

# 植物精油对铜绿假单胞菌抗菌作用的研究

吴克刚, 赵三娥, 柴向华, 赵欣欣

(广东工业大学轻工化工学院食品科学与工程系, 广东广州 510006)

**摘要:** 采用气相熏蒸法研究了松针油、香茅油、依兰油、康酿克油、山苍子油、莪术油、鼠尾草油、沉香木油、艾叶油、迷迭香油十种植物精油对铜绿假单胞菌的气相抗菌活性, 通过测定各种植物精油的最低抑菌浓度比较其抗菌效果。实验结果表明: 山苍子精油和香茅精油的抑菌效果最好, 其最低抑菌浓度均为 250  $\mu\text{L/L}$ ; 鼠尾草油和依兰油的最低抑菌浓度均为 500  $\mu\text{L/L}$ ; 艾叶油、莪术油和迷迭香油的最低抑菌浓度均为 1000  $\mu\text{L/L}$ ; 松针油、康酿克油和沉香木油未表现明显抗菌活性。山苍子油和香茅油以 2:3 和 3:2 进行复配时表现出显著协同增效效果, 复配物空间体积浓度为 100  $\mu\text{L/L}$  时就能完全抑制铜绿假单胞菌的生长。不同溶剂对复配精油抗菌活性有所影响, 以冰乙酸为溶剂抗菌效果最好, 乙醇其次, 甘油和丙二醇稍差。

**关键词:** 植物精油; 铜绿假单胞菌; 抗菌; 气相

文章编号: 1673-9078(2013)12-2830-2833

## Antibacterial Effect of Plant Essential Oils Against *Pseudomonas aeruginosa*

WU Ke-gang, ZHAO San-e, CHAI Xiang-hua, ZHAO Xin-xin

(Department of Food Science and Engineering, Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The gas phase fumigation was used to study the vapor antibacterial activity of ten plant essential oils, namely pine needle oil, citronella oil, Ylang oil, Kang Niangke oil, Litsea cubeba oil, curcuma zedoary oil, sage oil, agarwood oil, mugwort oil, rosemary oil, against *Pseudomonas aeruginosa*. Antibacterial effects were compared by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC). Results showed that Litsea cubeba oil and citronella oil presented the best inhibitory effects against *Pseudomonas aeruginosa*, the MIC of which were 250  $\mu\text{L/L}$ , followed by sage oil and ylang oil with MIC of 500  $\mu\text{L/L}$ . The MIC of mugwort oil, curcuma zedoary oil and rosemary oil were 1000  $\mu\text{L/L}$ . Pine needle oil, Kang Niangke oil and agarwood oil showed no obvious antibacterial activities. When the compound ratio of Litsea cubeba oil and citronella oil was 2:3 or 3:2, they appeared significant synergistic effects. When the space volume concentration was 100  $\mu\text{L/L}$ , the compound completely inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Different solvents had different antimicrobial activities on the compound essential oils, among which ice acetic acid had the best effect, followed by ethanol.

**Key words:** plant essential oil; *Pseudomonas aeruginosa*; bacteriostasis; gaseous phase

铜绿假单胞菌是一种常见的致病菌, 极易产生耐药性, 其对抗生素的耐药往往不是由单一因素造成的, 在临床分离的革兰阴性菌中所占比率最大。许宏涛等<sup>[1]</sup>研究结果显示, 铜绿假单胞菌具有多重耐药性, 能拮抗多种抗菌药物, 而且随着抗菌药物的大量使用及铜绿假单胞菌感染的日益增多, 铜绿假单胞菌的耐药株也相应增多, 这给临床用药带来极大困难。因此, 合理选择抗菌药物和尝试开发安全、高效的新型抗菌药物变得很有必要, 而这一课题也将成为临床上抗菌

研究的重要课题。

近年来, 国内外许多研究表明, 一些植物精油及其主要成分具有明显抗菌活性, 特别是一些香辛植物精油因其天然、安全、高效抗菌作用, 更成为近年来抗菌防腐研究的热点。A Alexopoulos 等<sup>[2]</sup>研究表明, 大麦精油和白藜精油对金黄色葡萄球菌的抑菌效果很明显。K Cimanga 等<sup>[3]</sup>研究从 15 种生长在刚果的芳香植物提取出来的植物精油的抗菌活性, 结果表明, 赤桉精油对铜绿假单胞菌的抑菌能力最强, 其次为白柠檬精油。国内也有许多关于植物精油抗菌作用的研究。钟振声等<sup>[4-5]</sup>对 5 种常见中草药进行提取和抑菌实验, 研究表明蒲公英对所选的霉菌具有很强的抑制作用, 再以大肠杆菌、沙门氏菌为供试菌种, 研究了蒲公英

