

## 不同实验方法检测常用有机溶剂对细菌活性的影响及其安全使用限量

常晓杰 徐颖超 刘畅\*

(锦州医科大学药学院 辽宁 锦州 121001)

**摘要:**【目的】采用不同实验方法测定常用有机溶剂二甲基亚砜(DMSO)、丙酮和乙醇对细菌活性的影响,以指导抗菌类药物体外抑菌实验所用溶剂的选择和添加限量。【方法】采用常规体外抑菌实验方法(纸片扩散法、肉汤稀释法),并参照生长曲线法检测有机溶剂 DMSO、丙酮和乙醇对大肠杆菌(*Escherichia coli*)及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的抑菌作用,采用扫描电子显微镜(SEM)观察溶剂作用后的细菌形态变化。【结果】3种溶剂对 *E. coli* 和 *S. aureus* 抑菌率达到 20%时,在肉汤稀释法下,DMSO、丙酮、乙醇的浓度(体积比)分别为 1.00%、0.25%、2.00%和 1.00%、1.00%、0.50%;在生长曲线法下,溶剂浓度(体积比)分别为 0.50%、1.00%、0.50%和 1.00%、0.50%、0.50%;而在纸片扩散法下,32% (体积比) DMSO 和 32% (体积比)乙醇对 *E. coli* 产生明显抑菌圈,但 3种溶剂对 *S. aureus* 均无抑菌圈出现。3种方法比较后得出:当 3种溶剂的抑菌率达到 20%时,溶剂浓度(体积比)均低于 0.5%,对细菌整体生长活性影响较小。SEM 结果表明控制溶剂使用限量可有效减少其对 *E. coli* 生长过程的影响。【结论】相对于 DMSO 和丙酮,乙醇对微生物生长繁殖能力的影响更加明显;采用相同浓度有机溶剂时,液态条件下(肉汤稀释法和生长曲线法)微生物受到有机溶剂的影响较大。

**关键词:** 有机溶剂, 体外抑菌实验, 生长曲线法, 抑菌作用

## Effects of common solvent concentrations on bacterial activities

CHANG Xiao-Jie XU Ying-Chao LIU Chang\*

(College of Pharmacy, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effects of common organic solvents of dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone and ethanol on the activities of bacteria for guiding the selection of solvent and addition of its dosage in the antibacterial test *in vitro*. [Methods] Consulting the results of growth curve method, conventional antibacterial tests (disk diffusion method and broth dilution method) were used to determine inhibitory effects of DMSO, acetone and ethanol on the bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The changes of cell morphology after treated by these solvents were

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 2014022037); The Startup Foundation for Doctors of Jinzhou Medical University (No. Y2012B006)

\*Corresponding author: Tel: 86-416-4673196; E-mail: liuchang\_198006@163.com

**Received:** August 06, 2015; **Accepted:** December 04, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 11, 2015

**基金项目:** 辽宁省自然科学基金项目(No. 2014022037); 锦州医科大学博士启动基金项目(No. Y2012B006)

\*通讯作者: Tel: 86-416-4673196; E-mail: liuchang\_198006@163.com

**收稿日期:** 2015-08-06; **接受日期:** 2015-12-04; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-11

studied by scanning electron microscope (SEM). **[Results]** When the solvent inhibitory effects on *E. coli* and *S. aureus* were 20%, the concentration (*V/V*) of solvent DMSO, acetone, ethanol were 1.00%, 0.25%, 2.00% and 1.00%, 1.00%, 0.50% in the broth dilution method, respectively. For the growth curve method, the concentration (*V/V*) of DMSO, acetone, ethanol were 0.50%, 1.00%, 0.50% and 1.00%, 0.50%, 0.50% when 20% inhibitory effects on *E. coli* and *S. aureus* were reached, respectively. 32% (*V/V*) DMSO and 32% (*V/V*) ethanol showed obvious inhibitory rings for *E. coli*, but no inhibitory rings appeared for *S. aureus* in the same concentrations of studied solvents with disk diffusion method. To compare three methods, the inhibitory effects of DMSO, acetone and ethanol were 20% while their concentrations (*V/V*) all were lower than 0.5%; under this condition, effects on the viability of bacteria were slight. SEM showed that limited solvent concentrations could decrease their effects on the growth of *E. coli*. **[Conclusion]** To compare with DMSO and acetone, ethanol showed a stronger effect on growth and reproduction of microorganisms. After treated with the same concentration of medicinal solvent, liquid testing condition, such as broth dilution method and growth curve method, induced the stronger effect on the cells.

**Keywords:** Organic solvents, Antibacterial test *in vitro*, Growth curve method, Inhibitory effects

抗菌药物敏感性实验目前是评价药物抑菌效果的最便捷方式,也是最常用的细菌耐药性测定方法,因其结果重复性好、准确度高,一般被用于新药的初期筛选以及对抗菌药物的临床疗效监测和细菌耐药性的检测<sup>[1-4]</sup>。由于抗菌药物多为难溶于水的大分子有机化合物,因此有机溶剂在临床药物敏感性试验中常被作为药物溶媒使用,使抗菌药物成为可直接供抑菌实验使用的供试液,且因其良好的相溶性使一些有机溶剂在天然药物有效成分的提取中被广泛应用<sup>[5-8]</sup>。然而有机溶剂对微生物细胞的毒害作用可导致细胞膜受损、活性降低,甚至胞体死亡<sup>[9-10]</sup>,且随着其用量的增加可能对高等生物细胞造成一定伤害<sup>[11]</sup>。因此,药物敏感性实验建议采用阴性对照,即采用溶媒进行抑菌检测,以消除实验中溶媒对受试菌体的影响。但近几十年来,愈来愈多种类的有机助溶剂作为溶媒成分在药物提取、合成及后续药敏检测中大剂量的应用,使简单的阴性对照实验已经不足以确保药敏实验的准确性及安全性<sup>[12-14]</sup>。同时,有机助溶剂的用量与毒性关系方面相关研究较少,多侧重于讨论其对微生物细胞膜的影响<sup>[9,15]</sup>,在添加限量方面的讨论不够详尽<sup>[16-17]</sup>,致使目前药敏实验中有有机溶剂的用量不一,没有规范。可见,如何消除有机助溶剂的影响,控制其对菌体及其他有机体的损伤,建立其使用标

准已经成为药敏测试中亟待解决的重要问题。本研究以此为出发点,结合常规体外抑菌实验方法(纸片扩散法、肉汤稀释法),考察3种常用药用溶剂二甲亚砜(DMSO)、丙酮和乙醇的使用剂量对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌株活性的影响。生长曲线法作为毒性检测的常规手段被用以考察实验菌株与有机溶剂长期作用过程中繁殖能力的变化,结合纸片扩散法和肉汤稀释法的实验结果,确定上述3种药用溶剂的使用限量,规范其在药敏实验中的剂量范围。采用扫描电子显微镜(SEM)观察与丙酮作用后的*E. coli*样本,考察有机溶剂对菌体形貌伤害。通过多种手段全面考察有机药用溶剂对菌体活性、繁殖能力及形貌的影响,力图为以后药敏实验中溶剂类别的选择和使用浓度提供更加科学、全面的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌种、主要试剂及仪器

