

海带水提液和酵母提取物促大肠杆菌生长研究*

李君文** 孙 薇 王新为 宋 农 金 敏

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

摘要: 通过细菌培养液 OD 值测量和平板计数技术观察不同物质对大肠杆菌生长的影响;对微量元素、稀土元素、动、植物激素、细菌提取物、真菌提取物、藻类提取物、植物提取物和动物提取物等 13 大类 120 余种物质在一定浓度范围的促大肠杆菌生长作用进行了观察。海带水提液和酵母提取物对大肠杆菌生长具有明显的促进作用;两者的最佳作用浓度分别为 20 g/L 和 2%, OD 值最大可分别达到对照组的 2.93 倍和 5.06 倍;平板计数可达 3.94 倍和 5.39 倍。

关键词: 酵母提取物, 海带水提液, 大肠杆菌, 促生长

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0016-07

Study on *Escherichia coli* Growth Stimulated by Yeast Extract and *Echlonia kurome* Okum Water Extract*

LI Jun-Wen** SUN Wei WANG Xin-Wei SONG Nong JIN Min

(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, AMMS, Tianjin 300050)

Abstract: The means of OD value measurement and plate counting were used to choose the bacterial growth stimulants. Among the 120 substances sorted to 13 kinds (the trace elements, REE, carbohydrate, amino acids and amino acids derivatives, vitamins, nucleosides, plant hormones, animal hormones, plant and animal extracts, *Echlonia Kurome Okum* water extract and yeast extract), *Echlonia Kurome Okum* water extract and yeast extract were found to stimulate the growth of *Escherichia coli* significantly.

Key words: Yeast extraction, *Echlonia Kurome Okum* water extraction, *Escherichia coli*, Growth

促细菌生长物质是一类通过直接或间接作用于细菌生长代谢过程而加速细菌生长速度或为细菌生长所必需的物质的总称。对其进行研究和利用具有理论与应用价值。在应用方面,可用于细菌的快速检测,特别是一些常见菌和生长较慢的细菌,如肠道菌、结核杆菌等,若能加速其在培养基中的生长速度,则会缩短检测时间,达到快速防治的目的;此外,在提高细菌产量方面亦有一定的应用价值,尤其在基因工程菌高密度培养等领域具有较大的应用价值。理论方面,可探讨细菌的生长调控机理,阐明相关蛋白及其基因的功能等。国内外已报道的促细菌生长物质主要有稀土元素^[1-3],微生物成分,藻类成分^[4],植物成分^[5]和动物成分^[6],等。虽然人们发现了许多有一定促细菌生长作用的物质,但具体机制不清,有关这方面的深入研究较少。大肠杆菌(*Escherichia coli*)是国内外评价水质、空气、食品、药品和化妆品等污染程度以及消毒效果的最常用的重要指标,同时又是生物工程的重要载体之一,因此,如何促进大肠杆菌

* 高技术研究发展计划项目“863”项目(No. 2002AA601240)

天津市科技攻关重大项目(No. 0231807111)

** 联系人 Tel: 86-22-84655345, Fax: 86-22-23328809, E-mail: junwenli@eyou.com

收稿日期: 2003-11-04, 修回日期: 2004-04-02

的快速生长, 进行高密度培养, 始终是国内外研究的热点。由于大肠杆菌的特殊性, 本文以其为研究对象, 筛选能明显刺激大肠杆菌生长的物质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *E. coli* K-12 (编号: 1.359), 购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 培养基: 普通肉汤培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉粉 3 g, NaCl 5 g, 蒸馏水定容至 1 L, Na_2CO_3 调 pH7.4。固体肉汤培养基: 在普通肉汤培养基的基础上加入 1.5% 的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 筛选方法: 在普通肉汤培养基中加入不同浓度的待筛选物质, 加菌培养, 通过测量菌液 OD 值观察其对细菌生长的影响。有作用效果的物质作进一步的重复试验并进行细菌平板计数。

1.2.2 OD 值测量: 试验组加入不同浓度的待筛物质, 对照组加入相同体积的蒸馏水, 加菌培养后的 OD 值与培养基原有 OD 值之差即为反映细菌数的 OD 值。每浓度设 2 个平行管, 重复 2 次。

1.2.3 细菌平板计数: 取 1 mL 菌液加入 9 mL PBS 中, 涡旋震荡器混匀, 再取 1 mL 稀释液重复上述过程 n 次, 即得 10^n 倍稀释液, 吸取该液 1 mL 以平板倾注法计数活菌数, 每平板控制菌落数在 30~300 个左右。每次设 3 个平行板, 重复 2 次。

