

烤烟烟叶浸出物对微生物生长的影响

苏罗毅¹, 飞旭云¹, 王若南², 李文鹏²

(1. 红云红河烟草(集团)有限责任公司 昆明卷烟厂, 云南 昆明 650202; 2. 云南大学 生命科学院, 云南 昆明 650091)

摘要: 采用比浊法和菌丝体湿重法测定生物量, 测定了初烤烟叶蒸馏水浸出物对 4 种细菌和 3 种真菌生长的影响。结果表明, 烟叶浸出物对细菌和真菌生长的影响不同。在剂量范围内, 烟叶浸出物对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 没有抑制作用, 对爪哇毛霉(*Mucor jaranicas*), 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) 和白色念珠菌(*Candida albicans*) 有抑制作用, 抑制率分别为 89.5%, 74.8% 和 19.4%。

关键词: 初烤烟叶; 浸出物; 微生物; 抑制作用

中图分类号: S572; Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2010)03-00035-03

Effect of Aqueous Extract from Flue-cured Tobacco Leaf on Growth of Microbes

SU Luo-yi¹, FEI Xue-yun¹, WANG Ruo-nan², LI Wen-peng³

(1. Kunming Figarette Factory, Hongyun and Honghe Tobacco (Group) Limited Company, Yunnan Kunming 650202, China;

2. School of Life Sciences, Yunnan University, Yunnan Kunming 650091, China)

Abstract: Effect of aqueous extract from flue-cured tobacco leaf on growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Canadida albicans*, *Botrytis cinerea* and *Mucor jaranicas* were investigated in vitro experiments. Differences were found between the effects of bacteria and fungi in our designed dosage. Aqueous extract from flue-cured tobacco leaf inhibited 89.5% growth rate of *Mucor jaranicas*, 74.8% of *Botrytis cinerea* and 19.4% of *Canadida albicans* respectively, while the aqueous extract had no inhibitory effects when applied to *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* respectively. The result can help us find a new way to reuse the waste tobacco leaves.

Key words: flue-cured tobacco; aqueous extract; microbes; inhibition

烟碱及烟碱转型产品(合成烟碱类物质)可作为杀虫剂,因为它能够进入虫体的神经系统,与乙酰胆碱受体相结合,致使昆虫持续兴奋而死。我国早已开始从烟叶废料中提取、加工烟碱来制造农药,或者根据烟碱的化学结构,合成类似的农药新产品,用作杀虫剂。如,不同浓度烟碱对桃蚜的生理生化产生影响^[1],对东方粉蝶幼虫寻食行为有影响和毒害作用^[2],对硬蜱具有杀灭效力^[3],10%油酸烟碱·阿维乳油对几种害虫的防治效果的研究^[4],合成的新型烟碱型杀虫剂吡虫啉作用机制研究^[5]等。烟碱和烟碱转型产品不仅杀虫效果好,毒性小,对人体伤害小,而且见光易分解成无毒物质,无残留,不污染环境。

烟碱对微生物的影响研究的报道很少,国内仅查到烟碱有促进结核分枝杆菌生长的作用^[6],硫酸烟碱有抑菌作用^[7]等方面的报道。而烤烟浸出物对微生物影响的报道尚未见到。

如果烟叶浸出物能抑制微生物生长,而烤烟浸出物的烟碱浓度这可能与上部烟叶所受到的光照条件充足、成熟程度高、烟碱含量较高等有密切关系^[8],那么将其作为抑菌剂或杀菌剂,则可以省去提取烟碱的麻烦,而且有取材方便、经济易行、易于推广等优势,同时能变废为宝,合理利用废烟叶,其应用前景将会广阔。因此本试验初步研究了烤烟烟叶浸出物对微生物生长的影响,以期为废烟叶的再利用,研发无污染的抑菌剂或杀菌剂,寻找一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*);枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*);金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus au-*

收稿日期:2010-03-17

基金项目:瑞升科技有限公司科技基金资助项目(2003010101)

作者简介:苏罗毅(1961—),女,辽宁锦州人,工程师,主要从事烤烟与微生物研究。

通讯作者:李文鹏(1968—),男,云南大理人,助理研究员,博士,主要从事资源微生物及分子进化研究, E-mail: wppli@ynu.edu.cn.

reus).

真菌:白色念珠菌(*Canadida albicans*);灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*);爪哇毛霉(*Mucor jaranicas*).以上菌种均购于云南省微生物研究所.

1.1.2 培养基

培养细菌用牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉浸膏 3 g,蛋白 10 g,NaCl 5 g,琼脂 15 g,水 1 000 mL,pH 7.0~7.2.

培养丝状真菌用马铃薯培养基(PDA):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,马铃薯清洗后去皮,称量 200 g,切成小块,加入 400~500 mL 水煮沸 30 min,用 4 层纱布过滤,向滤液中加入 20 g 葡萄糖并定溶到 1 000 mL.

培养白色念珠菌用酵母培养基:酵母膏 5 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,琼脂 15 g,水 1 000 mL.

1.1.3 烤烟

初烤烟叶为云烟-87B3F,产于昆明市的晋宁、安宁和嵩明.