实验室所用的*E. coli*和*S. aureus*由锦州医科大学附属第一医院检验科提供,经驯化后以25%甘油冷冻保存,使用前解冻。

注射用头孢曲松钠(批号313121017),山东罗欣药业集团股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯及常见生化试剂,实验用水为去离子水。

721型可见分光光度计,上海欣茂仪器有限公

司; SYQ-DSX-280B 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械有限公司; SW-CJ-1E 洁净工作台 100 级, 上海博迅实业有限公司; KYC-100B 孵育箱, 上海福马实验设备有限公司。

## 1.2 培养基

Luria-Bertani (LB)培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4±0.2, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

Mueller-Hinton (MH)培养基(g/L): 牛肉浸粉 2.0, 可溶性淀粉 1.5, 酸水解酪蛋白 17.5, 用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.4±0.2, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 待用。MH 固体培养基: 在以上配方中加入琼脂 15.0 g 灭菌。

0.5麦氏比浊管配制方法: 将1.17% BaCl<sub>2</sub> (质量体积比, BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 0.5 mL与1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (体积比) 99.5 mL充分混合, 置螺口试管中于暗处室温保存, 用前混匀, 有效期为6个月。

## 1.3 肉汤稀释法检测3种常用有机溶剂对*E. coli*和*S. aureus*的活性影响

取 10 μL 大肠杆菌甘油溶液于 5 mL 肉汤培养基中活化 4 h, 用 MH 培养基稀释至 0.5 麦氏比浊标准待用。取无菌比浊管 10 支, 采用倍比稀释法调节每支比浊管内菌浓度并加入乙醇, 使乙醇的终浓度(体积比)分别为 32%、16%、8%、4%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.125%, 第 10 支管为对照管, 以蒸馏水代替乙醇。在 37 °C、120 r/min 培育 20 h 后取样, 以 MH 培养基为空白参比, 于 600 nm 下测定样品吸光度, 根据公式(1)计算抑菌率, 估计乙醇对 *E. coli* 活性的影响, 药用溶剂丙酮和 DMSO 对 *E. coli* 活性的影响检测方法同乙醇。

溶剂对细菌活性的影响用抑菌率  $I$  (%)表示:

$$\text{抑菌率 } I (\%) = \frac{A_0 - A_c}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

其中:  $I$  代表药用溶剂对某菌株的抑菌率;  $A_0$  代表空白对照的吸光度值;  $A_c$  代表不同浓度药用溶剂作用下菌悬液的吸光度值。

以肉汤稀释法分别测定 DMSO、乙醇和丙酮对

*S. aureus* 活性影响的实验步骤同 *E. coli* 活性检测方法。

超微结构的观察: 以 *E. coli* 为代表, 取活化后的菌样制备成 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液, 以终浓度分别为 8%和 32%丙酮-菌悬液为实验组, 不含丙酮的菌悬液作为对照组, 37 °C、120 r/min 孵育 20 h 后, 按照电镜样品制备方法制备样品, 送渤海大学分析实验室扫描电镜, 观察菌体形态变化, 以此说明溶剂对 *E. coli* 形态的影响。

## 1.4 纸片扩散法检测3种常用药用溶剂对*E. coli*和*S. aureus*的活性影响

含不同浓度乙醇、丙酮、DMSO 纸片的制备: 取直径为 5 mm 的滤纸片若干, 灭菌后烘干。以灭菌蒸馏水将 3 种溶剂分别稀释成终浓度(体积比)为 32%、16%、8%、4%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.125%的溶液, 取不同浓度的上述溶液 10 μL 滴在滤纸片上待用(乙醇、丙酮易挥发, 现用现制); 配制阳性对照品: 取 10 μL 3 g/L 注射用头孢曲松钠贮备液, 滴在滤纸片上待用。用无菌棉签蘸取稀释至 0.5 麦氏比浊标准的 *E. coli* 或 *S. aureus*, 分别均匀涂布于 MH 固体培养基的平板上, 稍干, 用无菌镊子取不同浓度(32%、16%、8%、4%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.125%)药用溶剂(乙醇、丙酮、DMSO)滤纸片, 贴在已接种细菌的 MH 固体培养基平板表面。同时将头孢曲松钠纸片(3 g/L)作为阳性对照, 以无菌蒸馏水纸片作为阴性对照。将平板底部朝上放于 37 °C 孵育箱中, 培养 20 h 观察抑菌环直径大小, 用以评价不同浓度的 3 种溶剂对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑制作用。不同抗菌药物对不同菌株产生的抑菌环直径不同, 每个菌株产生抑菌圈直径与敏感度关系的标准也不尽相同, 一般认为抑菌环直径>15 mm 为高度敏感; 10 mm–15 mm 为中度敏感; <10 mm 为低度敏感; 无抑菌环则为耐药<sup>[18]</sup>。

## 1.5 生长曲线法检测3种常用药用溶剂对*E. coli*和*S. aureus*的活性影响

*E. coli* 菌液制备: 取 3–5 个 *E. coli* 菌落接种于 5 mL LB 培养基中, 培养 4 h, 待用。分别加入 100 mL

LB 培养基的锥形瓶编为 0–11 号, 向 1–11 号瓶加入 DMSO, 使其终浓度(体积比)分别为 0、0.25%、0.5%、1%、4%、5%、8%、10%、12%、16%、32%。除 0 号瓶空白对照不接种菌液, 其余各瓶分别接种 50  $\mu$ L *E. coli* 菌液, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养。分别于 0、2、4、8、10、12、14、18、20、24、26、32 h 取样测定  $OD_{600}$  值, 取样前吹吸均匀。以培养时间(h)为横坐标,  $OD_{600}$  值为纵坐标绘制大肠杆菌的生长曲线, 以此来说明不同浓度的 DMSO 对大肠杆菌的活性影响。不同浓度的丙酮、乙醇对 *E. coli* 活性影响实验操作同 DMSO。

生长曲线法测定 3 种溶剂对 *S. aureus* 活性影响实验方法同 *E. coli* 活性检测方法。

以 *E. coli* 为代表, 按照 1.3 超微结构的观察步骤分别考察菌体在 DMSO、丙酮、乙醇中培养 20 h 和 30 h 时的形貌变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙醇、丙酮和 DMSO 对菌株活性的影响

**2.1.1 肉汤稀释法:** 肉汤稀释法作为测试抗菌药物敏感性的标准方法, 可有效检测出某药物对受试微生物在一定时间内生长速度的总体影响。借助肉汤稀释法, 详细考察不同浓度的乙醇、丙酮及 DMSO 在 20 h 的培养周期内对革兰氏阴性菌代表 *E. coli* 和革兰氏阳性菌代表 *S. aureus* 活性的影响, 结果如