收稿日期: 2013-08-27

基金项目: 广东省部产学研合作专项资金(2012A090300010, 2012B091100477, 2011A090200004)

作者简介: 吴克刚(1969-), 男, 教授, 硕士生导师, 从事食品化学研究

抑菌活性物质提取工艺的优化。刘晓丽等<sup>[6]</sup>研究证明,丁香精油、肉桂精油及混合精油对多种菌生长具有抑制作用,具有可作为不直接添加到食品基质中食品防腐剂潜力。顾仁勇等<sup>[7]</sup>研究表明,连翘精油对 G<sup>+</sup>和 G<sup>-</sup>细菌、霉菌和酵母均有很强的抑制作用,抑菌效果随 pH 值的降低而增强。P Lopez 等<sup>[8]</sup>通过测定肉桂精油、丁香精油、迷迭香精油等六种植物精油对革兰氏阳性菌、

阴性菌及真菌的最低抑菌浓度,比较其气相、固相抗菌活性,结果表明,供试菌除了铜绿假单胞菌都对选取的植物精油比较敏感,证明铜绿假单胞菌的强耐抗性和植物精油在食品行业中的发展前景。吴克刚等<sup>[9]</sup>利用气相熏蒸法,研究比较几种植物精油及单离香料对生湿面制品常见腐败菌抗菌活性,通过香料间协同增效复配,以提高复合香料对生湿面制品抗菌活性。本文研究比较十种植物精油气相对铜绿假单胞菌的抗菌作用,为利用植物精油熏蒸抑制空气铜绿假单胞菌提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

植物精油(松针油、香茅油、依兰油、康酿克油、山苍子油、莪术油、鼠尾草油、沉香木油、艾叶油、迷迭香油):广东工业大学食品添加剂与食品安全研究室;菌种(铜绿假单胞菌):广州微生物研究所;营养琼脂培养基:广东环凯微生物科技有限公司;其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F 超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司;SPX-250 生化培养箱:上海锐丰仪器仪表有限公司;DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;LDZX-9140 立式自控电热压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌种活化和菌悬液的制备

将铜绿假单胞菌菌种在 37 °C 进行活化接种,取活化的菌液划线,在 37 °C 培养箱培养 24 h 后,从其上挑取菌落,采用麦氏比浊法用无菌生理盐水稀释成所需浓度(10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> cfu/mL)的菌悬液,备用。

#### 1.3.2 植物精油最低抑菌浓度(MIC)的测定

将各种精油用溶剂稀释成体积浓度为 20% 的精油溶液,备用。

每个培养皿加入 15 mL 46 °C 左右培养基,待培养基自然冷却后,用无菌移液枪吸取稀释好的悬液 0.1 mL,加入已倒好培养基的平皿中涂布均匀。待培养基上的菌悬液不再流动后,把平皿倒置,用镊子在每个培养皿的血盖上放置一滤纸圈。然后用移液枪分别吸取不同体积的上述体积浓度为 20% 的各种精油溶液到培养皿血盖上的滤纸圈上,同时做相应溶剂对照实验和空白对照实验,每组实验做两个平行,用封口膜密封每个培养皿,在 37 °C 培养 24 h。观察平板长菌情况,以完全不长菌培养皿所对应的浓度为最低抑菌浓度(MIC 值)。

#### 1.3.3 联合抑菌效果评价

以分级抑菌浓度(Fractional inhibitory concentration, FIC)指数作为联合抗菌试验效果判定依据。FIC 指数计算<sup>[10]</sup>: MIC<sub>A</sub> 组分联合/MIC<sub>A</sub> 组分单用+MIC<sub>B</sub> 组分联合/MIC<sub>B</sub> 组分单用。