1.1.4 仪器

722 型光栅分光光度计,LD4-2 型低速离心机,PL202-S 型电子天平,S.C.505 型恒温培养箱,2XZ-1 型旋片式真空泵,法国 ALLINCE 化学联系流动分析仪.

1.2 方法

1.2.1 菌种培养

供试菌种在使用前均接种于 50 mL 液体培养基中进行扩大培养.其中,4 株细菌于 37℃ 下静置培养 24 h;白色念珠菌于 28℃ 下静置培养 24 h;灰葡萄孢和爪哇毛霉于 28℃ 下静置培养 96 h,加入灭菌玻璃珠,剧烈振荡分散菌丝.

1.2.2 细菌和真菌生长的测定(比浊法)

1)细菌和酵母菌生长的测定:细菌为单细胞生物,当光线通过微生物菌悬液时,由于菌体的散射与吸收作用使光线的透过量下降.在一定的范围内,微生物细胞的浓度与透光度成反比,与光密度成正比,而光密度或透光度可以由光电比色计精确测出^[9].吸光度越大,微生物菌的浓度越高.细菌和酵母菌在 600 nm 处吸收波长最大、稳定性最好,因此可以通过吸光度法用分光光度计在 600 nm 处测定细菌和酵母菌的吸光度值(OD_{600})来测定其生长情况,通过吸光度的大小的最终变化来判断烟叶浸出物及卷烟烟气对细菌和酵母菌的影响.

2)丝状真菌生长的测定:由于真菌除少数种类为单细胞外,绝大多数真菌的营养体是由菌丝组成菌丝体^[10],不能用光电比浊来测定真菌生长,通常采用称重法来记录丝状真菌的生长状况.

本试验测定丝状真菌生长状况的方法为:用 4 000 r/min 离心机离心 15 min,取沉淀,用电子天平称量菌丝体湿重.

1.2.3 烤烟烟叶浸出物—烤烟烟叶蒸馏水提取液的制备

将烟叶在 60℃ 下烘干,研磨成粉,每 100 g 烟叶粉加 500 mL 蒸馏水,25℃ 下浸泡 24 h,用 4 层纱布过滤,再以 4 000 r/min 离心 15 min,最后用细菌过滤器过滤(针头滤器,滤膜孔径 0.45 μm),4℃ 冷藏备用.

烤烟烟叶浸出物中烟碱的含量(质量分数,以下同)委托云南省烟草质量监督检测站测定,烟碱的含量测定值为:0.48%.

1.2.4 烟叶浸出物对微生物生长影响的测定

在 50 mL 培养基中分别加入 0,2,4,8 mL 烟叶浸出物,接种 0.10 mL 液体菌种,静置培养(细菌:37℃,24 h;白色念珠菌:28℃,24 h;灰葡萄孢和爪哇毛霉:28℃,96 h),以相应的不接种烟叶浸出物培养基调零,测定细菌和白色念珠菌菌液 600 nm 处吸光度,值称重法测定菌丝体生物量的变化.

2 结果与分析

2.1 烤烟烟叶浸出物对细菌生长的影响

烤烟烟叶浸出物对细菌生长的影响(见表 1).

表 1 烤烟浸出物对细菌的影响

烟叶浸出物/mL	生物量的 OD_{600}			
	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
0	0.650	0.160	0.534	0.209
2	0.750	0.890	0.761	0.619
4	0.827	0.995	0.520	0.457
8	0.801	1.071	0.816	0.719

由表 1 可知,随着培养基中烤烟浸出物含量增加,菌液 OD_{600} 值逐渐增加,烤烟浸出物对受试的 4 株细菌的生长均表现为促进作用.

2.2 烤烟浸出物对真菌生长的影响

烤烟浸出物对真菌生长的影响(见表 2).

表 2 烤烟浸出物对真菌的影响

烤烟浸出物/mL	爪哇毛霉		灰葡萄孢		白色念珠菌	
	生物量	抑制率	生物量	抑制率	生物量	抑制率
	/g	/%	/g	/%	OD_{600}	/%
0	4.78	0	1.23	0	1.245	0
2	0.50	89.5	0.31	74.8	1.003	19.4
4	0.46	90.4	0.32	74.0	0.965	22.5
8	0.63	86.8	0.28	77.2	1.041	16.4

由表 2 可知,烤烟浸出物对真菌的生长有抑制作用.在相同的烤烟浸出物剂量下,抑制效率为:爪哇毛霉>灰葡萄孢>白色念珠菌.

3 讨论

灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers.) 是寄主范围广、经济危害性大的植物病原真菌^[11]. 该病原菌感染引起的灰霉病, 是世界性病害, 可侵染多种寄主, 在水果生长阶段和贮藏期都会引起重大经济损失.

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是人体口腔、咽喉、肠道、阴道粘膜的正常菌群, 也是重要的条件致病菌, 会引起皮肤感染、指甲感染及虚弱患者严重的全身感染等. 随着皮质类固醇、免疫抑制剂和抗生素的广泛应用, 念珠菌感染的发病率呈不断上升趋势, 在免疫抑制患者中念珠菌的发病率列居第一位, 白色念珠菌为主要致病菌, 已引起国内外医学真菌学界的重视^[12].