表 1 所示: 空白对照为蒸馏水, 用以消除由于 MH 培养基浓度不同对实验造成的干扰。通过所得结果可知, 经 20 h 培养各组空白对照实验中的菌体浓度基本一致, 可见 MH 培养基浓度的变化(68%–100%)对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的生长速度影响并不大。同时, 乙醇、丙酮和 DMSO 三种溶剂的浓度较低时, *E. coli* 菌液的吸光度并无明显变化; 随着溶剂浓度升高, 菌液的吸光度明显下降, 说明 *E. coli* 的生长受到强烈地抑制。但当乙醇和丙酮的浓度均大于 8% 时, *E. coli* 菌液的吸光度却逐渐增加, 这是由于二者在较高浓度下不能与 MH 培养基互溶, 在实验过程中出现肉眼可见的白色浑浊, 导致假阳性结果。此外, 实验结果也表明乙醇和丙酮在作为助溶剂使用时需要控制其浓度低于 8%; DMSO 则作为相对稳定的助溶剂, 其使用浓度可高达 32%。同样, 上述趋势也出现在肉汤稀释法测定乙醇、丙酮和 DMSO 3 种溶剂对 *S. aureus* 影响的实验中。

依据表 1, 通过公式(1)分别计算 *E. coli* 和 *S. aureus* 在混合了乙醇、丙酮和 DMSO 三种常用药用溶剂的培养液中, 培养 20 h 后受到的生长抑制作用, 即抑菌率  $I$ , 如图 1A 所示。随着乙醇、丙酮和 DMSO 浓度的增加, *E. coli* 受到的抑制作用均有显著增加。但当 3 种溶剂的浓度为 8% 时, 菌体受到的抑制作用发生分化: 由于出现白色沉淀, 乙醇和

表 1 不同浓度的乙醇、丙酮和 DMSO 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 吸光度值的影响  
Table 1 Effect of different concentrations of ethanol, acetone and DMSO on the absorbance values of *E. coli* and *S. aureus*

浓度 Concentration (%)	乙醇 Ethanol		丙酮 Acetone		DMSO		空白 Blank	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0	0.707	0.395	0.674	0.404	0.677	0.406	0.681	0.421
0.125	0.688	0.381	0.594	0.394	0.668	0.388	0.573	0.413
0.25	0.657	0.333	0.539	0.359	0.652	0.371	0.689	0.409
0.5	0.647	0.314	0.478	0.341	0.612	0.353	0.666	0.406
1	0.638	0.221	0.413	0.325	0.527	0.327	0.675	0.398
2	0.444	0.116	0.222	0.142	0.467	0.144	0.676	0.412
4	0.280	0.083	0.095	0.105	0.283	0.118	0.680	0.424
8	0.033	0.045	0.040	0.066	0.014	0.102	0.669	0.391
16	0.059	0.053	0.065	0.075	0.007	0.071	0.672	0.382
32	0.184	0.092	0.427	0.221	0.006	0.001	0.674	0.385

丙酮的抑制作用下降, 呈现假阴性结果; DMSO 对 *E. coli* 的抑制作用则稳定维持在 100%, 不随溶剂浓度的增加发生变化; 如排除沉淀所引起的假阴性结果, 乙醇和丙酮的抑菌规律应该与 DMSO 一致, 平稳在 100%。对于白色沉淀的产生, 推测是由于相对浓度较高的乙醇和丙酮溶液破坏了 MH 培养基和微生物表面蛋白质颗粒的水化膜, 在等电点时使蛋白质沉淀。为了验证该推测, 对与不同浓度丙酮作用后的 *E. coli* 细胞进行了扫描电镜分析, 结果见图 2: 没有加入丙酮的菌体表面光滑, 形态完整、

饱满、呈杆状分布(图 2A); *E. coli* 经 8% 的丙酮作用 20 h 后, 菌体明显收缩, 两端出现凹陷, 表面相对粗糙(图 2B); 当与 32% 的丙酮作用后, 经真空抽干后样品只留有球状颗粒, 不似 *E. coli* 受破坏后的菌体, 如此时丙酮的抑制率已经达到 100%, 则这些颗粒应为培养基中蛋白质完全变性后的产物(图 2C)。为进一步验证推测, 32% 的乙醇和丙酮分别被加入灭菌后的肉汤培养基, 沉淀立即生成(未展示结果图)。

根据常规毒性实验推荐, 求算 20%、50% 和 90%

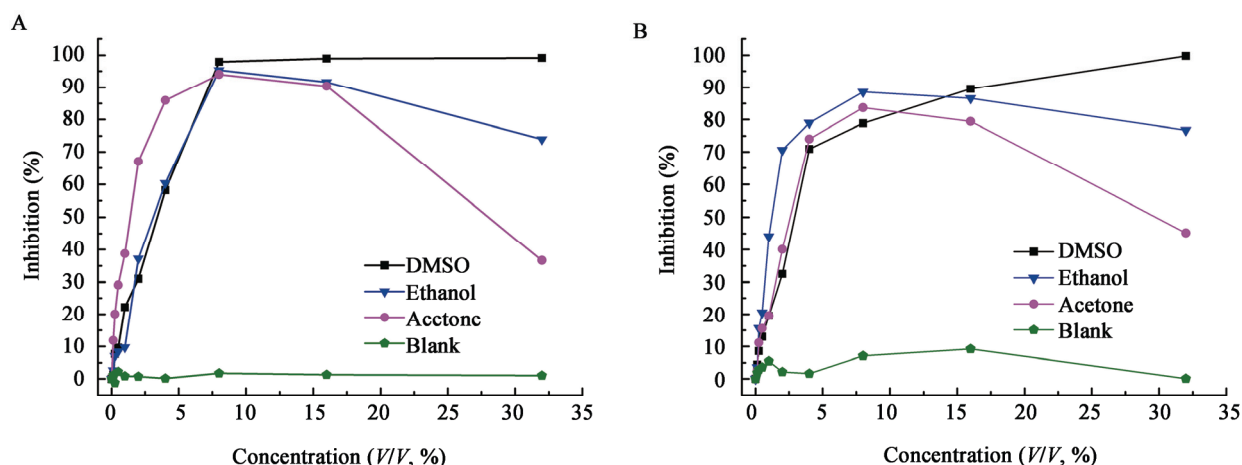


图 1 不同浓度的乙醇、丙酮和二甲基亚砷分别对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的抑制作用

Figure 1 The inhibitory effects of different concentrations of ethanol, acetone and dimethyl sulfoxide (DMSO) on *E. coli* (A) and *S. aureus* (B)

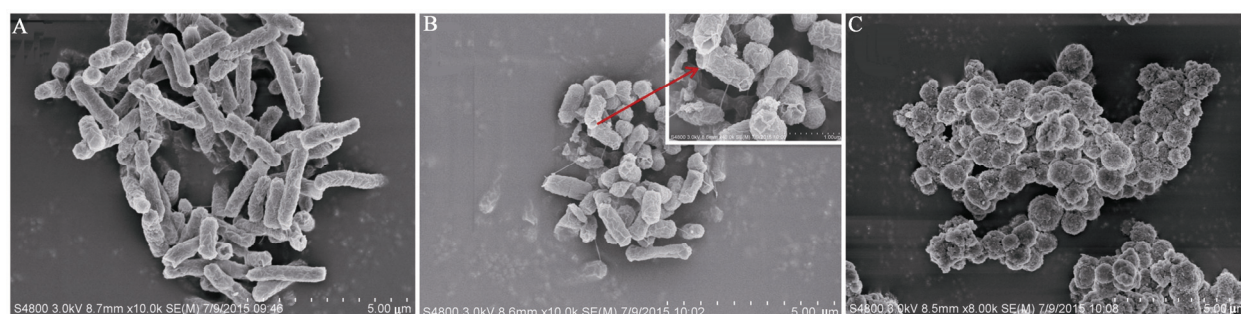


图 2 不同浓度丙酮经 20 h 培养对大肠杆菌形态的影响(5 000×)

Figure 2 The effects on the morphology of *E. coli* after treated by different concentrations of acetone at 20 h incubation time (5 000×)

注: A: 无丙酮作用的 *E. coli* 形态; B: 8% 丙酮作用后 *E. coli* 的形态; C: 32% 丙酮作用后溶液形态。

Note: A: The morphology of normal *E. coli*; B: The morphology of 8% acetone treated *E. coli*; C: The morphology of 32% acetone treated *E. coli*.

