

# 基于单细胞拉曼光谱研究大蒜提取物对金黄色葡萄球菌的作用

刘雯洁<sup>1, 2</sup>, 吴忻禹<sup>1, 2</sup>, 刘碧涵<sup>2</sup>, 何林<sup>3</sup>, 张陆成<sup>2</sup>, 黎永青<sup>1, 2</sup>

1. 广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心, 广西 南宁 530021;
2. 广西医科大学生命科学研究院生物医学光子学研究中心, 广西 南宁 530021;
3. 东莞理工学院电子工程与智能化学学院, 广东 东莞 523808

**摘要** 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SAU) 是临床感染常见的病原菌, 而大蒜拥有广泛的抑菌作用, 本研究使用蒸馏水作为溶剂从新鲜大蒜中获得大蒜提取物, 并使其作用于 SAU, 使用结晶紫方法测定其生物膜浓度, 以及通过单细胞拉曼光谱监测不同时间点的作用效果。研究表明, SAU 在大蒜提取物中的 MIC 值为 0.4%。此外, 大蒜提取物对 SAU 形成的生物膜具有明显的清除作用, 在 16h 时, 其生物膜浓度到达较低水平。其拉曼光谱结果显示代表核酸的波段  $724\text{cm}^{-1}$ 、 $780\text{cm}^{-1}$ 、 $1573\text{cm}^{-1}$  峰强度减弱, 可以明确的是大蒜提取物对 SAU 具有抑制作用, 其作用机制可能是因为大蒜提取物作用于细菌的细胞壁, 导致其通透性增加, 最后导致核酸等细胞内容物的流失。

**关键词** 金黄色葡萄球菌; 大蒜提取物; 生物膜; 单细胞拉曼光谱; 核酸流失

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1007-0745(2023)03-0053-03

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SAU) 是一种革兰阳性球菌, 是人类和动物微生物感染的重要病原体<sup>[1]</sup>, 在全球范围内, 每年在引起的不复杂的皮肤感染数量难以估计, 可能有数十万到数百万例更严重的侵入性感染<sup>[2]</sup>, 可以造成呼吸道以及创口的感染, 心内膜炎, 引起菌血症等<sup>[3]</sup>, 食源性的 SAU 可造成呕吐、腹泻等症状, 而 SAU 感染的治疗通常是使用  $\beta$ -内酰胺类抗生素, 随着抗生素的广泛使用, 逐渐出现了对抗生素耐药的现象, 甲氧西林等被开发使用, 而耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 就应运而生了<sup>[4]</sup>。细菌对抗生素耐药现象的日益凸显, 迫切需要寻找抗生素替代治疗的药物。

大蒜具有悠久的药用历史, 具有广泛的抗菌活性, 直到 1944 年才被确定大蒜中主要的抗菌活性成分为大蒜素<sup>[5]</sup>, 同时还含有多种活性成分, 包括乙烯基二硫磷脂 (vinylidithiins)、阿霍烯 (ajoenes) 和 diallyl polysulfides<sup>[6]</sup>。大蒜中的大蒜素不论是单独使用还是联合用药均对细菌具有抑制效果<sup>[7]</sup>。为了进一步了解其抑菌机制, 我们使用拉曼光谱从单细胞层面来描述大蒜提取物对 SAU 的抑制效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

使用金黄色葡萄球菌 (ATCC25923), 菌株保存在  $-80^{\circ}\text{C}$ , 复苏使用; 新鲜大蒜购买自市场。LB 培养基以及 LB 琼脂培养基, 活细菌 / 死细菌双染试剂盒 (MX4234-40T)。

所用仪器包括恒温培养摇床 (上海一恒 THZ100), 旋涡混匀器 (上海沪析 Vortex-1), 超纯水机 (YYTIII-20L), 超低温冰箱 (海尔 DW-86L578J), 培养箱 (ZXDP-A2160), 医用冷藏冰冻冰箱 (海尔 HYCD-282), 生物安全柜 (海尔 HR40-IIA2), 冰冻离心机 (5840R), 超声波清洗机 (舒美 KQ-50TDE), 拉曼光谱仪 (Horiba LabRAM HR Evolution)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 从新鲜大蒜中获得大蒜提取液

挑选外表完好、无发芽的大蒜碾碎后分装 8g 至 50ml 的离心管中, 随后在  $40^{\circ}\text{C}$  的水浴锅 30 分钟孵育, 随后加入 1ml 蒸馏水继续孵育 60 分钟, 最后高速离心取上清, 并重复 5 次, 通过  $0.22\mu\text{m}$  的过滤器, 获得大蒜提取液。