FIC 指数判定标准为: FIC 指数<0.5 时为协同作用; 0.5≤FIC 指数<1 为相加作用; 1≤FIC 指数<2 为无关; FIC 指数≥2 时为拮抗作用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 十种植物精油对铜绿假单胞菌抗菌活性的研究

的研究

为了解选用的各种精油对铜绿假单胞菌的抗菌效果,通过测定每种精油的最低抑菌浓度对其抑菌效果进行研究。实验得出十种精油对该种菌的最低抑菌浓度如表 1 所示。

表 1 十种精油对铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度(MIC)/(μL/L)

Table 1 The minimal inhibitory concentrations (MIC) of ten kinds of essential oils against *Pseudomonas aeruginosa*

精油空间体积浓度/(μL/L)	松针	依兰	香茅	康酿克	艾叶	莪术	沉香木	迷迭香	鼠尾草	山苍子	丙二醇对照	空白对照
125	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++
250	++	+	-	++	++	++	++	++	+	-	++	++
500	++	-	-	++	++	+	++	+	-	-	++	++
1000	+	-	-	++	-	-	++	-	-	-	++	++

注:“++”表示菌种生长良好,“+”表示有菌种生长较弱,“-”表示完全不长菌。

由表 1 可知, 经过精油的熏蒸作用, 依兰油、香茅油、艾叶油、莪术油、迷迭香油、鼠尾草油、山苍子油对铜绿假单胞菌的生长都有不同程度抑制作用, 其中抑菌效果最好的是香茅油和山苍子油, 当培养皿中香茅油和山苍子油的空间体积浓度为 250  $\mu\text{L/L}$  时, 就能完全抑制供试菌的生长, 其次为依兰油和鼠尾草油, 当培养皿中依兰油和鼠尾草油的空间体积浓度为 500  $\mu\text{L/L}$  时, 就能完全抑制供试菌的生长, 艾叶精油、莪术精油和迷迭香精油虽有表现出一定程度的抗菌活性, 但效果相对不明显, 其最低抑菌浓度为 1000  $\mu\text{L/L}$ , 松针油、康酿克油和沉香木油在试验的精油浓度范围内未表现对铜绿假单胞菌明显的抑菌效果。

实验所用十种植物精油均采用超临界二氧化碳萃取<sup>[11]</sup>而得, 能有效提高精油的萃取得率, 获得纯度较高, 成分稳定的精油产品。通过实验筛选到有明显抑菌效果的山苍子油、香茅油、鼠尾草油和依兰油的主要活性物质有柠檬醛、香茅醛、丁香酚, 其中柠檬醛在山苍子油中占 66~90%, 香茅醛在香茅油中的比例为 35~45%, 丁香酚同是鼠尾草油和依兰油的主要成分。周玉慧等<sup>[12]</sup>研究表明, 柠檬醛能影响真菌细胞中遗传物质的合成, 导致细胞正常周期不能完成, 从而达到抑制真菌的生长和繁殖。张杰等<sup>[13]</sup>通过丁香酚对灰葡萄孢的抑制作用研究, 证明灰葡萄孢不同菌株对丁香酚的敏感性不同, 丁香酚易挥发, 对子囊菌、卵菌、丝核菌和半知菌等不同种类真菌均有抑制作用, 表明其抑菌谱较广。

## 2.2 山苍子精油和香茅精油对铜绿假单胞菌抑菌的协同效应研究

为提高植物精油的广谱抑菌活性, 分别选取抑菌效果最好的香茅油和山苍子油进行复配, 探讨两种精油之间不同添加量对铜绿假单胞菌的抑菌作用, 确定两者之间的最佳复配比例及不同比例复合精油的最低抑菌浓度, 结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 山苍子和香茅的 4 种不同比例的复配精油均比两种单离精油的最低抑菌浓度要低。当山苍子精油:香茅精油=1:4 和 4:1 时, 复合精油的空间体积浓度达到 125  $\mu\text{L/L}$  可完全抑制铜绿假单胞菌的生长, 其最低抑菌浓度为 125  $\mu\text{L/L}$ 。当山苍子精油:香茅精油=2:3 和 3:2 时, 复合精油的空间体积浓度达到 100  $\mu\text{L/L}$  可完全抑制铜绿假单胞菌的生长, 其最低抑菌浓度为 100  $\mu\text{L/L}$ 。由表 1 中显示的单一精油最低抑菌浓度和表 2 得出的复配物最低抑菌浓度可计算出山苍子精油和香茅精油比例为 2:3 和 3:2 时的 FIC 值均为 0.4

