较强的抑制作用(表 1,图 2)。另外,本实验

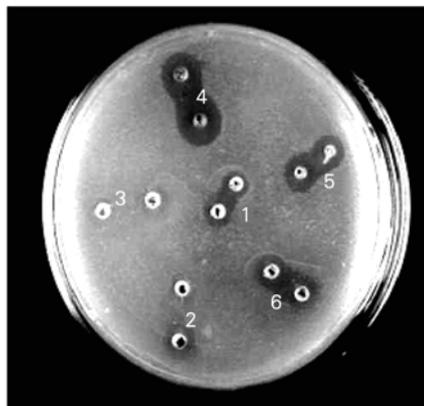


图 1 鼠尾藻中褐藻多酚化合物对金黄色葡萄球菌的抑制效果

Fig. 1 Inhibition of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* Kuntze on *Staphylococcus aureus*

1. 4 800 mg/L; 2. 3 600 mg/L; 3. 2 400 mg/L; 4. 13 000 mg/L;
5. 6 500 mg/L; 6. 3 250 mg/L

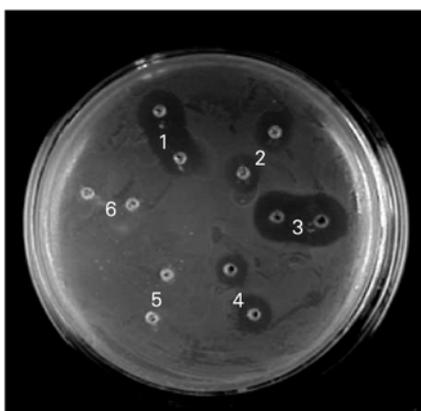


图 2 鼠尾藻中褐藻多酚化合物对鳗弧菌的抑制效果

Fig. 2 Inhibition of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* Kuntze on *Vibrio anguillarum*

1. 4 800 mg/L; 2. 3 600 mg/L; 3. 13 000 mg/L; 4. 6 500 mg/L;
5. 5%NaCl; 6. 3%甘露醇

设计中同时以 5%氯化钠和 3%甘露醇作对比,证实其对于 6 种供试细菌均无抑制作用,因而排除了其在透析外液中存在而影响抑菌活性的可能。结果表明,鼠尾藻中褐藻多酚化合物的透析内外液对受试革兰氏阳性菌及阴性菌均有一定的抑制作用,对海洋致病弧菌的抑制作用尤其显著。

细菌性疾病是水产养殖中最常见、最严重的病害之一。细菌性疾病为继发性疾病,弧菌是最主要的病原菌,包括副溶血弧菌、鳗弧菌、溶藻胶弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌等^[9]。鱼体感染后表现为出血和溃烂症状;对虾感染后即患红腿病、幼体菌血症、烂眼病、褐斑病甲壳溃疡病、烂鳃病等。一旦爆发感染,可在短期内出现鱼虾大批死亡,从而给养殖业造成重大损失。因此,作者的研究结果对利用海洋天然产物防治海产动物病害,提高养殖品种的抗病力具有重要意义。

参考文献:

- [1] 魏玉西,徐祖洪. 褐藻中高分子质量褐藻多酚的抗氧化活性研究[J].中草药,2003,34(4):317-319.
- [2] 俞丽君,张尔贤. 海藻多糖的实验研究 鼠尾藻褐藻多糖的分离与纯化[J].汕头大学学报,1990,5(1):55-58.
- [3] 张尔贤,俞丽君. 鼠尾藻多糖清除氧自由基作用的研究[J].中国海洋药物,1997,3:1-4.
- [4] 魏玉西,于曙光. 两种褐藻乙醇提取物的抗氧化活性研究[J].海洋科学,2002,26(9):49-51.
- [5] 严小军. 中国常见海藻的多酚含量测定[A].中国科学院海洋研究所.海洋科学集刊[C].北京:科学出版社,1996.61-65.
- [6] 沈萍,范秀容. 微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1999.214-230.
- [7] 张士瑾,范晓. 海洋生物技术原理和应用[M].北京:海洋出版社,1998,10-11.
- [8] Bulet P, Cociancich S, Dimarcq J, et al. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family[J]. J Biol Chem, 1991, 266(36): 24 520-24 525.
- [9] 牟海津,刘志鸿. 水产病原菌胞外产物研究进展[J].中国水产科学,2000,7(2):93-95.

The antibacterial activity of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* Kuntzze

LIN Chao¹, YU Shu-guang², GUO Dao-sen¹, WEI Yu-xi¹, AI Gui-hua¹

(1. Biological Department of Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. Department of Applied Chemistry of Laiyang Agricultural College, Qingdao 266109, China)

Received: Mar., 14, 2005

Key words: *Sargassum thunbergii* Kuntze; phlorotannins; plate growth inhibition assay; antibacterial activity

Abstract: The antibacterial activity of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* Kuntze was investigated by means of Plate Growth Inhibition Assay. The results showed that the phlorotannins can inhibit the growth of tested bacteria remarkably except *Escherichia coli*, and the effect was closely related to their concentration and molecular-weight. Among them, the inhibition of the high molecular-weight part of phlorotannins on two kinds of marine bacteria—*Vibrio anguillarum* and *V. alginolyticus*, the low molecular-weight parts of phlorotannins on two kinds of marine bacteria — *V. parahaemolyticus* and *V. anguillarum*, were especially striking.