★基金项目: 广西医科大学青年科学基金项目 (项目编号: GXMUYSF202337) 资助。

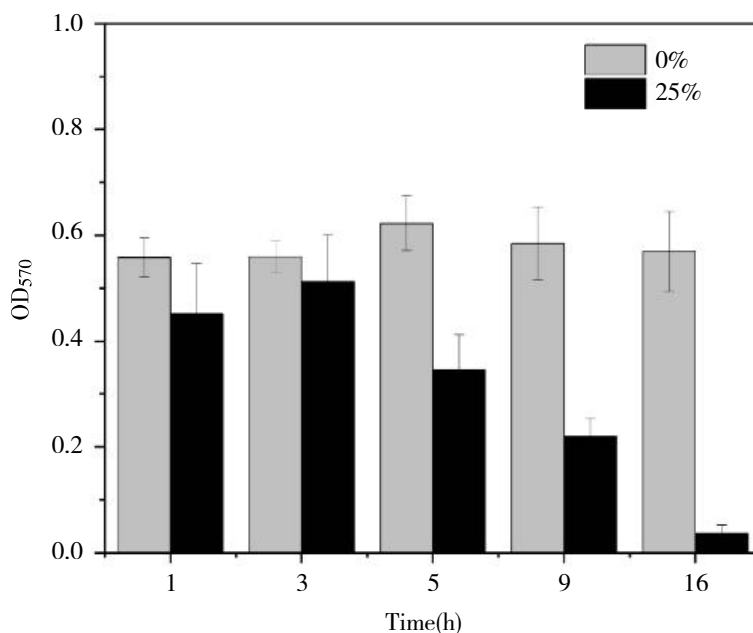


图1 使用25%大蒜提取物作用于金黄色葡萄球菌的生物膜，持续作用16h，在3h至5h间出现生物膜浓度骤降的现象

### 1.2.2 测定 SAU 在大蒜提取液的 MIC 值

获得的大蒜提取物的浓度记录为100%，将细菌复苏后，传代三次，随后使用试管法二倍稀释大蒜提取物测定金黄色葡萄球菌在大蒜提取液中的MIC值。

### 1.2.3 大蒜提取物对 SAU 生物膜的清除作用

传代三次后，将菌液稀释，调整 $OD_{600}=0.5$ ，准备96孔板，每块板实验分为三组，每组5孔，一组为空白对照，仅加100 $\mu$ l LB培养基，其余两组均为100 $\mu$ l的菌液。随后37 $^{\circ}$ C过夜培养，随后弃掉上清，空白对照组加入LB培养基，两个实验组分别加入大蒜提取物浓度为0%以及25%的LB培养基，其余4块96孔板重复上述操作，分别标记为1h, 3h, 5h, 9h, 16h，随后放入37 $^{\circ}$ C培养箱静止培养，使用结晶紫按照上述时间点对生物膜进行浓度测试。

### 1.2.4 使用拉曼光谱表征大蒜提取液作用下的 SAU 的损伤程度

将传代3次的SAU分别接种至不含有大蒜提取物以及浓度为25%的培养基中，并在不同时间点取100 $\mu$ l的菌液，然后从每个浓度和时间点随机测定30个细胞的拉曼光谱，扣除背景并去基线以及平滑。

## 2 结果

### 2.1 大蒜提取物

使用蒸馏水作为溶剂，从新鲜大蒜中所获得大蒜提取物为淡黄色澄清液体，具有大蒜的特殊气味。

### 2.2 金黄色葡萄球菌在大蒜提取物中的 MIC 值

使用二倍稀释法测定其MIC值，实验表明大蒜提取物对SAU具有明显的抑制作用，且存在浓度依赖性，浓度越高抑制作用越强，在大蒜提取物浓度为100%时，溶液澄清透亮，未发现细菌生长，其 $OD_{600}$ 值处于低水平状态，而提取物浓度为零时，试管溶液出现浑浊，当大蒜提取物浓度在溶液中的浓度低于0.4%以后，出现了细菌的生长，可以确定其MIC值为0.4%。

### 2.3 大蒜提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除作用

大蒜提取物能够对SAU所形成的生物膜起到明显的清除作用，在没有大蒜提取物作用的实验组中，从1h~16h其 $OD_{570}$ 保持在较高水平，生物膜浓度高，而在含有25%的大蒜提取物的实验组中，其吸光度值随作用时间增加而下降，生物膜浓度呈现逐渐下降的现象，在3h~5h间出现明显下降，大蒜提取物对生物膜的清除作用随着作用时间的延长而增强，到了16h，其吸光度值降到了比较低的水平。（见图1）

### 2.4 拉曼光谱表征金黄色葡萄球菌的损伤

SAU在含有不同浓度大蒜提取物的培养基中培养的，使用单细胞拉曼光谱动态监测不同时间点大蒜提取物SAU的作用效果，其单细胞拉曼光谱存在显著差异，对比未添加大蒜提取物的实验组，在25%大蒜

提取物作用以后,单细胞拉曼光谱中,其  $724\text{cm}^{-1}$ 、 $782\text{cm}^{-1}$  和  $1573\text{cm}^{-1}$  出现明显变化。

