

五谷虫蛋白粗提液对牛源致病性 *Escherichia coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 体外抑菌作用

阿琪玛¹ 敖日格乐^{1*} 王纯洁² 斯木吉德¹ 陈玉洁³

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院,呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学 兽医学院,呼和浩特 010018;

3. 内蒙古农业大学 职业技术学院,内蒙古 包头 014109)

摘要 为研究五谷虫蛋白粗提液对 *Escherichia coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的体外抑菌作用,采用试剂盒测定五谷虫粗提液蛋白含量;牛津杯法测定蛋白粗提液对牛源病源性 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的抑菌圈直径;通过二倍稀释法测定蛋白粗提液对 2 种细菌的最低抑菌浓度(MIC);平板法测定最低杀菌浓度(MBC);酶标比浊法测定粗提液对 2 种细菌的 24 h 生长曲线、细胞膜通透性以及碱性磷酸酶(AKP)的含量。研究表明:1)五谷虫蛋白粗提液蛋白质量浓度为 0.680 mg/mL;粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的抑菌圈直径分别为(25.09±0.62)和(20.96±0.48) mm,MIC 分别为 15.625 和 31.250 mg/mL,MBC 为 62.5 和 125 mg/mL,传统中药水煎剂和提取缓冲液没有体外抑菌效果。2)粗提液能影响 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的生长曲线,增加细菌细胞膜和细胞壁通透性。由此可见,蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 均有体外抑菌效果,且对 *E. coli* O₁ 的体外抑菌效果优于 *E. coli* O₇₈。

关键词 五谷虫;蛋白粗提液;*Escherichia coli* O₁; *Escherichia coli* O₇₈;体外抑菌;最小抑菌浓度

中图分类号 S853.75

文章编号 1007-4333(2017)03-0102-07

文献标志码 A

Antibacterial effects of crude protein extract from maggot on bovine pathogenic *Escherichia coli* O₁ and *E. coli* O₇₈

Aqima¹, Aorigele^{1*}, WANG Chunjie², Simujide¹, CHEN Yujie³

(1. College of animal science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

3. Vocational and Technical College of Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014109, China)

Abstract To study the antibacterial mechanism of crude protein extract, which is acquired from Chinese medicine, on bovine pathogenic *Escherichia coli* O₁ and *E. coli* O₇₈. The content of crude protein extract from maggot was determined by enhanced BCA Protein Assay Kit. The diameters of inhibition zone on bovine *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈ were determined by Oxford cup method; The MIC of crude protein extract for two bacteria was determined by two dilution methods. The MBC was determined by plate method. To investigate the antibacterial effects of crude protein extract to against the two bacteria, turbidimetry was adopted to measure 24 h growth curve, cell membrane permeability and the content of AKP. The result showed that: 1) The concentration of crude protein extract from Maggot was 0.680 mg/mL; The diameters of inhibition zone of *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈ were (25.09±0.62) and (20.96±0.48) mm respectively; Their MICs were 15.625 and 31.250 mg/mL respectively; MBCs were 62.5 and 125 mg/mL; The traditional Chinese medicine decoction and the extracting buffer didn't display any antibacterial effects *in vitro*; 2) The crude extract effected the growth curve of both *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈, also increased the permeability of cell

收稿日期: 2016-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260570,31060318)

第一作者: 阿琪玛, 博士研究生, E-mail: aqima816@126.com

通讯作者: 敖日格乐, 教授, 博士生导师, 主要从事牛生产学与产品品质研究, E-mail: aori6009@163.com

membrane and cell wall. In conclusion, the crude protein extract of maggot have antibacterial effects on both *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈, and the antibacterial effects *in vitro* on *E. coli* O₁ is better than *E. coli* O₇₈.