( $\text{FIC}<0.5$ ), 这说明山苍子和香茅之间在其比例为 2:3 和 3:2 时存在协同增效作用, 使其在较低浓度下就能达到较好抑菌效果。而当山苍子精油和香茅精油比例为 1:4 和 4:1 时的 FIC 值均为 0.5 ( $0.5\leq\text{FIC}<1$ ), 这说明山苍子和香茅之间在其比例为 1:4 和 4:1 时仅存在相加作用, 得出山苍子和香茅的复合精油之间的最佳复配比例为 2:3 和 3:2。目前, 研究者越来越关注植物精油之间的复配研究, 钱昆等<sup>[14]</sup>通过研究黄连、甘草、丁香、肉豆蔻四种提取液的复配抑菌, 得出效果最好的两组配比( $m:m:m:m$ )是 8:5:2:8 和 1:4:4:4。复配后的抑菌效果要明显强于单独使用, 说明复配各成分之间存在协同增效效果。

表 2 山苍子精油和香茅精油复配物对铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度/ $(\mu\text{L/L})$

Table 2 The minimal inhibitory concentrations (MIC) of the compound of *Litsea cubeba* oil and citronella oil against

山苍子油 :香茅油	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 复配物空间体积浓度/ $(\mu\text{L/L})$					
	25	50	75	100	125	150
0:1	+	+	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+	-	-
2:3	+	+	+	-	-	-
3:2	+	+	+	-	-	-
4:1	+	+	+	+	-	-
1:0	+	+	+	+	+	+
丙二醇对照	++	++	++	++	++	++
空白对照	++					

注:“++”表示菌种生长良好,“+”表示菌种生长但较弱,“-”表示完全不长菌。

## 2.3 溶剂对山苍籽-香茅复合精油抗菌活性影响的研究

选用丙二醇、丙三醇、冰乙酸、乙醇三种溶剂, 研究复配精油以不同溶剂对铜绿假单胞菌抗菌效果的影响, 结果如表 3 所示。

实验结果, 山苍子精油和香茅精油比例为 2:3 和 3:2 时, 不同溶剂复配精油均有明显抗菌活性, 其中冰乙酸的抗菌效果最好, 其次是乙醇, 丙二醇和丙三醇略差。冰乙酸和无水乙醇气相本身对铜绿假单胞菌有抑菌活性, 二者 MIC 值分别为 75  $\mu\text{L/L}$  和 100  $\mu\text{L/L}$ , 而丙二醇和丙三醇由于不能挥发形成气相未表现出对铜绿假单胞菌的抑菌活性。另外, 冰乙酸和无水乙醇的易挥发性也促进了精油的挥发, 提高了气相中精油抗菌活性成分的浓度, 从而提升了抗菌效果。因此,

冰乙酸和无水乙醇作为溶剂更适于精油气相熏蒸抗菌。

表 3 不同溶剂复配精油对铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度  
( $\mu\text{L/L}$ )

Table 3 The minimal inhibitory concentrations (MIC) of different solvents on the compound essential oils against

溶剂	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	山苍子油:香茅油	
	2:3	3:2
丙二醇	100	100
丙三醇	100	125
无水乙醇	75	75
冰乙酸	50	50

### 3 结论

松针油、香茅油、依兰油、康酿克油、山苍子油、莪术油、鼠尾草油、沉香木油、艾叶油、迷迭香油对铜绿假单胞菌都有一定程度抑制作用。总的结果来看,当以丙二醇为溶剂时,其中抑菌效果最好的是山苍子油和香茅油,其最低抑菌浓度都为  $250 \mu\text{L/L}$ ,其次为鼠尾草精油和依兰精油,其最低抑菌浓度都为  $500 \mu\text{L/L}$ ,而艾叶、莪术、迷迭香精油表现出的抗菌活性并不明显。而将抑菌效果最好的山苍子油和香茅油以不同比例进行复配,二者在最适比例为 2:3 和 3:2 时表现出显著协同增效效果,复配物空间体积浓度为  $100 \mu\text{L/L}$  时就能完全抑制铜绿假单胞菌的生长。进一步研究发现,不同溶剂对复配物的抗菌效果有所影响,冰乙酸和乙醇作为溶剂时更有利于复合精油发挥抗菌作用,至于影响机理还需要进一步研究证明。