1.2.4 电镜观察: Philips CM120 透射电子显微镜观察 8,000 及 17,000 放大倍数下细菌生长形态及大小。

2 结果

2.1 最大吸收波长的选择

使用紫外分光光度计 UV8500 对含菌肉汤进行波长扫描, 在波长为 420 nm 时有最大吸收峰, 故选定 $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ 为试验所用波长。

2.2 初筛结果

在对数生长期和静止平稳期测量各组菌液 OD 值, 表 1 列出了各物质的筛选浓度及在最佳浓度时与对照组相比使细菌培养液 OD 值增加的最大倍数。有促菌生长作用 (OD 值增加倍数 > 1.0) 的物质有: 稀土 ($\text{La}(\text{NO}_3)_3$), 糖类 (葡萄糖、乳糖), 酵母提取液, 中药提取液 (冬虫夏草水提液、褐藻酸多糖、海藻水提液、海带水提液、南沙参水提液、枸杞子水提液、白参水提液、红参水提液、西洋参水提液、高丽参水提液、南沙参水提液、山楂果水提液、党参水提液、玄参水提液、桔梗水提液、黄芪水提液、黄精水提液、麦冬水提液、当归水提液、首乌水提液等)。

表 1 待筛物质对菌液 OD 值的影响

分类	名称	浓度范围	增加倍数	
			对数期	静止平稳期
稀土元素类	$\text{La}(\text{NO}_3)_3$			
	(单一稀土)	0.1~0.9mmol/L	1.46	1.22
	$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$			
	(单一稀土)	0.1~0.9Mmol/L	1.37	1.12

续表 1

糖类	硝酸稀土 (混合稀土)	0.02 ~ 0.4 g/L	1.53	1.30
	葡萄糖	0.1 ~ 1 g/L	2.74	2.85
	乳糖	0.05 % ~ 10 %	2.04	2.54
真菌提取物	酵母提取物	0.5 % ~ 10 %	3.96	7.35
藻类提取物	虫草水提液	2 ~ 20g/L	2.40	3.28
	褐藻酸多糖	1 % ~ 4 %	3.79	2.70
	海带水提液	2 ~ 20g/L	2.30	2.65
植物提取物	海藻水提液	2 ~ 20g/L	2.82	2.93
	玉米浆	0.01 % ~ 20 %	1.00	1.00
	白参水提液	2 ~ 40g/L	2.94	1.87
	红参水提液	2 ~ 40g/L	3.57	2.11
	西洋参水提液	2 ~ 50g/L	3.23	3.10
	高丽参水提液	2 ~ 40g/L	2.76	2.23
	枸杞子水提液	1 ~ 8g/L	3.22	2.75
	南沙参水提液	2 ~ 20g/L	2.02	3.45
	山楂果水提液	2 ~ 20g/L	2.12	2.35
	紫苏叶水提液	2 ~ 20g/L	2.31	2.40
	党参水提液	2 ~ 20g/L	2.47	2.86
	玄参水提液	2 ~ 20g/L	2.35	4.13
	桔梗水提液	2 ~ 20g/L	1.79	3.00
	黄芪水提液	2 ~ 20g/L	2.07	2.11
	黄精水提液	2 ~ 20g/L	1.80	2.19
	麦冬水提液	2 ~ 20g/L	2.64	3.23
	当归水提液	2 ~ 20g/L	1.98	2.54
	首乌水提液	2 ~ 20g/L	1.59	1.84

冬虫夏草、人参等因价格较贵被淘汰，其余进行平板计数以选出各类中效果较明显的代表物质。结果如表 2 所示。

表 2 待选物质对平板计数结果的影响

组别	对数期增加倍数	静止平稳期增加倍数
La (NO ₃) ₃	1.50	1.55
葡萄糖	3.45	2.53
乳糖	2.99	3.97
褐藻酸多糖	3.79	2.70
酵母提取液	2.11	5.70
海藻水提液	2.11	3.42
海带水提液	3.78	3.90
南沙参水提液	2.20	3.51
枸杞子水提液	2.18	2.56
山楂果水提液	2.34	2.19
紫苏叶水提液	2.42	2.03
党参水提液	2.70	2.00
玄参水提液	2.74	2.46
桔梗水提液	2.59	2.19
黄芪水提液	2.48	2.22
黄精水提液	2.63	1.80