Keywords maggot; crude protein extract; *Escherichia coli* O₁; *Escherichia coli* O₇₈; antibacterial *in vitro*; MIC

随着抗生素的滥用以及细菌耐药性的不断产生,给畜牧养殖业和人类健康带来威胁。因此,寻找抗生素的替代品是必然选择。抗菌肽是一种最有前景的抗生素替代品^[1]。致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*)疾病分布范围广,感染率高,是一种人畜共患病,常随动物粪便排出,广泛散播于自然界,一旦检出,就意味着饮水、牛奶或食品等已直接或间接的被粪便污染,对畜牧生产及人类健康造成严重危害^[2]。1972年瑞典科学家 Boman 等^[3]在果蝇中发现抗菌物质,随后首次从惜古比天蚕蛹中诱导分离抗菌物质并命名为 Cecropin。安春菊等^[4]研究表明家蝇幼虫存在蛋白抗菌物质,并且暗示其抗菌物质是一类碱性物质,具有很好的耐热性,对大肠杆菌 DH5 α 有较强的抑制作用。张姝等^[5]研究结果表明五谷虫粗提物能够明显降低小鼠耳壳肿胀程度,显著提高小鼠脾和胸腺指数,能够提高血清中球蛋白的含量,同样能够显著提高小鼠半数溶血值及吞噬指数,并推断五谷虫粗提物有抗炎作用,且能够提高小鼠的免疫功能。张振等^[6]研究报道,五谷虫抗菌物质相对分子质量 $<10\ 000$,其可能通过作用于金黄色葡萄球菌细胞膜而形成孔洞,增加细胞膜通透性,而发挥抗菌作用。目前,致病性 *E. coli* 引发的疾病通常采用抗生素治疗,但近些年抗生素的滥用使许多致病性 *E. coli* 产生耐药性,治疗效果越来越不理想,增加了治疗的难度^[7]。因此人们开始寻找抗生素的替代品,进而寻求能够有效防治致病性 *E. coli* 的绿色环保型新产品。中药“五谷虫”,俗名蛆,泛指丽蝇科昆虫的幼虫^[8]。据中国医药《本草求源》、《本草便读》的记载,该虫性寒,经干燥研磨后,供搽敷外用,能治疗疔疮、唇疔^[9]。因此,作为纯天然中草药药物,可以从中提取出具有抗菌活性物质,为以后在生产 and 实践中应用,提供了理论基础。传统五谷虫中药水煎剂提取方法没有体外抑菌效果,目前五谷虫抗菌蛋白粗提液对牛源致病性大肠杆菌体外抑菌效果研究较少。因此,本研究通过对中药五谷虫采用粗蛋白提取方法,采用体外抑菌试验,来寻找五谷虫的体外抑菌效果,探究五谷虫蛋白粗提液对致病性 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的体外抑菌作用,找到一种天然的抑菌物质来代替抗生素,进而寻求能够有效

防治致病性大肠杆菌引发疾病的抗生素替代品,旨在为五谷虫蛋白粗提液在生产和实践中的应用提供理论依据。

1 试验方法

1.1 试验材料

试验菌株:牛源病原性 *Escherichia coli* O₁、*E. coli* O₇₈,分离自内蒙古自治区奶牛,从奶牛直肠粪样中分离纯化。

五谷虫蛋白粗提液:将中药五谷虫用粉碎机进行粉碎,提取缓冲液为 4 mL 灭菌蒸馏水+80 μ L β -巯基乙醇+40 μ L 100 mmol/L PMSF。取 1 g 粉碎后的五谷虫粉末于缓冲液中,使得五谷虫粉末质量浓度为 0.25 g/mL。随后沸水浴加热 25 min,目的为除去热不稳定性蛋白,12 000g 离心 15 min,上清液即为五谷虫蛋白粗提液,放于冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存。

五谷虫水煎剂的制备:在天平上量取五谷虫 50 g,将其放入滤药袋中,加蒸馏水 500 mL,浸泡过夜,第 2 天文火煮沸 30 min,过滤药液。滤渣继续加水 250 mL,文火煮沸 30 min,过滤药液,抛残渣。归并 2 次药液,文火煎煮至 50 mL,制成生药含量 1 g/mL 的五谷虫水煎剂,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌,4 $^{\circ}$ C 保存备用^[10]。

碧云天蛋白浓度测定试剂盒:江苏碧云天生物技术有限公司。

β -半乳糖苷酶:ONPG(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 试验仪器

电子分析天平(CP224C),上海奥豪斯仪器有限公司;生化培养箱(JC-SPJ-480),济南精诚实验仪器有限公司;全自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;净化工作台,上海新苗医疗器械制造有限公司;微量移液器、恒温水浴锅和 96 孔板均为实验室常用仪器。离心机,酶标仪(Synergy HT),上海迭戈生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 浓度的测定

