

8种植物精油对肠道常见微生物体外抑菌效果的研究

吴克刚^{1,2}, 罗敏婷¹, 魏浩³

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006) (2. 广东省香飘三创(产学研)众创平台, 广东广州 510006)
(3. 广州市香思馨情健康科技有限公司, 广东广州 510006)

摘要: 通过测定抑菌圈直径、最低抑菌浓度和最小杀菌浓度, 研究八种植物精油(肉桂油、牛至油、百里香油、桉叶油、茶树油、薄荷油、迷迭香油和茴香油)对肠道致病菌和益生菌的体外抑菌活性并与五种抗生素比较。结果表明: 八种植物精油均对肠道致病菌和益生菌具有一定的抑杀能力, 其中综合抑菌效果最好的是肉桂和牛至, 其对黄曲霉和肠道益生菌的抗菌效果远远优于抗生素; 肉桂与牛至进行复配时, 其对肠道致病菌的抑制作用全表现相加作用(FICI≤0.75), 而对肠道益生菌的生长却没有影响(FICI=1)。通过GC-MS分析, 肉桂油的主要活性成分为肉桂醛(52.17%)、邻甲氧基肉桂醛(15.18%)和香豆素(2.83%); 牛至油的主要活性成分为香芹酚(51.73%)、对伞花烺(8.50%)和 γ -松油烯(7.66%)。实验表明, 肉桂和牛至复合精油的抗细菌效果可与抗生素媲美, 且有着抗生素不可替代的抗真菌效果, 为开发新型绿色、安全、高效的抗生素替代品提供有效的理论依据。

关键词: 植物精油; 肠道微生物; 体外抑菌; 主要活性成分

文章篇号: 1673-9078(2017)6-133-141

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.020

Evaluation of the *In Vitro* Antimicrobial Effects of Eight Plant Essential Oils against Common Intestinal Microorganisms

WU Ke-gang^{1,2}, LUO Min-ting¹, WEI Hao³

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)
(2. Platform of Xiangpiao Three Creativity (Research), Guangzhou 510006, China)
(3. Xiangsi Xinqing Health and Technology Co., Ltd, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The *in vitro* antimicrobial activities of eight edible plant essential oils (cinnamon oil, oregano oil, thyme oil, eucalyptus oil, tea tree oil, peppermint oil, rosemary oil, and anise oil) against intestinal pathogens and probiotics were investigated by measuring the inhibition zone diameter, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC), and the results were compared with those of five antibiotics. All eight plant essential oils had an inhibitory effect on the intestinal pathogens and probiotics. Among them, the best overall antibacterial effect was shown by cinnamon oil and oregano oil, whose inhibitory effects on *Aspergillus flavus* and probiotics were far superior to those of the antibiotics. The combination of cinnamon oil with oregano oil resulted in synergistic effect on the inhibition of the intestinal pathogens (fractional inhibitory concentration index [FICI]≤0.75), but had no impact on the growth of probiotics (FICI=1). Gas chromatography-mass spectrometry analysis revealed that the major components of cinnamon oil were cinnamaldehyde (52.17%), *o*-methoxycinnamaldehyde (15.18%), and coumarin (2.83%). The main components of oregano oil were carvacrol (51.73%), *p*-cymene (8.50%), and γ -terpinene (7.66%). The mixture of cinnamon oil and oregano oil had an equivalent antibacterial effect with the antibiotics, and had a unique antifungal effect that the antibiotics did not possess. This study provides an effective theoretical basis for the development of a new, green, safe, and effective alternative to antibiotics.

Key words: plant essential oils; intestinal microorganism; *in vitro* bacteriostasis; main active ingredient

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 广东省科技计划项目(2016B010122054、2015B020204002、2014B020205005、2013B090600051)

作者简介: 吴克刚(1969-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 食药植物精油在健康领域的应用研究

通讯作者: 罗敏婷(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食药植物精油在健康领域的应用研究

近几年来, 细菌耐药性的问题已引起了世界各国的广泛关注, 抗生素的不合理应用甚至滥用是造成细菌耐药的重要因素之一^[1,2]。抗生素的滥用主要表现在临床用药、病患者以及畜牧业使用不合理等3个方面, 在畜牧业中滥用的问题尤为严重, 正威胁着人类的健康^[3,4]。2015年我国史上最严《食品安全法》和2016年“禁抗令”的出台, 预示着寻找开发新型、绿色、安