抑制率相对应的药品浓度(Inhibitory concentration, IC), 结果见表 2 和表 3: DMSO 对 *E. coli* 的  $IC_{20}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为 1.00%、3.00%和 7.00%, 对 *S. aureus* 的  $IC_{20}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为 1.00%、3.00%、16.00%; 乙醇对 *E. coli* 的  $IC_{20}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为 2.00%、3.00%和 7.00%, 对 *S. aureus* 的  $IC_{20}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为 0.50%、1.50%、8.00%; 丙酮对 *E. coli* 的  $IC_{20}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为 0.25%、1.50%和 6.00%, 对 *S. aureus* 的  $IC_{20}$ 、 $IC_{50}$  和  $IC_{90}$  分别为 1.00%、3.00%、8.00%。

根据不同药物的化学性质, 药敏实验中采用的溶剂浓度也不尽相同, 其范围为 1%–50%<sup>[19-20]</sup>。而

6%和 10%分别为乙醇和 DMSO 在肉汤稀释法测定药品最小抑菌浓度时的常用剂量<sup>[19,21]</sup>。但根据实验结果, 上述乙醇和 DMSO 的浓度将对受试 *E. coli* 分别产生 50%–90%和超过 90%的抑制, 对药敏实验结果具有较大影响。为了降低此种影响, 除了需要进行空白对照实验, 建议 DMSO、乙醇和丙酮的使用浓度(体积比)应分别低于 1.00%、0.50%和 0.25%, 即控制溶剂对菌株的抑制率低于 20%, 可满足药敏实验对准确度的要求。

**2.1.2 纸片扩散法:** 因为药品、溶剂的某些物理和化学性质, 例如: 大于 8%的乙醇和丙酮在液态培养基中易生成沉淀, 引起样品的浊度变化, 因此不

表 2 肉汤稀释法、纸片扩散法和生长曲线法检测常用有机溶剂对大肠杆菌活性影响  
Table 2 Application of the broth dilution method, disk diffusion method and growth curve method to determine effects of common organic solvents on bioactivities of *E. coli* cells

溶剂 Solvents	肉汤稀释法			纸片扩散法			生长曲线法
	Broth dilution method (%)			Disk diffusion method (mm)			Growth curve method (I=20%, %)
	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	S	I	R	
丙酮 Acetone	0.25	1.50	6.00	—	—	0	1.00
乙醇 Ethanol	2.00	3.00	7.00	—	8	—	0.50
二甲基亚砷 Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1.00	3.00	7.00	—	7	—	0.50
头孢曲松钠 Ceftriaxone sodium				35	—	—	
去离子水 Deionized water				—	—	0	

表 3 肉汤稀释法、纸片扩散法和生长曲线法检测常用有机溶剂对金黄色葡萄球菌活性影响  
Table 3 Application of the broth dilution method, disk diffusion method and growth curve method to determine effects of common organic solvents on bioactivities of *S. aureus* cells

溶剂 Solvents	肉汤稀释法			纸片扩散法			生长曲线法
	Broth dilution method (%)			Disk diffusion method (mm)			Growth curve method (I=20%, %)
	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	S	I	R	
丙酮 Acetone	1.00	3.00	8.00	—	—	0	0.50
乙醇 Ethanol	0.50	1.50	8.00	—	—	0	0.50
二甲基亚砷 Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1.00	3.00	16.00	—	—	0	1.00
头孢曲松钠 Ceftriaxone sodium				26	—	—	
去离子水 Deionized water				—	—	0	



宜采用肉汤稀释法进行药敏实验。因此, 体外抑菌实验的另一种推荐方法——纸片扩散法应用于检测 DMSO、乙醇和丙酮对 *E. coli* 的活性影响, 其浓度检测范围与肉汤法相同(0–32%)。纸片扩散法作为传统经典的药敏试验方法, 操作简便, 结果直观容易判读, 可有效检测出微生物对药物的敏感程度。如图 3 所示, 不同浓度的乙醇、丙酮及 DMSO 在 20 h 的培养周期内对 *E. coli* 产生的影响程度直接表达为抑菌环的直径大小。其中, 阳性对照品头孢曲松钠纸片在培养基中心产生直径为 32 mm–35 mm 的抑菌环, 根据 2012 年 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)规定的抗菌药物敏感性实验结果判读标准<sup>[18]</sup>, 头孢曲松钠抑菌环直径 $\geq 21$  mm 为敏感, 表明所用 *E. coli* 属于对头孢曲松钠敏感型菌株, 为质量可控型菌株, 而阴性对照去离子水纸片则无抑菌环产生。0–32%的丙酮纸片均无明显抑菌环产生(图 3A、3B); 0–16%的乙醇不能产生抑菌环(图 3C、3D), 32%的乙醇产生直径 8 mm 抑菌环(图 3D-5); 0–16% DMSO 纸片无抑菌环产生(图 3E、3F), 32% DMSO 纸片产生直径 7 mm 抑菌环(图 3F-5)。根据 CLSI 规定的标准, 采用纸片扩散法检测的药用溶剂 DMSO、乙醇的浓度低于 32% 时对 *E. coli* 的分裂繁殖影响较小, 而浓度低于 32% 的丙酮对 *E. coli* 生长无抑制作用。

同样, 纸片扩散法被应用于检测 DMSO、乙醇和丙酮对革兰氏阳性菌株 *S. aureus* 的活性影响。如图 4 所示, 头孢曲松钠作为阳性对照, 其抑菌环直径为 23 mm–26 mm。根据 CLSI 规定的标准, 此种条件下抑菌环直径 $\geq 21$  mm 为敏感, 所以采用的 *S. aureus* 属于对头孢曲松钠敏感型菌株, 阴性对照去离子水纸片无抑菌环产生。0–32%的丙酮(图 4A、4B)、0–32%乙醇(图 4C、4D)、0–32% DMSO (图 4E、4F)纸片均无明显抑菌环产生。根据 CLSI 规定的标准, 采用纸片扩散法检测的溶剂 DMSO、乙醇和丙酮的浓度低于 32% 时对 *S. aureus* 的分裂繁殖无抑制作用。