续表 2

麦冬水提液	3.71	2.35
当归水提液	1.49	2.77
首乌水提液	2.19	1.59
生地水提液	2.44	2.74

从培养液 OD 值与细菌平板计数结果看, 对大肠杆菌具有较好促生长效果的物质包括: 稀土类, $\text{La}(\text{NO}_3)_3$; 糖类, 葡萄糖; 真菌, 酵母提取物; 藻类, 海带水提液; 植物, 麦冬水提液等。综合考虑, 我们选取酵母提取物及海带水提液作为下一步研究对象。

2.3 酵母提取物和海带水提液的促细菌生长效果

连续测量对照组、海带水提液组和酵母提取物组细菌 OD 值并进行平板计数, 重复 5 次后绘制出各组细菌的生长曲线, 如图 1、2 所示。两者的最佳作用浓度分别为 20 g/L 和 2%。

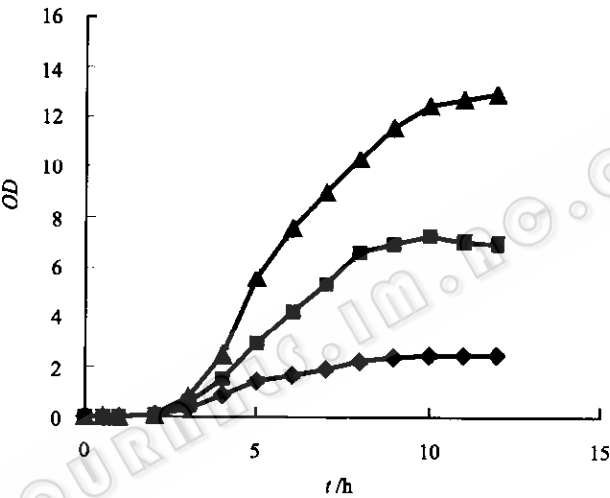


图 1 菌液 OD 值随时间变化图

◆ 对照组, ■ 海带水提液组 (20g/L), ▲ 酵母提取物组 (2%)

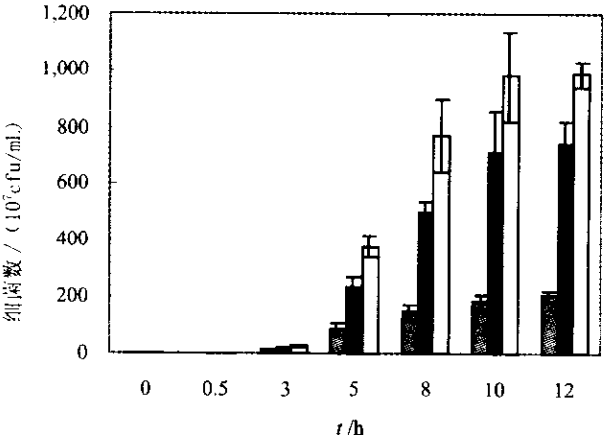


图 2 细菌平板计数结果随时间变化图

对照组, ■ 海带水提液组 (20g/L), □ 酵母提取物组 (2%)

由图可知, 海带水提液和酵母提取物有较好的促大肠杆菌生长作用, *OD* 值可分别达到对照组的 2.93 倍和 5.06 倍; 平板计数可达 3.94 倍和 5.39 倍。

根据大肠杆菌在添加不同物质后的对数生长曲线, 分别选取 0.5 h、3 h、10 h 为迟滞期、对数期和静止平稳期的研究时间。

随机选取视野, 在 8,000 放大倍数下计数 3 个视野 (约 300 个细菌) 中分裂相细菌 (图 3) 的百分比; 在 17,000 放大倍数下测量 20 个细菌的直径大小, 取其平均值。结果如表 3 所示。