全、高效的抗生素替代品已成大势所趋。

植物精油是一类植物体内的次级代谢物质,是世界公认安全性的物质。许多研究证实,植物精油凭借自身具有抗菌消炎、抗氧化、延缓衰老等多种生物活性,已被广泛应用于医疗保健、食品工业和日化产品等领域中^[5]。牛至油因其天然、无残留、抗菌及不容易产生抗药性等特点,已被我国农业部批准作为一种可长期添加的药物饲料添加剂^[6],从而说明天然植物提取物作为抗生素替代品是一种具有较大潜力的方向。肠道菌群是一个由益生菌、条件致病菌和病原菌组成的复杂生态系统,其微生物种类超过 1000 种。其中益生菌主要有乳杆菌和双歧杆菌等,大肠埃希氏菌属是肠道最为常见的引起腹泻的致病菌,肠道的病原菌还包括通过食用外界霉变的食物而进入肠道的霉菌,其中常见的有黄曲霉。抗生素主要作为抗菌素使用,对致病微生物有着良好的抑制和杀灭作用,适量的使用在肠道体内起到的主要作用是调节肠道菌群^[7]。然而众多资料显示,根据植物精油的抑菌机理可知其对任何微生物都会起到抑制作用,但是不同活性成分的植物精油对微生物的抑制强度都不一样^[8]。因此,通过植物精油间协同增效可能有助于寻找出在抑制致病菌生长的同时对益生菌生长没有显著影响的复配植物精油,从而能达到抗生素调节肠道内菌群平衡作用。

国内外一直致力于植物精油对致病菌抑菌活性的研究,事实证明植物精油有着无法比拟的天然抑菌功效,但是植物精油对益生菌生长影响的研究尚未见报道^[9]。所以本文研究了不同活性成分的植物精油对常见肠道微生物的抑菌效果,通过植物精油间协同增效效应进行复配,以筛选出抑制肠道致病菌生长的同时对肠道有益菌生长没有显著影响的复配精油,并分析其化学组成成分,为开发新型绿色、安全、高效的抗生素替代品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验菌种:肠产毒性大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)(K88ac 菌株),广州美瑞泰科生物工程技术有限公司惠赠;肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhage Escherichia coli*, EHEC)ATCC 35150(O157: H7)、致泻性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)CICC 10411(O127: K63)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)ATCC 4356、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium Bifidum*)ATCC 29521、黄曲

霉(*Aspergillus flavus*)ATCC 9643、药敏质控菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC 25922 均由广东省微生物研究所提供。

植物精油(肉桂油、牛至油、百里香油、茶树油、桉叶油、薄荷油、迷迭香油和茴香油):广东香飘三创(产学研)众创平台提供。

抗生素药敏片(四环素、阿莫西林、多粘菌素 B、卡那霉素和恩诺沙星):杭州微生物试剂有限公司。

厌氧培养袋、厌氧产气袋、氧气指示剂:日本三菱瓦斯化学株式会社(INC)。

M-H 琼脂培养基、M-H 液体培养基、营养琼脂培养基、营养肉汤、孟加拉红培养基、霉菌液体培养基、MRS 琼脂培养基、MRS 液体培养基、BBL 琼脂培养基和 BBL 液体培养基:广东环凯微生物科技有限公司。

无水乙醇,为分析纯。

1.2 仪器与设备

YX-280D MODE 不锈钢手提式压力蒸汽灭菌锅:合肥华泰医疗设备有限公司;DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;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;SHA-BA 恒温振荡器:常州澳华仪器有限公司;GCMS-QP2010 Plus 气相色谱-质谱联用仪:日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌悬液的制备

大肠杆菌属菌悬液的制备:先在平板上划线活化菌种,置于 37 °C 培养箱有氧培养 24 h 后,从平板上挑取单个菌落,采用麦氏比浊法制成 0.5 麦氏单位的菌悬液(1.5×10^8 CFU/mL),用无菌水倍比稀释到所需浓度的菌悬液($10^5 \sim 10^6$ CFU/mL),备用。