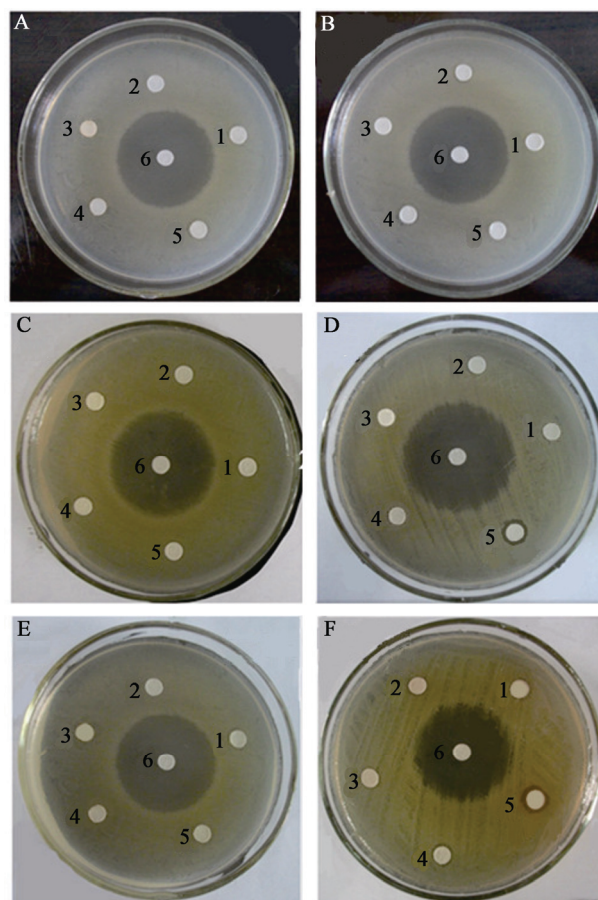


图 3 不同浓度的丙酮(A、B)、乙醇(C、D)和二甲亚砜(E、F)对大肠杆菌产生的抑菌环

**Figure 3 The inhibitory ring of different concentrations of acetone (A, B), ethanol (C, D) and DMSO (E, F) for *E. coli***

注: A: 1–5: 0–1%丙酮无抑菌环产生; B: 1–5: 2%–32%丙酮无抑菌环产生; C: 1–5: 0–1%乙醇无抑菌环产生; D: 1–4: 2%–16%乙醇无抑菌环产生, 5: 32%乙醇产生 8 mm 抑菌环; E: 1–5: 0–1%二甲亚砜无抑菌环产生; F: 1–4: 2%–16%二甲亚砜无抑菌环产生, 5: 32%二甲亚砜产生 7 mm 抑菌环。6: 阳性对照头孢曲松钠产生 32 mm–35 mm 抑菌环。

Note: A: 1–5: 0–1% acetone could not induced inhibitory ring for *E. coli*; B: 1–5: 2%–32% acetone could not induced inhibitory ring for *E. coli*; C: 1–5: 0–1% ethanol could not induced inhibitory ring for *E. coli*; D: 1–4: 2%–16% ethanol could not induced inhibitory ring for *E. coli*, 5: 32% ethanol induced 8 mm inhibitory ring for *E. coli*; E: 1–5: 0–1% DMSO could not induced inhibitory ring for *E. coli*; F: 1–4: 2%–16% DMSO could not induced inhibitory ring for *E. coli*, 5: 32% DMSO induced 7 mm inhibitory ring for *E. coli*. 6: Ceftriaxone sodium induced 32 mm–35 mm inhibitory ring for *E. coli* as positive control.

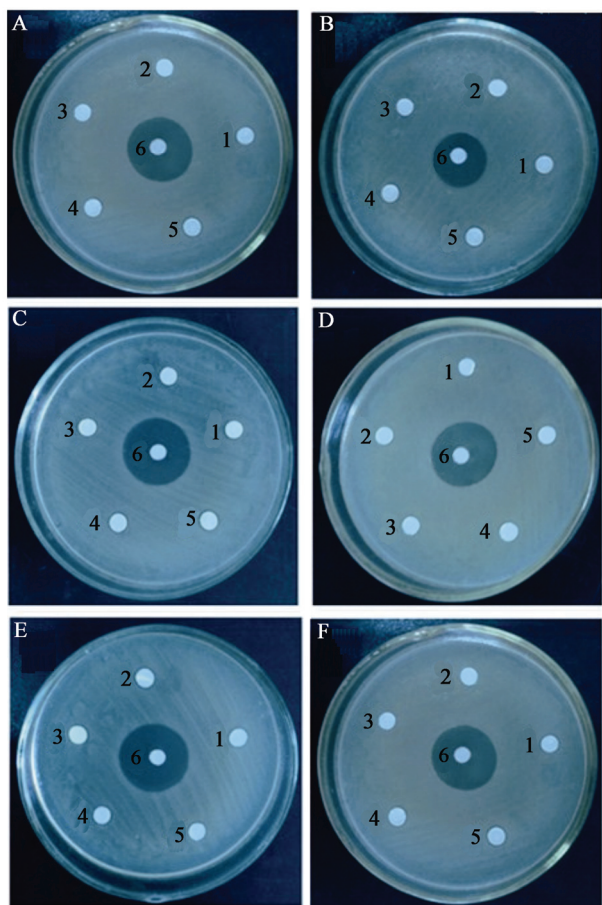


图 4 不同浓度的丙酮(A、B)、乙醇(C、D)和二甲亚砜(E、F)对金黄色葡萄球菌产生的抑菌环

Figure 4 The inhibitory ring of different concentrations of acetone (A, B), ethanol (C, D) and DMSO (E, F) for *S. aureus*

注: A: 1-5: 0-1%丙酮无抑菌环产生; B: 1-5: 2%-32%丙酮无抑菌环产生; C: 1-5: 0-1%乙醇无抑菌环产生; D: 1-5: 2%-32%乙醇无抑菌环产生; E: 1-5: 0-1%二甲亚砜无抑菌环产生; F: 1-5: 2%-32%二甲亚砜无抑菌环产生。6: 阳性对照头孢曲松钠产生 23 mm-26 mm 抑菌环。

Note: A: 1-5: 0-1% acetone could not induced inhibitory ring for *S. aureus*; B: 1-5: 2%-32% acetone could not induced inhibitory ring for *S. aureus*; C: 1-5: 0-1% ethanol could not induced inhibitory ring for *S. aureus*; D: 1-5: 2%-32% ethanol could not induced inhibitory ring for *S. aureus*; E: 1-5: 0-1% DMSO could not induced inhibitory ring for *S. aureus*; F: 1-5: 2%-32% DMSO could not induced inhibitory ring for *S. aureus*. 6: Ceftriaxone sodium induced 23 mm-26 mm inhibitory ring for *S. aureus* as positive control.