完全溶解蛋白标准品,取 10 μ L 稀释至 100 μ L,使终质量浓度为 0.5 mg/mL,稀释液为 0.9%

NaCl。将标准品按 0、1、2、4、12、16 和 20 μL 加到 96 孔板的样品孔中,加标准品稀释液补足到 20 μL ,使标准品蛋白最终质量浓度为 0、0.025、0.050、0.100、0.300、0.400 和 0.500 mg/mL。将标准品取 20 μL 加到 96 孔板的样品孔中,各孔加入 200 μL G250 染色液,室温放置 3~5 min。用酶标仪测定 OD₅₉₅ 吸光值,最后根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

1.3.2 菌液制备

使用前将斜面保存的 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 接种于普通营养琼脂上,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,培养完毕后分别在培养基中加入 3 mL 灭菌生理盐水,然后用涂布棒把菌层刮下,用移液枪把刮下的菌液放入试管中,此菌液为原始菌液。然后将其 10 倍稀释 5 次,在 OD₆₃₀ 波长下测 OD 值,选择 OD 值为 0.08~0.10 的菌液,此时菌液为 1×10^8 cfu/mL。

1.3.3 对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 抑菌圈直径测定

取已将菌液调整为 0.08~0.10 的菌液 100 μL 于琼脂平板中,用涂布器将琼脂上的菌液顺时针均匀涂抹,使菌液均匀的覆盖在琼脂表面。将高压后的牛津杯放入带有菌层的平皿内,取 200 μL 蛋白粗提液于牛津杯中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。用游标卡尺测量抑菌圈直径,每种细菌设 3 个平行试验,结果取平均值。

1.3.4 对 *E. coli* O₁ 及 *E. coli* O₇₈ 的最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC)测定

采用二倍稀释法,将五谷虫蛋白粗提液(0.25 g/mL)用肉汤依次进行 2 倍稀释,分别稀释 11 个梯度,依次加入 96 孔板中的 11 个孔,每孔加入 100 μL ,然后每孔加入菌液 100 μL ,菌量为 1×10^6 cfu/mL(用生理盐水稀释)。空白对照组为第 12 孔加入 100 μL 肉汤和 100 μL 纯菌液。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h,观察结果。为了方便观察可在培养后的酶标板中加入 5 g/L 的 TTC 5~10 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1~3 h,观察结果。加入 TTC 有助于准确的判断 MIC 值,当孔内不显示红色时,即为粗提液的 MIC。在未见细菌生长的各孔中,分别取 100 μL ,接种于普通琼脂培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,生长的菌落数小于 5 个为 MBC。

1.3.5 对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 细胞膜渗透性的影响

用生理盐水调整 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 为 10^8 cfu/mL,在 96 孔板空白对照孔中加入 200 μL

E. coli O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 纯菌液,之后分别加入 10 μL 0.03 mol/L ONPG(0.045 g ONPG,溶于 5 mL 蒸馏水)。试验孔中加入 200 μL *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 之后分别加入同上 ONPG,再加入 10 μL 的五谷虫蛋白粗提液(各菌的 MIC)。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,测定 0、10、30、60、90 和 120 min 时各孔溶液的 OD₄₁₅,每个时间点重复 3 次,取平均值。

1.3.6 对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 2 种致病菌细胞壁的影响

将培养至对数期的 2 种菌悬液调整为 10^6 cfu/mL,然后吸取等体积的菌液与五谷虫蛋白粗提液进行混合,最终使得混合液为 1 倍最低抑菌(MIC),设置 2 种菌空白对照(纯菌液),然后在 37 $^{\circ}\text{C}$,150 r/min 条件下进行培养。培养至 0、1、2、3、4、5 和 6 h 时将菌悬液在 3 500 r/min 条件下离心 10 min,取上清液根据碱性磷酸酶(AKP)试剂盒说明测定 AKP 含量,试验重复 3 次,取平均值。