目前, 有效控制病原真菌的抗真菌药物主要是化学药物, 但随着化学抗真菌药物的广泛应用, 容易引起化学残留、环境污染和病原真菌耐药性等诸多问题. 由于生物防治方法具有选择性强、无副作用和廉价的特点, 利用植物提取物控制病原真菌越来越受到重视.

上述结果表明, 烤烟烟叶浸出物对灰葡萄孢和白色念珠菌的生长有抑制作用, 尤其对灰葡萄孢的抑制作用较强, 结果将为灰葡萄孢的生物防治提供了一种途径.

[参考文献]

- [1] 吴海军, 李友莲. 不同浓度烟碱对桃蚜生理生化的影响[J]. 山西农业大学学报, 2002, 22(4): 288-290.
- [2] 肖春旺. 烟碱对东方粉蝶幼虫寻食行为的影响和毒害作用[J]. 中国环境科学, 1999, 19(6): 544-547.
- [3] 李大伟. 烟碱对硬蜱的杀灭效力试验[J]. 中国兽医科技, 2002, 23(4): 30-31.
- [4] 孙新纹, 顾明洁. 10% 油酸烟碱·阿维乳油对几种害虫的防治效果[J]. 甘肃农业科技, 2003(8): 49-50.
- [5] 陈立, 徐汉虹. 新型烟碱型杀虫剂吡虫啉作用机制研究进展[J]. 湖北农学院学报, 1998, 18(3): 85-88.
- [6] 单菊生, 历学军. 烟碱对促进结核分枝杆菌生长的初步研究[J]. 中国防痨杂志, 1994, 16(1): 18-21.
- [7] 赵国林, 姜双林. 硫酸烟碱抑菌作用的研究[J]. 甘肃学报, 1997, 9(4): 68-70.
- [8] 李恒, 罗华元, 徐新阳, 等. 云南曲靖烟区烟叶挥发性致香物质组分及其含量差异研究初报[J]. 昆明学院学报, 2009, 31(3): 8-10.
- [9] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [10] 周云龙. 植物生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [11] 张中义, 何永宏, 王学英, 等. 我国灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的新寄主植物[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(4): 418-420.
- [12] 何卫东, 胡志坚. 白色念珠菌感染现状与实验诊断进展[J]. 九江医学, 2001, 16(1): 61-62.

(上接第 17 页)

$$\Phi(u) = \frac{a}{2} \|u\|^2 + \frac{b}{4} \|u\|^4 - \int_{\Omega} F(x, u) dx \leq - (m\theta^4 - \frac{b}{4}) \|u\|^4 + \frac{a}{2} \|u\|^2 + C_m |\Omega|,$$

即 Φ 在 X 上反强制.

对上述充分小的 $\varepsilon > 0$, 定义 $U = \{u \in B_{\delta} \cap C_0^1(\bar{\Omega}) : \Phi(u) < \frac{a}{4}(1 - \frac{\lambda_1 - \varepsilon}{\lambda_1})\delta^2\}$, 则 U 是 0 的一个不变邻域. 设 $C_{0(\bar{\Omega})}^1(U)$ 是 U 的扩张不变邻域, 则 $V = C_{0(\bar{\Omega})}^1(U) \cap Y$ 是 Y 中的有界邻域. 注意到泛函 Φ 满足 (PS) 条件, 并使用文献[1] 中的第 2 个、第 3 个引理和第 3 个定理便得到我们所需要的结论.

[参考文献]

- [1] MAO A, ZHANG Z. Sign-changing and multiple solutions of Kirchhoff type problems without the P. S. condition[J]. Nonlinear Analysis, 2009, 70(3): 1275-1287.
- [2] ALVES C O, CORREA F J S A, MA T F. Positive solutions for a quasilinear elliptic equation of Kirchhoff type[J]. Computers & Mathematics with Applications, 2005, 49(1): 85-93.
- [3] AROSIO A, PANIZZI S. On the well-posedness of the Kirchhoff string[J]. Transactions of the American Mathematical Society, 1996, 348: 305-330.
- [4] CAVALCANTI M M, DOMINGOS V N, SORIANO J A. Global existence and uniform decay rates for the Kirchhoff-Carrier equation with nonlinear dissipation[J]. Advances Differential Equations, 2001, 6: 701-730.
- [5] CHIPOT M, LOVAT B. Some remarks on nonlocal elliptic and parabolic problems[J]. Nonlinear Analysis, 1997, 30(7): 4619-4627.
- [6] D'ANCONA P, SPAGNOLO S. Global solvability for the degenerate Kirchhoff equation with real analytic data[J]. Inventiones Mathematicae, 1992, 108(1): 247-262.
- [7] POHOZAEV S I. A certain class of quasilinear hyperbolic equations[J]. Mathematics of the USSR-Sbornik, 1975, 96: 152-168.
- [8] CHENG B T, WU X. Existence results of positive solutions of Kirchhoff type problems[J]. Nonlinear Analysis, 2009, 71: 4883-4892.