与肉汤稀释法相比,相同剂量的药用溶剂对纸片扩散法中采用的受试菌体的活性影响相对较小,其原因可能是相对于液体状态,纸片上的有机溶剂更易挥发,导致作用浓度下降;或因为溶剂在平板上不易扩散,致使其与微生物的接触不充分,限制了溶剂的抑菌效果。因此,对于一些水溶性相对较差的,需使用较高浓度有机溶剂的药品,纸片扩散法更为合适。

**2.1.3 生长曲线法:**借助生长曲线法继续考察不同浓度的 DMSO、丙酮和乙醇在 32 h 的培养周期内对不同生长阶段 *E. coli* 的活性影响。为了避免 MH 培养基蛋白质变性生成沉淀,采用 LB 培养基。如图 5A 所示,当浓度 $\leq 0.5\%$ 时,丙酮在 32 h 的 *E. coli* 生长周期内未对菌株生长产生明显影响;当浓度为 0.1%时,丙酮展示出对对数期的 *E. coli* 生长繁殖的抑制,但抑制率均低于 20%;当浓度 $\geq 4.0\%$ 时,丙酮展示出对 *E. coli* 全生长周期的抑制作用,甚至是全部抑制作用。可见,当采用液态条件下的药敏实验时,丙酮的安全使用浓度应小于 0.5%,此浓度下甚至可以忽略对照实验。如图 5B 可知,当乙醇浓度 $\leq 0.25\%$ 时,其在 32 h 的全周期内未对 *E. coli* 生长产生影响;随着乙醇浓度的增加,其对 *E. coli* 生长的抑制作用明显加强;当乙醇浓度 $\geq 5\%$ 时,其对 *E. coli* 生长抑制超过 90%,且已无法分辨菌株的生长周期。如图 5C 所示,未受影响的 *E. coli* 在 4 h 进入对数期,12 h 达到稳定期。当 DMSO 浓度 $\leq 1\%$ 时,未对生长期的 *E. coli* 的生长造成影响,但在随后的对数期导致菌浓(以  $OD_{600}$  表示)显著下降;随着 DMSO 浓度的增加,溶剂对 *E. coli* 菌体生长的抑制作用逐渐增强,当 DMSO 浓度 $\geq 8\%$ 时,其抑制作用迅速增强;当 DMSO 浓度为 32%时,则表现出对 *E. coli* 菌体生长的完全抑制。可见,即使经过短周期培养,DMSO 仍然可能会对 *E. coli* 的生长产生较大影响,因此药敏实验中应控制 DMSO 的使用量。

为了进一步考察 3 种药用溶剂对受试微生物 *E.*



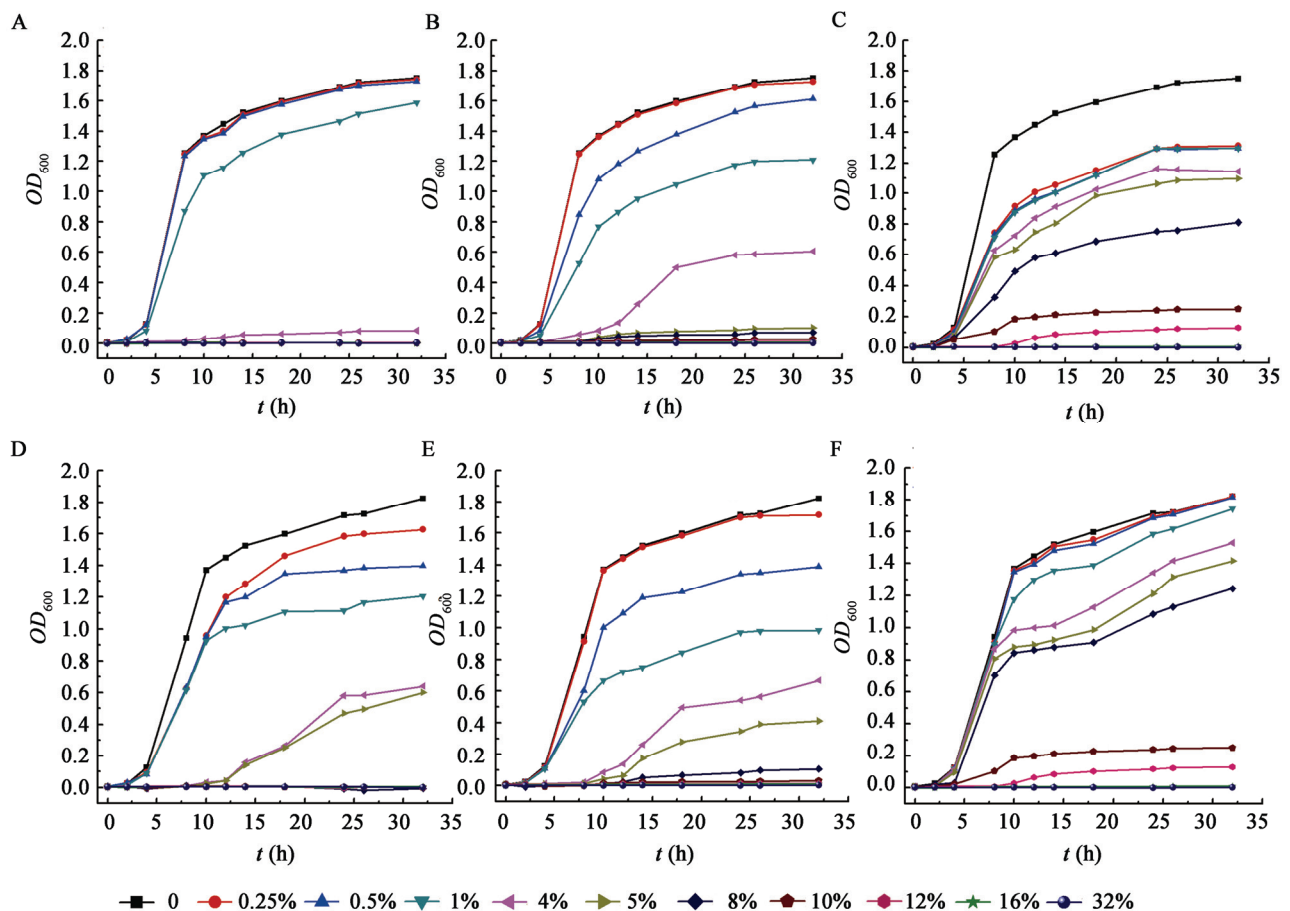


图5 不同浓度的丙酮、乙醇和二甲基亚砜对大肠杆菌(A、B、C)和金黄色葡萄球菌(D、E、F)的生长曲线的影响

Figure 5 The effects of different concentrations of acetone, ethanol and DMSO on the growth curve of *E. coli* (A, B, C) and *S. aureus* (D, E, F)

*coli* 菌株生长抑制的机理, 采用扫描电镜观察培养时间分别为 20 h 和 30 h 时, 浓度均为 1% 的 DMSO、丙酮和乙醇分别对 *E. coli* 形态的影响。 *E. coli* 分别经 1% DMSO、1% 丙酮和 1% 乙醇作用 20 h 后, 菌体表面皱缩, 两端出现塌陷, 但整体形态较为完整 (图 6A–C); 作用 30 h 后, 菌体表面均出现较明显破损和变形、甚至溢裂成两段, 细胞内容物大量泄漏, 其中乙醇的影响最为明显, 菌体几乎完全破损 (图 6D–F)。而根据生长曲线法所得结果, 相对于 DMSO 和丙酮, 乙醇与菌体的长时接触中, 对菌株的生长抑制最强, 与扫描电镜结果相吻合。