### 3 讨论

SAU 为常见的食源性致病菌,可引起食物中毒事件,对机体健康带来危害,其耐药性是非常普遍的,寻找可替代的药物是非常必要的。大蒜是常见的一种食材,可作为蔬菜或者调味剂,属于百合科地下鳞茎的植物,来源非常广泛,而且成本低廉,具有很好的药用价值,是潜在的抗生素替代选择或联合用药的参考。本研究首先使用蒸馏水提取大蒜提取物,能够获得淡黄色、液态、具有特殊气味的大蒜提取物,随后使其作用于 SAU 以探索其抑菌效果,经过实验,提取物对 SAU 具有较明显抑制作用,其 MIC 值为 0.4%。SAU 在生长过程中容易形成生物膜,该膜是 SAU 在 96 孔板中黏着、生长所形成的具有独特三维结构的细胞外的生物膜基质,包含有多糖,蛋白质以及 DNA 等物质,通过感知外界环境调控基因的表达,从而改变生物膜的合成更好地适应环境,当使用抗生素进行杀菌时,生物膜能够阻碍抗生素与细菌的接触,起到屏障作用,这也是导致细菌对抗菌药物耐药的主要原因之一,于是出现反复感染以及感染难以清除等临床常见的问题。本次研究所获得的大蒜提取物能够有效清除生物膜,将大蒜提取物与其他抗菌药物使用联合使用,或许能够获得更好的疗效。

此外,从单细胞拉曼光谱的结果来看,在大蒜提取物的作用下,代表核酸的拉曼光谱波段  $724\text{cm}^{-1}$ 、 $780\text{cm}^{-1}$ 、 $1573\text{cm}^{-1}$  的强度减弱<sup>[8]</sup>,可能的原因是大蒜提取物对细菌的细胞壁发生作用,其致使通透性发生改变,随着作用时间的延长,通透性逐渐增大,细胞内容物的流失也就更多了。

### 4 结语

SAU 作为院内感染的主要病原菌,以及耐药性的问题日益严峻,是临床上亟需解决的问题。

第一,本研究使用蒸馏水作为溶剂提取到的大蒜提取物不同于甲醇或乙醇等化学试剂所获得的,存在化学污染的可能性,该方法获得的大蒜提取液具有安全无毒,无副作用等优点,且大蒜容易获得,更有利于其药用价值的推广。

第二,本实验明确了在该提取条件下,仅需 0.4% 的浓度即可达到 MIC 值,在低浓度仍具有较好的抑制效果。

第三,本研究明确了大蒜提取物对 SAU 生物膜的

清除效果,随着作用时间的延长,其清除效果是非常显著的。

第四,本实验使用单细胞拉曼光谱动态监测描述大蒜提取物对 SAU 的杀伤效果,在大蒜提取物质的作用下,代表核酸的拉曼峰强度下降,包括  $724\text{cm}^{-1}$ 、 $780\text{cm}^{-1}$  以及  $1573\text{cm}^{-1}$ 。该实验方法不仅能够无损伤无标记在原位上来反映细菌的生化信息,更具有方便快捷的优点,能省去冗长繁琐的培养步骤,为研究工作提供便利。使用大蒜提取物能够对 SAU 产生抑制作用,为临床上细菌对抗生素的耐药性提供新的参考,有助于寻找抗生素的替代疗法,以及对于减少耐药菌的产生均具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] Schaumburg, F., Pauly, M., Anoh, E., et al. Staphylococcus aureus complex from animals and humans in three remote African regions[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015, 21(04): 345.e1–345.e8.
- [2] Rasigade, J.-P., Lina, Dumitrescu. New epidemiology of Staphylococcus aureus infections[J]. *Clinical Microbiology and Infection: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2014, 20(07): 587–588.
- [3] Gordon Y. C. Cheung, Justin S. Bae, Michael Otto. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus[J]. *Virulence*, 2021, 12(01): 547–569.
- [4] Guo Y L, Song G H, Sun M L, et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in Staphylococcus aureus[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020(10): 107.
- [5] Cavallito, Chester J., Bailey, John Hays. Allicin, the Antibacterial Principle of Allium sativum. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1944, 66(11): 1950–1951.
- [6] Nakamoto, M., Kunitamura, K., Suzuki, J. I., et al. Antimicrobial properties of hydrophobic compounds in garlic: Allicin, vinyl dithiin, ajoene and diallyl polysulfides (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 19(02): 1550–1553.
- [7] Choo, S., Chin, V. K., Wong, E. H., et al. Review: antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2020, 65(03): 451–465.
- [8] Syed, A., Smith, E. A. Raman Imaging in Cell Membranes, Lipid-Rich Organelles, and Lipid Bilayers[J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2017, 10(01): 271–291.