乳酸菌属菌悬液的制备:先在平板上划线活化菌种,与厌氧产气袋和氧气指示剂一并放入厌氧培养袋中,然后锁紧厌氧培养袋并观察氧气指示剂的颜色由蓝色变成粉红色后,再置于 37 °C 培养箱厌氧培养 48 h,从平板上挑取单个菌落,采用麦氏比浊法制成 0.5 麦氏单位的菌悬液(1.5×10^8 CFU/mL),用无菌水倍比稀释到所需浓度的菌悬液($10^5 \sim 10^6$ CFU/mL),整个操作需要在 20 min 内完成,备用。

霉菌孢子悬液的制备^[19]:先在平板上划线活化菌种,置于 28 °C 培养箱培养 5~7 d,待长出孢子后用无菌水进行洗脱,并置于 196 r/min、28 °C 恒温振荡器中进行 30 min 充分震荡,然后使用血球计数板进行计

数,最后将孢子悬液稀释为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL,保存在 4°C 冰箱中不超过 7 d,备用。

1.3.2 抑菌圈的测定

通过测定植物精油和抗生素对供试菌的抑菌圈来分析抗菌敏感性。先将高压灭菌的琼脂培养基(大肠杆菌属用 M-H 琼脂培养基、黄曲霉用孟加拉琼脂培养基、嗜酸乳杆菌用 MRS 琼脂培养基、两歧双歧杆菌用 BBL 琼脂培养基)的温度降至 45°C 左右,在干燥灭菌的直径 9 cm 培养皿内加入 15 mL 培养基,待冷却凝固后,再吸取 100 μL 的菌悬液,并用无菌涂布棒均匀涂布于相对应琼脂平皿,备用。

抗生素组:采用 WHO 推荐的 K-B 琼脂扩散纸片法^[10]。用无菌镊子夹取不同抗生素药敏纸片($d=5\text{ mm}$)贴在含菌平皿上,呈正三角形放置 3 片在琼脂平板中央周围,其中 2 片为抗生素药敏片和 1 片为等大小的已灭菌滤纸做空白对照,每个纸片轻轻压一下以保证与琼脂表面完全接触(放置时切勿拖动);

植物精油组:采用琼脂孔注入法^[11]。用无菌金属打孔器($d=5\text{ mm}$)在含菌平板上等距离地打三个小孔,用无菌镊子剔去孔内琼脂,吸取 10 μL 不同的纯植物精油加入其中两个孔内,并用等量的无菌水加入第三个孔内做空白对照;

将平皿盖上后平置于恒温培养箱中培养(大肠杆菌属 37°C 有氧培养 24 h,乳酸菌属 37°C 厌氧培养 48 h,霉菌 28°C 有氧培养 72 h)。以十字交叉法测量抑菌圈直径,每个处理设 3 次重复,取其平均直径。

1.3.3 最低抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

采用直接接触法。在 5 mL 相应的液体培养基中加入 100 μL 菌悬液,将供试精油用无水乙醇稀释配制成 10%精油溶液,然后分别吸取不同量的 10%精油溶液加入装有等量液体培养基的试管中,使精油浓度为 31.25 $\mu\text{L/L}$ ~3000 $\mu\text{L/L}$,且用无水乙醇做空白对照,置于 196 r/min 恒温振荡器中进行培养,观察生长情况。然后取 0.2 mL 培养液于相应的平板中进行涂布,倒放置于培养箱中培养(大肠杆菌属 37°C 有氧培养 24 h,乳酸菌属 37°C 厌氧培养 48 h,霉菌 28°C 有氧培养 72 h),观察生长情况。若不长菌的最小精油浓度为该精油的最小抑菌浓度(MIC),继续培养 3 d 以上,若仍不长菌的即为最低精油浓度为最小杀菌浓度(MBC)。其中每个处理设 3 次重复,本实验中精油浓度 3000 $\mu\text{L/L}$ 仍不能抑制细菌视为该精油对其没有作用。

1.3.4 复配植物精油联合抑菌效果的测定

根据单一植物精油的抑菌圈和最低抑菌浓度

(MIC)的测定结果,选取对肠道菌抑菌效果明显的植物精油进行联合抑菌实验。植物精油的复配实验采用棋盘稀释法^[12],同时加入等量对应的单一植物精油作为对照。观察培养液倒平板后菌株的生长情况,记录复配精油的最小抑菌浓度(MIC),实验重复 3 次。以分级抑菌浓度指数(FICI)作为联合抗菌试验效果的判定依据^[12],FICI 的计算公式如下所示。