同样, 生长曲线法被应用于考察 DMSO、乙醇和丙酮在不同浓度和作用时间下对 *S. aureus* 的生长

抑制作用。结果如图 5D 所示, 当丙酮浓度为 0.25% 时, 丙酮抑制 *S. aureus* 对数期的生长繁殖, 但抑制率低于 20%; 当浓度为 0.5% 时, 丙酮对 *S. aureus* 抑制作用达到 20%, 可见, 当采用液态条件下的药敏实验时, 丙酮的安全使用浓度范围应小于 0.5%。如图 5E 所示, 当乙醇浓度  $\leq 0.25\%$  时, 其在 32 h 的全周期内未对 *S. aureus* 生长产生影响; 随着乙醇浓度的增加, 其对 *S. aureus* 生长的抑制作用明显加强; 当乙醇浓度  $\geq 8\%$  时, 其对 *S. aureus* 生长抑制超过 90%, 且已无法分辨菌株的生长周期。如图 5F 所示, 未受影响的 *S. aureus* 在 4 h 进入对数期, 14 h 达到稳定期。当 DMSO 浓度  $\leq 0.5\%$  时, 未对 *S. aureus* 的生长造成影响, 随着 DMSO 浓度的增加, 溶剂对

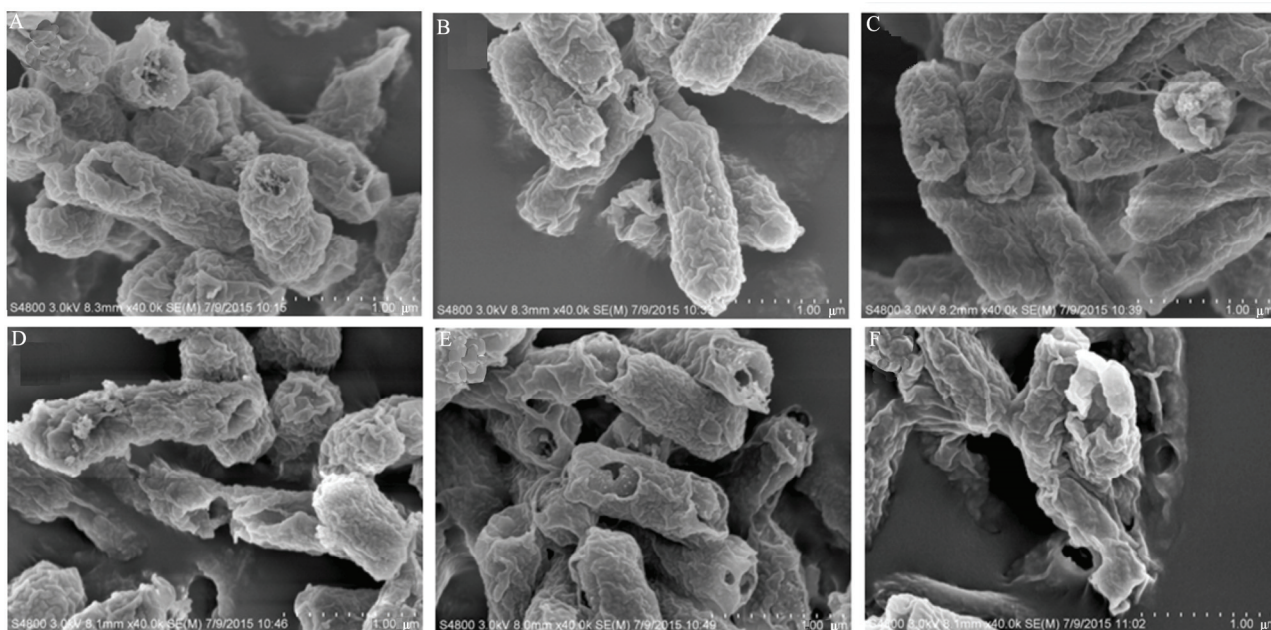


图6 DMSO、丙酮、乙醇在20 h和30 h时对大肠杆菌生长曲线的影响(10 000×)

Figure 6 The effects of DMSO, acetone, ethanol on the morphology of *E. coli* at 20 h and 30 h incubation times (10 000×)

注: A: 1% DMSO 作用 20 h 大肠杆菌形态; B: 1% 丙酮作用 20 h 大肠杆菌形态; C: 1% 乙醇作用 20 h 大肠杆菌形态; D: 1% DMSO 作用 30 h 大肠杆菌形态; E: 1% 丙酮作用 30 h 大肠杆菌形态; F: 1% 乙醇作用 30 h 大肠杆菌形态。

Note: A: The morphology of 1% DMSO treated *E. coli* at 20 h; B: The morphology of 1% acetone treated *E. coli* at 20 h; C: The morphology of 1% ethanol treated *E. coli* at 20 h; D: The morphology of 1% DMSO treated *E. coli* at 30 h; E: The morphology of 1% acetone treated *E. coli* at 30 h; F: The morphology of 1% ethanol treated *E. coli* at 30 h.

*S. aureus* 菌体生长的抑制作用逐渐增强, 当 DMSO 浓度 $\geq 10\%$ 时, 其抑制作用迅速增强; 当 DMSO 浓度为 32%时, 对 *S. aureus* 菌体生长完全抑制。控制溶剂对细菌产生小于 20%抑制率( $IC_{20}$ ), 可满足药敏实验对准确度的要求, 可忽略溶剂对细菌的影响。

## 2.2 3 种方法用于检测药用溶剂对受试菌株影响的结果比较

肉汤稀释法、纸片扩散法和生长曲线法分别被应用于检测 DMSO、乙醇和丙酮对 *E. coli* 及 *S. aureus* 的影响, 结果列于表 2 和表 3。通过比较发现, 实验方法、培养周期和菌株不同, 药用溶剂的作用效果也不尽相同。因此, 药用溶剂种类和使用剂量的选择应根据具体药敏实验的条件而定, 不能一概而论。

## 3 讨论

目前, 天然药物有效成分提取和合成的新化合

物测定其抑菌活性时所用溶剂种类和浓度主要由药品溶解性能所决定, 并无统一规范。以此为出发点, 采用革兰氏阴性菌代表菌种 *E. coli* 和革兰氏阳性菌代表菌种 *S. aureus* 作为试验菌, 通过采用肉汤稀释法、纸片扩散法和生长曲线法分别考察 3 种常见药用溶剂 DMSO、乙醇和丙酮对实验菌株的影响, 进而为抗菌药物敏感性实验中溶剂种类和剂量的选择提供数据参考。实验结果表明: 液态培养条件下, DMSO、乙醇和丙酮均对实验菌株产生高浓度抑制, 低浓度刺激的作用, 其作用机制可能与溶剂降低细胞膜电位, 增加细胞膜饱和脂肪酸比例及增加细胞膜通透性有关<sup>[9]</sup>, 3 种溶剂 DMSO、乙醇和丙酮的使用限量浓度(体积比)分别在 0.5%以下时, 溶剂对菌体影响可忽略。当乙醇和丙酮溶液终浓度(体积比) $>8\%$ 时, 溶剂与 MH 培养基不能混溶, 出现浑浊, 导致假阳性的抑菌率结果。通过电镜观