1.3.7 24 h 生长曲线

用肉汤配置 5 mL 五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的 MIC 浓度,加入 200 μL *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 菌悬液(约 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ cfu/mL)。设定空白对照(不加粗提液只加纯菌液),37 $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min 连续培养 24 h,每隔 2 h 取样 1 次,酶标仪测定 OD₆₃₀ 值,每个时间点重复 3 次,取平均值绘制生长曲线。

1.4 数据统计

应用 Excel 软件对测定数据进行处理和分析;采用 SAS 9.0 软件对数据进行方差分析,试验数据用“平均数士标准差”表示,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 蛋白浓度的测定

图 1 为蛋白浓度标准曲线,蛋白质量浓度分别为 0、0.025、0.050、0.100、0.300、0.400 和 0.500 mg/mL,由图可知其标准曲线为: $y = 1.308x + 0.663$,相关系数 $R^2 = 0.993$ 大于 0.99,说明其存在线性关系。测得五谷虫蛋白粗提液样品的 OD 值为 1.841 ± 0.001 ,带入标准曲线得蛋白质量浓度为: 0.901 mg/mL,大于标准蛋白 0.5 mg/mL,表明粗提液中含有蛋白成分。

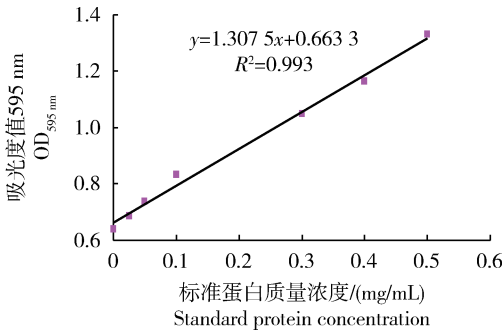


图 1 蛋白标准浓度曲线

Fig.1 Standard curve of protein

2.2 蛋白粗提液、提取缓冲液、水煎剂对 *E. coli* O₁ 及 *E. coli* O₇₈ 的体外抑菌效果

表 1 为提取缓冲液、中药水煎剂和蛋白粗提液

对致病性 *E. coli* O₁ 和 O₇₈ 的体外抑菌效果。提取缓冲液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 没有体外抑菌效果，而五谷虫蛋白粗提液具有体外抑菌效果，说明发挥抑菌作用的是五谷虫蛋白粗提液，从而排除了提取缓冲液本身的干扰。五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的抑菌圈直径分别为 (25.09 ± 0.62) 和 (20.96 ± 0.48) mm；最低抑菌质量浓度 (MIC) 分别为 15.625 和 31.250 mg/mL；最低杀菌质量浓度 (MBC) 分别为 62.500 和 125.000 mg/mL。从抑菌圈直径大小、最低抑菌质量浓度 (MIC) 和最低杀菌质量浓度 (MBC) 这 3 个方面可知五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 的体外抑菌效果优于 *E. coli* O₇₈。

表 1 蛋白粗提液、提取缓冲液、水煎剂对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的体外抑菌效果

Table 1 Antibacterial effects in vitro of crude protein extract, extracting buffer and decoction

项目 Item	抑菌圈直径 R/mm		
	Diameter of the inhibition zone	MIC/(mg/mL)	MBC/(mg/mL)
提取缓冲液对 <i>E. coli</i> O ₁	—	—	—
提取缓冲液对 <i>E. coli</i> O ₇₈	—	—	—
蛋白粗提液对 <i>E. coli</i> O ₁	25.09 ± 0.62	15.625	62.50
蛋白粗提液对 <i>E. coli</i> O ₇₈	20.96 ± 0.48	31.250	125.00
中药水煎剂对 <i>E. coli</i> O ₁	—	—	—
中药水煎剂对 <i>E. coli</i> O ₇₈	—	—	—

注：抑菌圈直径 R ≥ 15 mm 为极敏；10 mm ≤ R < 15 mm 为高敏；8 mm ≤ R < 10 mm 为低敏；R < 8 mm 为不敏感。“—”代表未产生抑菌圈、没有检测到 MIC 和 MBC。

Note: Inhibition zone R ≥ 15 mm is significantly sensitive; 10 mm ≤ R < 15 mm is highly sensitive; 8 mm ≤ R < 10 mm is low sensitive and R < 8 mm is not sensitive; “—” represents no inhibition zone; no MIC and MBC are detected.