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{A\text{联合时的MIC}}{A\text{单用时的MIC}} + \frac{B\text{联合时的MIC}}{B\text{单用时的MIC}}$$

FIC 指数的判断标准为: $FIC < 0.5$ 时为协同作用(S); $0.5 \leq FIC \leq 1$ 为相加作用(A); $1 < FIC < 4$ 为无关作用(I); $FIC \geq 4$ 时为拮抗作用(AN)。

1.3.5 植物精油有效成分分析

气相色谱仪条件: DB-MS 毛细管色谱柱(30 $\text{m} \times 0.25\text{ mm}$, 0.25 μm),载气为氦气,进样口温度 250°C ,分流比 50:1,流速 1 mL/min,进样量 1 μL 。

(牛至油)升温程序:初始柱温 60°C ,保持 3 min,以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温速率升至 300°C ,保持 5 min。

(肉桂油)升温程序:初始柱温 100°C ,以 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温速率升至 150°C ,保持 3 min,再以 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温速率升至 280°C ,保持 5 min。

质谱仪条件: EI 电离源,电子轰击能量 70 eV,离子源温度 230°C ,四级杆温度为 150°C ,质谱接口温度为 250°C ,扫描范围 m/z 为 25~450 u。

根据总离子流图分离出来的各组分,利用 WILEY275 谱库和 NBS75K 标准质谱库检索,查阅质谱手册并根据相关文献进行化学成分鉴定,采用峰面积归一化法算出植物精油各种组分的相对含量。

1.3.6 数据统计分析

每个实验分别进行三次平行,并且数据以平均值(mean) \pm 标准差(sd)表示,方差分析(ANOVA)是用于两个及以上样本均数差异的显著性检验, $p \leq 0.05$ 时说明具有统计学的意义。

2 结果与讨论

2.1 植物精油抑菌活性的测定

不同活性成分的植物精油和抗生素对肠道微生物的体外抑菌效果测定结果见表 1 和表 2。按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)颁布的《抗微生物药物敏感性试验执行标准》判断对药物的敏感性,抑菌圈试验的判定标准为:抑菌圈直径 $> 20\text{ mm}$ 为最敏感, $10\text{ mm} \sim 20\text{ mm}$ 为中度敏感, $5\text{ mm} \sim 10\text{ mm}$ 为低度敏感,无抑制作用者($\leq 5\text{ mm}$)为不敏感^[13]。

表 1 不同抗生素和植物精油对肠道微生物的体外抑菌效果

Table 1 *In vitro* antimicrobial activity of different antibiotics and essential oils against intestinal microorganisms

名称	含量	抑菌圈直径/mm						
		大肠杆菌	肠出血性 大肠杆菌	致泻性 大肠杆菌	肠产毒性 大肠杆菌	黄曲霉	嗜酸乳杆菌	两歧双歧杆菌
四环素	30 μg/片	16.3±0.6	17.5±0.7	20.5±0.7	24.5±0.7	5.0±0.1	5.0±0.1	25.0±0.7
阿莫西林	20 μg/片	16.7±0.6	11.0±1.4	10.5±0.7	11.5±0.7	5.0±0.1	5.0±0.1	13.5±0.7
多粘菌素 B	300 IU/片	15.0±0.1	10.5±0.7	8.5±0.7	18.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1	22.5±0.7
卡那霉素	30 μg/片	25.7±0.6	25.0±1.4	22.5±0.7	23.5±0.4	5.0±0.1	5.0±0.1	12.5±0.7
恩诺沙星	10 μg/片	31.3±0.6	34.0±0.1	28.0±0.1	34.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1	23.5±0.7
肉桂油	10 μL/孔	27.3±2.1	26.3±4.7	23.0±1.7	35.3±3.0	-	23.0±1.0	-
牛至油	10 μL/孔	30.7±3.1	17.0±1.0	24.3±3.1	33.5±4.4	-	20.3±0.6	36.7±4.2
百里香油	10 μL/孔	32.7±1.2	16.0±1.0	25.7±4.0	-	-	-	25.0±2.6
桉叶油	10 μL/孔	22.7±3.1	10.7±1.5	17.3±1.5	21.3±0.5	10.7±1.5	14.7±1.5	20.7±3.1
茶树油	10 μL/孔	13.0±2.6	10.0±1.0	18.3±2.5	19.5±1.3	7.7±1.0	8.0±1	34.0±2.6
薄荷油	10 μL/孔	11.3±2.3	13.3±1.5	10.0±1.0	10.5±1.3	10.7±2.3	12.7±1.2	22.7±3.1
迷迭香油	10 μL/孔	16.7±1.5	9.7±0.6	11.3±3.6	22.0±1.4	9.7±0.6	8.7±1.5	12.3±1.5
茴香油	10 μL/孔	6.7±1.2	5.0±0.1	5.7±0.6	8.3±0.5	9.0±1.0	6.0±0.1	11.3±2.1
无菌水	10 μL/孔	5.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1	5.0±0.1