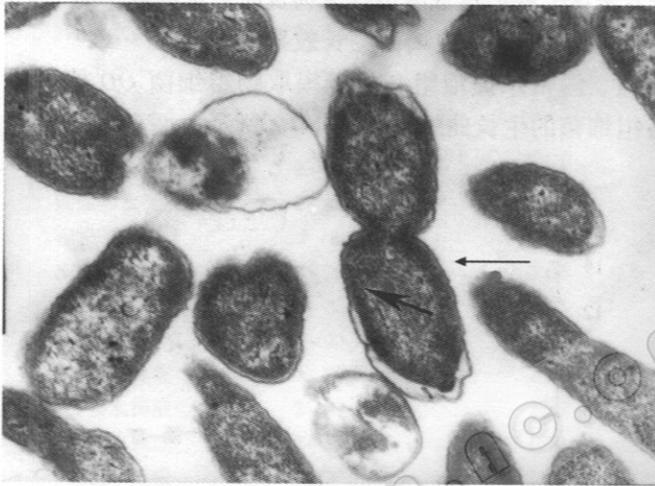


图 3 电镜下大肠杆菌的生长形态及分裂相 ($\times 28,000$)

箭头所示为处于分裂期的细菌

表 3 细菌生长各期分裂相比例及菌体直径

组别		分裂相百分比 ($\chi \pm s$, $n=3$, %)	菌体直径 ($\chi \pm s$, $n=20$, μm)*
迟滞期	对照组	1.056 ± 0.419	8.327 ± 0.771
	海带组	1.466 ± 0.081	$8.974 \pm 1.119^*$
	酵母组	1.068 ± 0.491	$9.355 \pm 0.791^{**}$
对数期	对照组	2.990 ± 0.728	8.501 ± 0.932
	海带组	$7.063 \pm 3.301^{**}$	$10.127 \pm 0.719^{**}$
	酵母组	$10.145 \pm 1.197^{**}$	$9.993 \pm 0.845^{**}$
静止平稳期	对照组	1.571 ± 0.771	8.614 ± 0.562
	海带组	0.516 ± 0.451	$9.276 \pm 0.834^*$
	酵母组	0.982 ± 0.407	8.599 ± 0.721

* 实际直径为此数值的 17,000 分之一, * 有显著性差异 $P < 0.05$, ** 有非常显著性差异 $P < 0.01$

在迟滞期, 实验组与对照组的分裂相百分比比较接近; 对数期, 实验组分裂相百分比迅速增高且两组均与对照组有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 酵母提取物组尤为明显; 静止平稳期, 实验组分裂相百分比明显下降。菌体直径方面, 在迟滞期实验组菌体已开始变大, 海带水提液组与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 酵母提取物组与对照组有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 在对数期, 实验组菌体直径均高于对照组且两组与对照组均有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 而酵母提取物组菌体直径略小, 可能是由于分裂相百分比比较大造成菌体相对较小; 在静止平稳期, 海带水提液组菌体直径仍高

于对照组且有显著性差异 ($P < 0.05$)。相比之下, 对照组在分裂相百分比和菌体大小方面的变化都较平缓。可以看出, 海带水提液和酵母提取物均可使细菌分裂相百分比和菌体直径增加, 酵母提取物似乎更能促进大肠杆菌分裂, 海带水提液似乎更能使大肠杆菌直径增大。此外, 海带水提液组出现外膜泡 (outer membrane vesicle) (图 4)。