察发现,微生物与有机溶液直接作用一定时间后,菌体受损变形、胞内质泄露,导致菌株活性下降甚至消失。然而在固态培养条件下,例如纸片扩散法,实验浓度下的乙醇和 DMSO 对大肠杆菌只有微弱的抑制作用,丙酮无抑菌作用。由此可见,有机溶剂对药敏试验所用菌株的活性和形貌均有一定影响,其影响程度与溶剂种类、浓度和所用方法有关,在具体实验过程中应根据实际需要谨慎选择体外抑菌实验所用有机溶剂的种类和实验方法,并尽量降低有机溶剂使用浓度,以减小其对受试菌体的影响。

## 参考文献

- [1] Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2001, 134(4): 298-314
- [2] Nuernberger EL, Bishai WR. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: what does the future hold?[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 38(S4): S363-S371
- [3] Zhou N, Zhang JX, Fan MT, et al. Research progress in antimicrobial susceptibility tests and their applications in bacteria[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(9): 459-464 (in Chinese)  
周宁, 张建新, 樊明涛, 等. 细菌药物敏感性实验方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(9): 459-464
- [4] Zhang HR, Meng SX, Cao J, et al. Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Escherichia coli*[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(1): 157-162 (in Chinese)  
张慧茹, 孟素香, 曹健, 等. 绞股蓝内生真菌抗大肠杆菌抗菌机制的研究[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(1): 157-162
- [5] Li XF, Hu LX, Zhang WX, et al. Extraction and antimicrobial activity of the volatile oil from *Radix echinopsis*[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2014, 45(2): 124-125 (in Chinese)  
李喜凤, 胡利欣, 张伟晓, 等. 禹州漏芦挥发油的提取工艺及抑菌活性[J]. *中国医药工业杂志*, 2014, 45(2): 124-125
- [6] Zhang S, Xu YH, Zhang JB, et al. Composition analysis of volatile oil from different *Ocimum basilicum* Linn. By GC-MS and antimicrobial activity[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2011, 42(6): 419-422 (in Chinese)  
张帅, 徐云辉, 张建斌, 等. 不同来源罗勒挥发油成分的 GC-MS 法分析及体外抗菌活性[J]. *中国医药工业杂志*, 2011, 42(6): 419-422
- [7] Liu SW, Xu YX, Zheng YL. Effect of the ethanol extract of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. on the growth curve of bacterium[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(24): 7383-7384, 7387 (in Chinese)  
刘世旺, 徐艳霞, 郑永良. 连翘乙醇提取物对细菌生长曲线的影响[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(24): 7383-7384, 7387
- [8] Liu AJ, Li HY, Wang YX, et al. Antimicrobial on *Escherichia coli* activities of polysaccharide from walnut kernel pellicle[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2011, 27(1): 29-31 (in Chinese)  
刘安军, 李海燕, 王云霞, 等. 核桃种皮多糖抑制大肠杆菌的研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 29-31
- [9] Wang YL, Wang M, Shen YB, et al. Effect of organic solvents on the cell membrane of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2008, 23(4): 40-43, 48 (in Chinese)  
王永乐, 王敏, 申雁冰, 等. 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜的影响[J]. *天津科技大学学报*, 2008, 23(4): 40-43, 48
- [10] Dong YY, Lei BL, Ma J, et al. Influence of cosolvents on *Photobacterium phosphoreum* toxicity test[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2006, 57(3): 636-639 (in Chinese)  
董玉璞, 雷炳莉, 马静, 等. 助溶剂对发光菌生物毒性测试的影响[J]. *化工学报*, 2006, 57(3): 636-639
- [11] Liu ZB, Xu YQ, Zhang ZY, et al. Studies on toxicity and clinical application of cryoprotective agent dimethyl sulfoxide (DMSO)[J]. *Journal of Chinese PLA Postgraduate Medical School*, 1990, 11(1): 31-34 (in Chinese)  
刘作斌, 徐亦青, 张佐云, 等. 冷冻保护剂二甲亚砜的毒副作用及应用剂量研究[J]. *中国人民解放军军医进修学院学报*, 1990, 11(1): 31-34
- [12] Liu L, Yu X, Liu WD, et al. Antimicrobial activity of acetone extract from *kadsura longipedunculata* fruit on food deterioration bacteria[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(11): 104-108 (in Chinese)  
刘丽, 于新, 刘文朵, 等. 南五味子丙酮提取物对食品腐败细菌的抑制作用[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(11): 104-108
- [13] Zhang YB, Guo Y. Study on extracting essential oils from star anise by three methods and their antimicrobial activity[J]. *Journal of Dezhou University*, 2012, 28(2): 1-8 (in Chinese)  
张贇彬, 郭媛. 三种方法提取八角茴香精油及其抗菌活性研究[J]. *德州学院学报*, 2012, 28(2): 1-8
- [14] Li CQ, Zhao L, Yang YT, et al. Antimicrobial activity of *Salvia miltiorrhiza* and different processed products[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2011, 33(11): 1948-1951 (in Chinese)  
李昌勤, 赵琳, 杨宇婷, 等. 丹参生品及不同炮制品的体外抗菌活性研究[J]. *中成药*, 2011, 33(11): 1948-1951
- [15] Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(2): 201-222
- [16] Hu JR, Jiang H, Li XX. Study on three non-water-soluble solvents influencing of inhibitory activity in antibacterial test[J]. *Western Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 26(11): 30-31 (in Chinese)  
胡君茹, 姜华, 李喜香. 三种非水溶性供试品溶剂对抑菌试验效果的影响[J]. *西部中医药*, 2013, 26(11): 30-31
- [17] Li W, Song XB, Xi LP. Comparison of the sensitivities of different methods in drug susceptibility test and screening of cosolvent[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21(8): 2062-2064 (in Chinese)  
李薇, 宋新波, 习利平. 药物敏感性试验中不同方法灵敏度的比较及助溶剂的筛选[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(8): 2062-2064
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S22, performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [19] Zheng CP, Quan MP, Kang LN, et al. Study on the antibacterial activity and its mechanism of acetone extract from *Rubia cordifolia*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(9): 116-119 (in Chinese)  
郑翠萍, 权美平, 康莉娜, 等. 茜草丙酮提取物抑菌活性及机制的研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(9): 116-119
- [20] Liu RQ, Cui GF, Guo QH, et al. Recent progress of dimethyl sulfoxide on antimicrobial activity[J]. *Journal of Xinxiang Medical College*, 2012, 29(11): 878-880 (in Chinese)  
刘瑞琪, 崔光富, 郭庆合, 等. 二甲亚砜抗菌作用研究进展[J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29(11): 878-880
- [21] Xiong HP, He GQ, Yang WL, et al. Study on the antimicrobial effect of the extracts of *Ampelopsis grossedentata*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2004, 4(1): 55-59 (in Chinese)  
熊皓平, 何国庆, 杨伟丽, 等. 显齿蛇葡萄提取物抗菌作用的研究[J]. *中国食品学报*, 2004, 4(1): 55-59