注: 实验结果表示为: 抑菌圈直径平均值±标准偏差(3次实验), 孔径直径(5 mm)包含在测量结果中。“-”表示整个平皿均不长菌或仅有空白侧有少量菌落, $p < 0.05$ 。

就抗生素组总体上看, 恩诺沙星对 4 种大肠杆菌和两歧双歧杆菌的抑菌圈直径均 > 20 mm, 属于最敏感; 卡那霉素对各种类大肠杆菌的抑菌圈 > 20 mm, 属于最敏感, 对两歧双歧杆菌是中度敏感; 多粘菌素 B 和四环素对各种类大肠杆菌都为中度敏感, 但对两歧双歧杆菌的抑菌圈直径均 > 20 mm, 属于最敏感; 阿莫西林对各种类大肠杆菌和两歧双歧杆菌抑菌直径均在 10 mm~20 mm 之间, 属于中度敏感。综合比较来看, 若要筛选出具有抑制肠道致病菌生长的同时对肠道益生菌的生长没有显著影响效果的抗生素, 那就是卡那霉素的效果最为明显。

就植物精油组总体上看, 肉桂油、牛至油和百里香油无论是对肠道致病菌还是益生菌, 都表现出较强的抑制作用; 桉叶油对大肠杆菌、肠产毒性大肠杆菌和两歧双歧杆菌的抑菌效果都表现为最敏感, 茶树油对两歧双歧杆菌表现出较强的抑制作用, 抑菌圈直径达到 34.0±2.6 mm, 属于最敏感, 而对黄曲霉和嗜酸乳杆菌仅表现出低度敏感; 薄荷油对两歧双歧杆菌的抑菌圈直径 > 20 mm, 属于最敏感, 对其他 6 种供试菌均为中度敏感, 迷迭香油对肠产毒性大肠杆菌的抑制效果较强, 对大肠杆菌和两歧双歧杆菌的抑菌作用表现为中度敏感, 对其他两种菌的抑制作用不明显; 茴香油只有对两歧双歧杆菌表现出中度敏感, 对其他菌种都是低度敏感。综合来看, 上表中的植物精油要

么对所有的试验菌同时起较强或较弱抑制作用, 要么只对特定菌种上表现出较强的抑菌作用; 没有一种精油对肠道致病菌起较强抑制作用同时, 对肠道益生菌生长没有明显的影响, 这与 Joris 等^[14]研究结果相同。

综合比较来看, 就肠道致病菌的抑制效果而言, 抗生素和植物精油都具有对各种类大肠杆菌肠杆菌较强的抑菌效果, 但植物精油比抗生素多具有对黄曲霉更强的抑菌效果, 表明植物精油具有有效减少误食黄曲霉食品对肠道产生危害的潜能; 抗生素的抑菌圈直径值的标准偏差均比植物精油的小, 结果产生的差异可能是由两者自身的性质决定的, 抗生素是水溶性且不挥发, 而植物精油具有挥发性的同时不是水溶性的, 所以抗生素得出的抑菌圈直径结果比植物精油的较为稳定。

2.2 植物精油最低抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

为了解选用的不同活性成分的植物精油对肠道常见微生物的抗菌效果, 通过直接接触法测定各植物精油的最低抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)研究其抑菌效果。其中最小抑菌浓度(MIC)为减少 90% 微生物菌落的最低精油浓度, 而最小杀菌浓度(MBC)为杀死 99.9% 微生物菌落的最低精油浓度。八种植物