2.3 对 *E. coli* O₁ 及 *E. coli* O₇₈ 细胞膜渗透性的影响

由图 2 可知，随着时间的增长，五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的 OD 值各组之间差异显著 (P < 0.05)。空白对照组，没有加入五谷虫蛋白粗提液，OD 值变化不明显，差异不显著 (P > 0.05)。细菌细胞质中存在 β-半乳糖苷酶，若细菌细胞膜被破坏，此酶被释放到培养液与加入的 ONPG 反应，生成黄色 O-硝基酚 (ONP)。随着作用时间的延长，五谷虫蛋白粗提液破坏了 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的细胞膜渗透性，导致细菌内 β-半乳糖苷酶释放到培养液中与 ONPG 反应，使培养液的 OD 值升高且不同时间点之间差异显著 (P < 0.05)。同

时，2 种细菌的空白对照组在不同时间点之间 OD 值差异不显著 (P > 0.05)，说明没有破坏其细胞膜的渗透性。因此可知，五谷虫蛋白粗提液增加了 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的细胞膜渗透性，从而达到抑菌的效果。

碱性磷酸酶 (AKP) 存在于细菌细胞壁与细胞膜之间，正常情况下，AKP 不能透过细胞壁渗到细胞外，但当细胞壁遭到破坏后，AKP 会渗透到培养液中，使得溶液中的 AKP 含量升高。由图 3 可知随着时间的增加，五谷虫蛋白粗提液使 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 培养液中的 AKP 含量升高，而空白对照组中 2 种细菌的 AKP 含量基本保持不变，基本

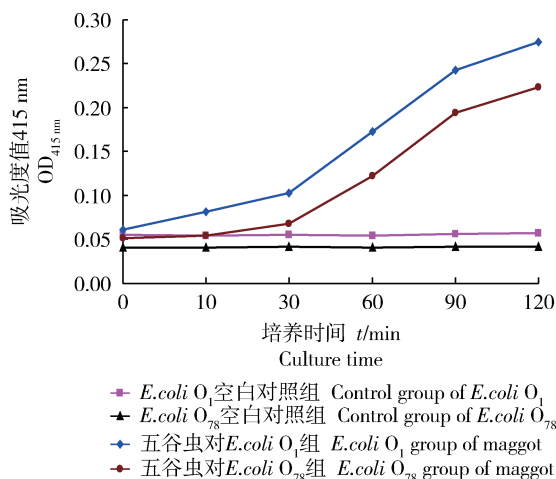


图2 五谷虫蛋白粗提液、空白对照组对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 细胞膜渗透性的影响

Fig. 2 Effects of crude protein extract of maggot and control group on the cell membrane permeability of *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈

为一条直线。五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 在不同时间点之间 AKP 含量差异显著 ($P < 0.05$)。说明五谷虫蛋白粗提液破坏了 2 种细菌的细胞壁渗透性,使 AKP 释放到培养液中,导致 AKP 含量的增加,从而起到杀灭细菌的作用。空白对照组中,两种细菌的 AKP 含量在不同时间点差异不显著 ($P > 0.05$),说明没有破坏细菌的细胞壁渗透性,从而没有杀菌作用。

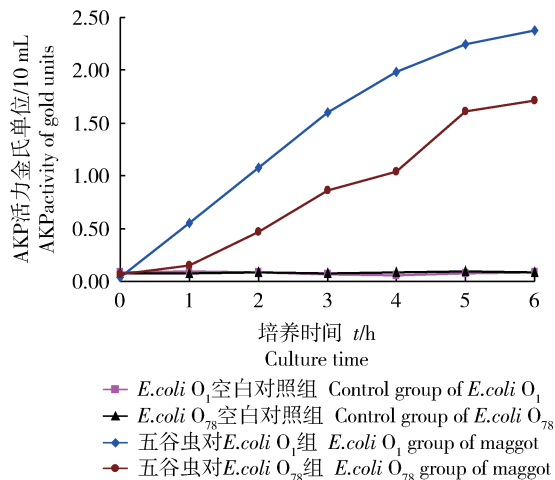


图3 五谷虫蛋白粗提液、空白对照组对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ AKP 含量的影响

Fig. 3 Effects of AKP content which crude protein extract of maggot and control group on *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈

由图 4 可知,对照组 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 正常生长曲线呈 S 形,随着培养时间的增加,0~6 h 为 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的生长延滞期,8~12 h *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 进入对数期。对照组 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 在 2 和 4 h 点比较时,差异不显著 ($P > 0.05$),说明细菌在生长,没有起到抑制细菌生长的作用。对照组 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 在 6、8、和 14 h 时差异显著 ($P < 0.05$)。五谷虫蛋白粗提液组对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 在各时间点均差异不显著 ($P > 0.05$),说明其对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 产生了较好的抑制作用,抑制了细菌的生长。

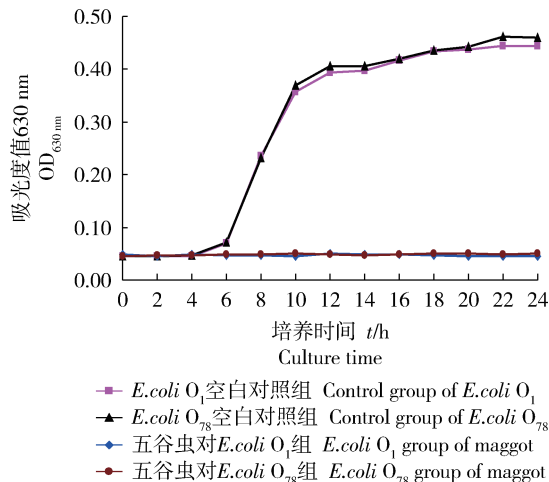


图4 五谷虫蛋白粗提液和空白对照组对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的 24 h 生长曲线的影响

Fig. 4 Effects of 24 h growth curve which crude protein extract of maggot and control group on *E. coli* O₁ and *E. coli* O₇₈

3 讨论

1) 五谷虫作为一种传统中药,如果用传统中药的方法来熬制,对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 没有体外抑菌效果,但是采用蛋白缓冲液提取方法后,可以让五谷虫产生体外抑菌效果且提取液本身没有体外抑菌效果,说明是五谷虫的蛋白提取物产生了体外抑菌效果,对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的抑菌圈直径都达到了 20 mm 以上。杨斯琴等^[11]在 13 种蒙药对牛源病原性大肠杆菌 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的抑菌圈研究结果表明,有 11 种蒙药的抑菌圈直径 $E. coli$ O₁ $>$ $E. coli$ O₇₈,与本试验结果一致。屈军梅等^[12]报道:体外抑菌试验结果证明莫家蝇抗菌肽对鸡 *E. coli* O₁ 型血清大肠杆菌的药敏抑菌圈直径

为(19.3±0.32) mm,本试验与屈军梅的研究结果略有不同,试验测得的五谷虫蛋白粗提液对牛 *E. coli* O₁ 型血清型大肠杆菌的抑菌圈直径为(25.09±0.62) mm,这可能是由于2种血清型来源不同所造成的,也有可能是2种物质提取方法和浓度不同所导致的。张振等^[6]研究表明:运用超滤膜分离技术对五谷虫抗金黄色葡萄球菌物质进行分离纯化,通过与金黄色葡萄球菌细胞膜相互作用,可导致细菌死亡,提示五谷虫体内可能含有多种不同的小分子质量的抗菌物质。与本试验结果结合,说明五谷虫体内不仅存在可以杀灭革兰氏阴性菌的抗菌物质,也存在可以杀灭革兰氏阳性菌的抗菌物质。

2)目前,五谷虫蛋白粗提液对牛源病原性大肠杆菌体外研究报道较为少见,张振等^[6]报道:随着时间的增加,五谷虫提取物组的OD值增加,显示更多的β-半乳糖苷酶释放到胞外或ONPG进入到细胞内,表明金黄色葡萄球菌细胞膜受到损伤,导致细胞膜通透性增加。本研究中,通过检测蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的细胞膜通透性,发现OD值随着时间的增加而增加,说明2种细菌的细胞膜受到粗提液的破坏,而空白对照组由于没有添加粗提液而加的是生理盐水,表明生理盐水不具有破坏细胞膜通透性的效果,OD值不会升高,所以基本呈一条直线,OD值没有随时间的变化而升高。宫霞等^[13]报道:家蝇幼虫抗菌肽MDL-2与细菌相互作用时,对革兰氏阴性细菌大肠杆菌的细胞膜和细胞壁均有破坏作用,阻碍菌体的生命活动,与本试验研究结果一致。陈玉洁等^[14]研究结果表明:酸马奶源酵母菌代谢物破坏了 *E. coli* O₈ 的细胞膜通透性,认为是 *E. coli* O₈ 细胞膜损伤引起细胞质β-半乳糖苷酶的释放,及细胞对ONPG的吸收共同作用的结果。酵母菌代谢物还可以破坏 *E. coli* O₈ 细胞壁的完整性,增加细胞壁通透性,导致大量AKP渗透到胞外,与本试验研究结果一致。