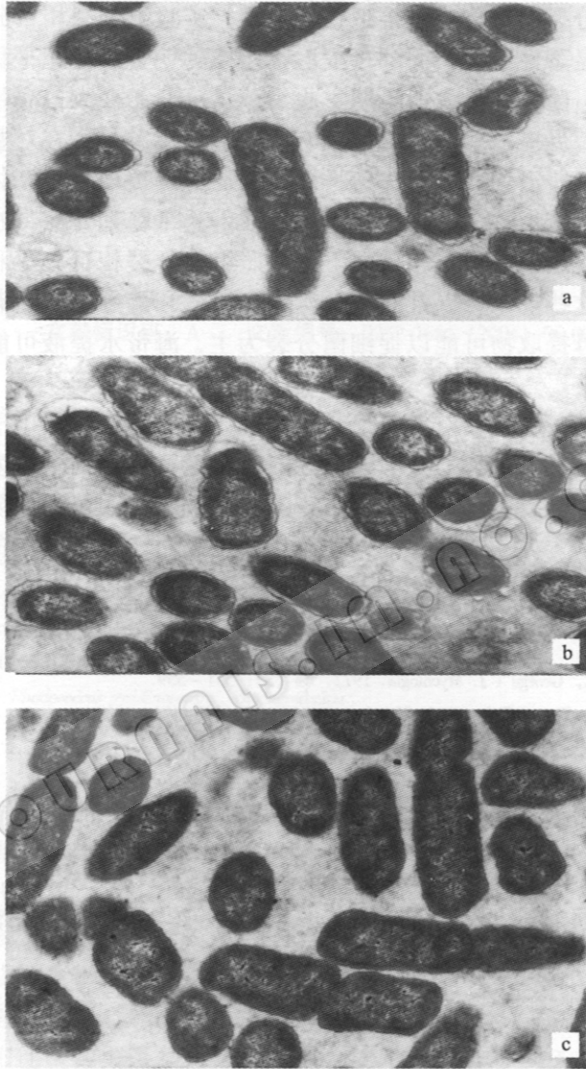


图 4 对数期各组细菌生长形态和外膜泡 ($\times 17,000$)

a 对照组, b 海带水提液组,

c 酵母提取物组, 箭头表示细菌外膜泡

3 讨论

通过细菌培养液 OD 值测量和平板计数, 我们对稀土元素、藻类提取物、植物提取物等 13 大类 120 余种物质的促细菌生长作用进行了观察。在筛选出的物质中, 海带水提液和酵母提取物促大肠杆菌生长作用比较明显。海带水提液含有多种无机盐、有

机酸、维生素、微量元素、氨基酸和糖类^[8]；酵母提取物中含有丰富的氨基酸、肽类、水溶性维生素及糖类^[9]，至于哪一种或几种成分发挥主要作用，尚待下一步研究。

形态学指标是细菌生长状况的最直接反映。细菌的生长包括细菌数量的增多和菌体的增大，因此，我们主要从分裂相百分比和菌体大小方面进行比较研究。在迟滞期，实验组与对照组的分裂相百分比比较接近；对数期，实验组分裂相百分比比较对照组高且两组均与对照组有显著性差异，而酵母提取物组尤为明显；静止平稳期，实验组分裂相百分比明显下降。菌体直径在迟滞期实验组菌体已开始变大，海带水提液组与对照组有显著性差异，酵母提取物组与对照组有非常显著性差异；在对数期，实验组均高于对照组且两组与对照组均有非常显著性差异，而酵母提取物组菌体直径略小，可能是由于分裂相百分比比较大造成菌体相对较小；在静止平稳期，海带水提液组菌体直径仍高于对照组且有显著性差异。相比之下，对照组在分裂相百分比和菌体大小方面的变化都较平缓。由这些现象可以推断出，海带水提液和酵母提取物有较明显的促菌生长作用。其中，酵母提取物可能以促细菌分裂为主，海带水提液可能以促菌体增长为主。

此外，实验组细菌类核较对照组形状更不规则和松散且胞质电子密度略高，表明实验组细菌生长较迅速，RNA合成较多。在对数期的海带水提液组发现了外膜泡。外膜泡是细菌外膜最新合成的部分，且多出现在对数期，表明革兰氏阴性菌有活跃的合成能力^[9]。Wensink^[9]对其机理解释为外膜合成速度超过了肽聚糖层的合成速度。而酵母组未发现外膜泡，可能是因为分裂速度较快，外膜相对并不过剩。

参考文献

- [1] Dwight E, Talburt D E, George T J. *Mycologia*, 1972, **64** (3): 551 ~ 559.
- [2] Talburt D E, Dwight E, George T J, *et al.* *Mycologia*, 1967, **59** (3): 492 ~ 503.
- [3] 徐书显, 曾亚平, 陈崇智, 等. 稀土, 1991, **12** (3): 68 ~ 69.
- [4] 梁冰. 中国海洋药物, 1999, **18** (3): 7 ~ 10.
- [5] 车仁骥, 郑震雄, 梁玉君. 中华结核和呼吸系统疾病杂志, 1982, **5** (4): 211 ~ 213.
- [6] Freestone P P, Haigh R D, Williams P H, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **172** (1): 53 ~ 60.
- [7] 张桂兰, 程薇莉, 何婧, 等. 中国微生态学杂志 1999, **11** (5): 264 ~ 265.
- [8] 陈天寿主编. 微生物培养基的制造与应用 (第1版). 北京: 中国农业出版社, 1995. 182.
- [9] Wensink K J, Witholt B. *Eur J Biochem*, 1981, **116** (2): 331 ~ 335.