精油对致病菌和益生菌的 MIC 和 MBC 的测定结果分 别见表 2 和表 3 所示。

表 2 植物精油对肠道致病菌的体外最低抑菌浓度和最小杀菌浓度

Table 2 *In vitro* minimal inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations of different essential oils against enteropathogens

精油/($\mu\text{L/L}$)	大肠杆菌		肠出血性大肠杆菌		致泻性大肠杆菌		肠产毒性大肠杆菌		黄曲霉	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
肉桂油	250	250	250	500	500	500	250	500	125	500
牛至油	250	500	500	500	500	700	250	500	250	500
百里香油	500	500	500	700	500	700	250	500	500	700
桉叶油	1500	3000	1500	>3000	1500	2500	1000	3000	1500	>3000
茶树油	2000	>3000	1500	2500	1000	1500	700	1000	2000	>3000
薄荷油	700	>3000	1000	>3000	3000	>3000	700	700	1500	>3000
迷迭香油	3000	>3000	3000	>3000	2000	>3000	2000	3000	>3000	>3000
茴香油	500	>3000	1000	>3000	2500	>3000	500	>3000	250	>3000
无水乙醇	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000

表 3 植物精油对肠道益生菌的体外最低抑菌浓度和最小杀菌浓度

Table 3 *In vitro* minimal inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations of different essential oils against intestinal probiotics

精油/($\mu\text{L/L}$)	嗜酸乳杆菌		两歧双歧杆菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC
肉桂油	500	700	500	700
牛至油	500	1000	500	700
百里香油	500	1000	700	1000
桉叶油	2000	3000	2500	>3000
茶树油	1000	2000	2000	>3000
薄荷油	1500	>3000	2500	2500
迷迭香油	1500	>3000	2000	>3000
茴香油	700	1500	1500	2500
无水乙醇	>3000	>3000	>3000	>3000

由表 2 和 3 可知, 八种植物精油对 7 种供试菌种的生长都有不同程度的抑制作用, 其中抑菌效果较好的是肉桂油、牛至油和百里香油, 对 5 种致病菌的 MIC 值均 $\leq 500 \mu\text{L/L}$, 对 2 种益生菌的 MIC 值均 $\leq 700 \mu\text{L/L}$; 这三种植物精油都表现出了广谱抑菌性, 在对肠道致病菌有较强抑制作用的同时对肠道益生菌也有着较强的抑制作用, 而相对于牛至油和百里香油, 肉桂油对黄曲霉和两歧双歧杆菌的抑菌效果较为明显, 分别为 $125 \mu\text{L/L}$ 和 $500 \mu\text{L/L}$, 其次是牛至油和百里香油; 肉桂油对大肠杆菌和嗜酸乳杆菌的 MBC 值均比牛至油和百里香油的低, 分别为 $250 \mu\text{L/L}$ 和 $700 \mu\text{L/L}$, 但其对黄曲霉和两歧双歧杆菌的 MBC 值与牛至油的一样, 均分别为 $500 \mu\text{L/L}$ 和 $700 \mu\text{L/L}$ 。另外, 桉叶油与茶树油相比, 桉叶油对肠道致病菌的抑制强度比茶

树油强, 但是对肠道益生菌的抑制效果不如茶树油; 薄荷油对 5 种致病菌的抗菌效果比迷迭香油的抗菌效果好些, 特别是对大肠杆菌和肠产毒性大肠埃希氏菌的 MIC 值均为 $700 \mu\text{L/L}$, 但对 2 种益生菌的抑菌效果而言, 两者却没有明显的差异; 茴香油对大肠杆菌和黄曲霉的 MIC 值能与肉桂油、牛至油和百里香油等媲美, 但是其 MBC 值都较高, 与肉桂、牛至和百里香等精油的杀菌效果存在着较大的差距。

植物精油的 MIC 值和 MBC 值越低, 其抑菌效果就越强。八种植物精油对肠道致病菌抗菌能力大小依次为: 肉桂>牛至>百里香>茴香>薄荷>桉叶、茶树>迷迭香; 对肠道益生菌抗菌能力大小依次为: 肉桂、牛至>百里香>茴香>茶树>迷迭香>薄荷>桉叶。