3)掌握药物对致病性大肠杆菌的生长规律,可以对细菌的生长繁殖各个阶段进行调整,从而能更为有效地抑制对机体有害的病原菌达到防治疾病的目的。因此,细菌的生长曲线在研究工作和生产实践中都有指导意义^[15]。菌液的OD值可以衡量菌液中细菌的数目,因此,OD值的变化可以反应五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 抑菌作用情况。空白对照组 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 生长曲线呈S形,加入蛋白粗提液后,其生长曲线无明显变

化,接近水平直线,认为是粗提液抑制了 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 对数生长期的菌体分裂,与陈玉洁^[16] 研究报道一致。宋越^[17] 研究结果表明正常的生长曲线是呈现对数生长的趋势,在0~4 h时,生长较为缓慢,4~18 h之间时进入对数生长期,而18 h后进入一个相对稳定的时期,该时期的菌体含量是最多的,与本试验研究结果基本一致。

4)五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 均有体外抑菌效果,通过抑菌圈结果和MIC结果表明粗提液对 *E. coli* O₁ 的抑菌效果优于 *E. coli* O₇₈。细胞膜渗透性和AKP试验结果表明:粗提液对2种革兰氏阴性菌的细胞膜和细胞壁均有不同程度的破坏作用,对 *E. coli* O₁ 细胞膜和细胞壁的破坏程度强于 *E. coli* O₇₈。通过五谷虫蛋白粗提液对 *E. coli* O₁ 和 *E. coli* O₇₈ 的体外抑菌试验,发现其对试验中的2种革兰氏阴性菌均有体外抑菌效果,不足之处在于还没有研究提取液对革兰氏阳性菌的体外抑菌效果及其抗菌谱,与中药等药物的体外联合抑菌效果和对动物机体免疫的影响。

参考文献 References

- [1] 胡建和,杭柏林,徐彦召,孙亚伟. 动物抗菌肽[M]. 北京:科学出版社,2015
Hu J H, Hang B L, Xu Y Z, Sun Y W. *Animal Antibacterial Peptide*[M]. Beijing: Science Press, 2015 (in Chinese)
- [2] 马明. 大肠杆菌知识漫谈[J]. 生物学教学, 2007, 32(1): 67-68
Ma M. The knowledge on *Escherichia coli* [J]. *Biology Teaching*, 2007, 32(1): 67-68 (in Chinese)
- [3] Onda T, Yanagida F, Tsuji M, Shinohara T, Yokotsuka K. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp strain, GM005, isolated from *Miso*-paste[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 87(1/2): 153
- [4] 安春菊,耿华,郝友进,李德森,杜荣寿. 同提取工艺对家蝇幼虫蛋白粗提液抗菌活性的影响[J]. 昆虫学报 2004, 47(5): 691-694
An C J, Geng H, Hao Y J, Li D S, Du R J. The influence of different factors in extraction on antibacterial activity of protein crude extract in housefly larvae[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(5): 691-694 (in Chinese)
- [5] 张姝,江加进,戴鼎震. 五谷虫粗提物的抗炎效果及对小鼠免疫调节的影响[J]. 金陵科技学院学报, 2013, 29(4): 85-89
Zhang S, Jiang J J, Dai D Z. The anti-inflammatory potency of the crude extracts of maggot and its effect on mouse immune functions[J]. *Journal of JinLing Institute of Technology*, 2013, 29(4): 85-89 (in Chinese)
- [6] 张振,洪亮,王寿宇,吕德成. 五谷虫抗金黄色葡萄球菌物质的