### 参考文献

- [1] 许宏涛,张秀珍.医院感染铜绿假单胞菌多重耐药机制的研究[J].中国抗感染化疗杂志,2005,5(3): 141-145  
Xu Hong-tao, Zhang Xiu-zhen. Study on the Resistance Mechanism of Nosocomial Isolates of Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin. J. Infect. Chemother., 2005, 5(3): 141-145
- [2] A Alexopoulos, A C Kimbaris, S Plessas, et al. Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. Anaerobe, 2011, 17: 399-402
- [3] K Cimanga, K Kambu, L Tona, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 79: 213-220
- [4] 钟振声,黄景怡,蒲公英等五种常见中草药的抑菌研究[J].现代食品科技,2007,23(6):14-17  
Zhong Zhen-sheng, Huang Jing-yi. Study on the Bacteriostatic Action of Five Common Chinese Herbs [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(6): 14-17
- [5] 钟振声,赵蓓蓓,孙昂.蒲公英抑菌物质的提取工艺研究[J].现代食品科技,2009,25(1):57-61  
Zhong Zhen-sheng, Zhao Bei-bei, Sun Ang. Extraction of Bacteriostatics from *Taraxacum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(1): 57-61
- [6] 刘晓丽,钟少枢,吴克刚,等.丁香和肉桂精油气相抑菌活性研究[J].食品与发酵工业,2010,36(1):21-24  
Liu Xiao-li, Zhong Shao-shu, Wu Ke-gang, et al. Study on Gas-phase Antibacterial Effect of Plant Essential Oils of cloves and cinnamon [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(1): 21-24
- [7] 顾仁勇,李佑稷,傅伟昌.连翘精油抑菌及抗氧化作用研究[J].现代食品科技,2008,24(2):120-122  
Gu Ren-yong, Li You-ji, Fu Wei-chang. Study on the Anti-oxidation and Bacteriostasis of Forsythia suspense Essential Oil [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 120-122
- [8] P Lopez, C Sanchez, R Batlle, et al. Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 6939-6946
- [9] 吴克刚,赵欣欣,谢佩文,等.植物精油及单离香料熏蒸控制生湿面制品腐败微生物研究[J].粮食与油脂,2012,6:14-16  
Wu Ke-gang, Zhao Xin-xin, Xie Pei-wen, et al. Study on fumigation inhibitory effect of plant essential oil and isolate spices on spoilage organisms of wet-fresh noodle [J]. Journal of Cereals and Oils, 2012, 6: 14-16
- [10] 吕飞.天然植物精油的抑菌活性及其作用机理研究[D].北京:北京化工大学,2011
- [11] Guan Wenqiang, Li Shufen, Yan Ruixiang, et al. Comparison of Essential Oils of Clove Buds Extracted with Supercritical Carbon Dioxide and Other Three Traditional Extraction Methods [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 1558-1564
- [12] 周玉慧,甘仙女,陈尚研,等.山苍子油及柠檬醛提取分离与生物活性研究进展[J].生物灾害科学,2013,36(2):148-153  
Zhou Yu-hui, Gan Xian-nv, Chen Shang-yan, et al. Research Progress in the Extract and Separation and the Biological Activity of Citral and Litsea cubeba Oil [J]. Biological

- Disaster Science, 2013, 36(2): 148-153
- [13] 张杰,王春梅,程罗根,等.丁香酚对灰葡萄孢的抑制作用研究[J].农药学学报,2008,10(1):68-74
- Zhang Jie,Wang Chun-mei,Cheng Luo-gen, et al. Inhibition Activity of Eugenol to Botrytis cinerea [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2008, 10(1): 68-74
- [14] 钱昆,周涛.复配植物抑菌物的超临界萃取及其抑菌特性研究[J].食品科学,2006,27(11): 369-372
- Qian Kun, Zhou Tao. Study on Extraction Antimicrobial Agent with Supercritical Fluid Extraction from Combined Plants and Its Antimicrobial Activities [J]. Food Science, 2006, 27(11): 369-372

现代食品科技