2.3 植物精油联合抑菌效果的测定

根据抑菌圈直径以及 MIC 值的测定结果, 采用棋盘稀释法对肠道致病菌抑菌效果显著的植物精油 (肉桂油、牛至油和百里香油) 进行联合抑菌活性研究, 并以 FICI 值进行效果评价。植物精油联合抑菌效果见表 4 所示。

由表 4 可知, 从整体来看, 肉桂油-牛至油复配组合的效果更好, 对 5 种肠道致病菌都具有相加作用, FICI 值均 ≤ 1 , 而对肠道益生菌的相加作用不如对致病菌的强; 肉桂油-百里香油复配组合对产肠毒素大肠杆菌显示出了协同作用, FICI 值为 0.5, 对肠出血性大肠杆菌为无关作用, 对大肠杆菌、致泻性大肠杆菌、黄曲霉和嗜酸乳杆菌都表现出相加作用, FICI 值均 ≤ 1 ; 牛至油-百里香油复配组合除了对大肠杆菌和两歧双歧杆菌的杀菌率达不到 99.9%外, 对其余供试菌表现出相加作用 (FICI 值均 ≤ 1)。

表4 复配植物精油对供试菌种的FIC指数(FICI)

Table 4 FIC indices (FICI) of essential oil combinations against the tested microorganisms

供试菌种	相关指数	肉桂-牛至		肉桂-百里香		牛至-百里香	
		肉桂油	牛至油	肉桂油	百里香油	牛至油	百里香油
大肠杆菌	MIC _{单独}	250	250	250	500	-	-
	MIC _{联合}	125	31.25	125	250	-	-
	FIC	0.5	0.125	0.5	0.5	-	-
	FICI	0.625(A)		1(A)		-	-
肠出血性大肠杆菌	MIC _{单独}	250	500	250	500	500	500
	MIC _{联合}	125	125	250	250	250	62.5
	FIC	0.5	0.25	1	0.5	0.5	0.125
	FICI	0.75(A)		1.5(I)		0.625(A)	
致泻性大肠杆菌	MIC _{单独}	500	500	500	500	500	500
	MIC _{联合}	250	62.5	250	62.5	250	62.5
	FIC	0.5	0.125	0.5	0.125	0.5	0.125
	FICI	0.625(A)		0.625(A)		0.625(A)	
肠产毒性大肠杆菌	MIC _{单独}	250	250	250	250	250	250
	MIC _{联合}	31.25	125	62.5	62.5	125	31.25
	FIC	0.125	0.5	0.25	0.25	0.5	0.125
	FICI	0.625(A)		0.5(S)		0.625(A)	
黄曲霉	MIC _{单独}	125	250	125	500	250	500
	MIC _{联合}	62.5	31.25	62.5	62.5	125	125
	FIC	0.5	0.125	0.5	0.125	0.5	0.25
	FICI	0.625(A)		0.625(A)		0.75(A)	
嗜酸乳杆菌	MIC _{单独}	500	500	500	500	500	500
	MIC _{联合}	250	250	250	250	250	250
	FIC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	FICI	1(A)		1(A)		1(A)	
两歧双歧杆菌	MIC _{单独}	500	500	-	-	-	-
	MIC _{联合}	250	250	-	-	-	-
	FIC	0.5	0.5	-	-	-	-
	FICI	1(A)		-	-	-	-

注: S代表协同作用(S, FICI≤0.5), A代表相加作用(A, 0.5<FICI≤1), I代表无关作用(I, 1<FICI<2), AN代表拮抗作用(AN, FICI>2), “-”表示该组合的所有试验均有菌生长或杀菌率达不到99.9%。

表5 肉桂化学成分分析

Table 5 Analysis of the chemical components of cinnamon oil

峰号	保留时间	化合物	分子式	分子量	相对含量/%
1	1.581	丙酮	C ₃ H ₆ O	58	0.53
2	1.854	正己醛	C ₆ H ₁₂ O	100	0.03
3	2.008	2-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	98	0.04
4	2.111	苯乙烯	C ₈ H ₈	104	0.36
5	2.201	α-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.21
6	2.247	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.78
7	2.336	蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.31