- 纯化及抗菌机制[J].中国组织工程研究,2013,17(15):2755-2760
- Zhang Z, Hong L, Wang S Y, Lu D C. Anti-*Staphylococcus aureus* substance purification from Wugu Chong and its related antibacterial mechanisms [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2013, 17(15): 2755-2760 (in Chinese)
- [7] 朴范泽, 夏成. 当前牛病的发生特点和流行趋势[J]. 兽医导刊, 2001(2): 33-35
- Piao F Z, Xia C. The characteristics and trend about the current cow disease [J]. *Veterinary Tribune*, 2001(2): 33-35 (in Chinese)
- [8] 张振, 王寿宇, 刁云鹏, 张厚利, 黄珊珊, 吕德成. 五谷虫及活体蛆虫治疗慢性感染创面的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3162-3164
- Zhang Z, Wang S Y, Diao Y P, Zhang H L, Huang S S, Lu D C. The research progress of maggot and live maggot about chronic wound infection [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(24): 3162-3164 (in Chinese)
- [9] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 384
- Jiangsu New Medical College. *Traditional Chinese Medicine Dictionary* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1977: 384 (in Chinese)
- [10] 郁建生, 杨冰, 周芳英, 黄雪飞, 姚红燕, 裴庆元. 20 种中草药制剂抑菌试验初报[J]. 中兽医学杂志, 1995(1): 2-5
- Yu J S, Yang B, Zhou F Y, Huang X F, Yao H Y, Pei Q Y. The report of 20 kinds of Chinese herbal medicine bacteriostatic [J]. *Chinese veterinary medicine journal*, 1995(1): 2-5 (in Chinese)
- [11] 杨斯琴, 敖日格乐, 王纯洁, 斯木吉德, 包永光. 蒙药对牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 124-128
- Yang S Q, Aorigele, Wang C J, Simujide, BAO Y G. Antibacterial effects of Mongolian medicines on bovine pathogenic *Escherichia coli* in vitro [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(1): 124-128 (in Chinese)
- [12] 屈军梅, 陈平洁, 李文平, 屈孝初, 唐保国, 黄庭汝. 莫家蝇抗菌肽提取及对鸡大肠杆菌病药效试验[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(3): 56-58
- Qu J M, Chen P J, Li W P, Qu X C, Tang B G, Huang T R. Extraction and efficacy colibacillosis in vivo an in vitro of antibacterial peptides of musca domestica [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2006, 33(3): 56-58 (in Chinese)
- [13] 宫霞, 王兰芳, 乐国伟. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 对细菌细胞渗透性及代谢功能的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(3): 1-5
- Gong X, Wang L F, Le G W. Effect of antibacterial peptide MDL-2 from musca domestica larvae on permeability metabolism of bacteria [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2011, 33(3): 1-5 (in Chinese)
- [14] 陈玉洁, 敖日格乐, 王纯洁, 斯木吉德. 酸马奶提取 *Kluyveromyces marxianus* 代谢抗菌复合物对致病性大肠杆菌的抑菌和细胞表面特性的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 683-689
- Chen Y J, Aorigele, Wang C J, Simujide. Effects of antimicrobial compounds of *Kluyveromyces marxianus* in Koumiss on pathogenic *Escherichia coli* and its cell surface characteristics [J]. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 683-689 (in Chinese)
- [15] 李凡, 刘晶星, 徐志凯. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008
- Li F, Liu J X, Xu Z K. *Medical Microbiology* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2008 (in Chinese)
- [16] 陈玉洁. 酸马奶源酵母菌代谢物对致病性大肠杆菌的抑菌作用机理研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学 2015
- Chen Y J. Study of Antibacterial Mechanism of Yeasts Metabolites from Koumiss on Pathogenic *Escherichia coli* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University 2015 (in Chinese)
- [17] 宋越. 致犊牛腹泻病 *E. coli* 分离鉴定和治疗其蒙药抑菌成分筛选及作用的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015
- Song Y. The study on the isolation and identification of *E. coli* of calf diarrhea and the treatment of Mongolian medicine antibacterio components selection and the function [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University 2015 (in Chinese)

责任编辑: 苏燕