转下页

接上页					
8	2.457	苯甲酸香叶酯	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	258	1.92
9	2.600	α -水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.01
10	2.661	α -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.28
11	2.720	对伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	134	2.00
12	2.833	桉叶油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.06
13	2.949	γ -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.69
14	3.051	3-羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	122	0.37
15	3.248	苯乙酮	C ₈ H ₈ O	120	0.06
16	3.359	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.83
17	3.803	β -苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	122	0.26
18	3.868	邻甲基苯乙酮	C ₉ H ₁₀ O	134	0.32
19	4.039	2-甲基苯并呋喃	C ₉ H ₈ O	132	0.28
20	4.252	苯丙醛	C ₉ H ₁₀ O	134	1.69
21	4.599	α -松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.18
22	5.167	反式肉桂醛	C ₉ H ₈ O	132	0.34
23	5.305	2-异丙基-5-甲基茴香醚	C ₁₁ H ₁₆ O	164	0.16
24	5.634	水杨醛甲醚	C ₈ H ₈ O ₂	136	0.39
25	7.010	肉桂醛	C ₉ H ₈ O	132	52.17
26	7.772	α -蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.11
27	8.407	邻甲氧基苯丙酮	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	1.00
28	8.717	α -柏木烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.14
29	8.892	β -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.85
30	9.122	α -香柠檬烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.15
31	9.356	香橙烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.05
32	9.642	(E)- β -金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.11
33	9.980	乙酸桂酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176	0.96
34	10.341	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	146	2.83
35	10.917	异丁香烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.15
36	11.205	γ -杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.26
37	11.397	δ -杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.52
38	11.800	α -红没药烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.28
39	12.659	邻甲氧基肉桂醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162	15.18
40	13.299	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.89
41	13.533	肉豆蔻醛	C ₁₄ H ₂₈ O	212	0.30
总计					91.05

2.4 肉桂精油和牛至精油抗菌成分分析

2.4.1 肉桂精油的 GC/MS 分析

用气相色谱-质谱联用仪对肉桂精油进行分析,得到总离子流图共显示 47 个峰,如图 1,利用标准质谱库检索,结合查阅质谱手册并根据相关文献核对鉴定,针对主要色谱峰加以确认,共鉴定出 41 种化合物,其含量占色谱总流出峰相对百分含量的 91.05%,见表 5。

由气质联用分析结果(见表 5)可知,从肉桂精油中共分离鉴定出 41 种挥发性化合物,在已鉴定出的化合物中,含量最高的是肉桂醛,相对含量为 52.17%。肉桂具有抗菌功效与其含有较高含量的肉桂醛有关^[10],除了肉桂醛(52.17%)外,相对含量较高的成分还有邻甲氧基肉桂醛(15.18%)、香豆素(2.83%)、对伞花烃(2.00%)、苯甲酸香叶酯(1.92%)、 γ -松油烯(1.69%)、苯丙醛(1.69%)、异丁香烯(1.15%)、 α -蒎烯(1.11%),

共占总化学成分含量的 79.74%。

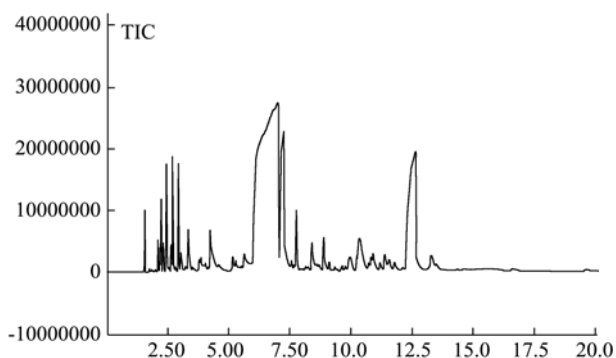


图1 肉桂油化学成分的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of chemical components of cinnamon oil

2.4.2 牛至精油的 GC/MS 分析

牛至精油挥发性成分的 GC-MS 总离子流图见图

2, 共分离出 30 个峰, 经质谱库检索与标准谱图共同

对照分析得到鉴定的有 25 个, 占色谱总流出峰相对百分含量的 98.05%, 各化合物相对含量按峰面积归一化法计算, 见表 6 所示。

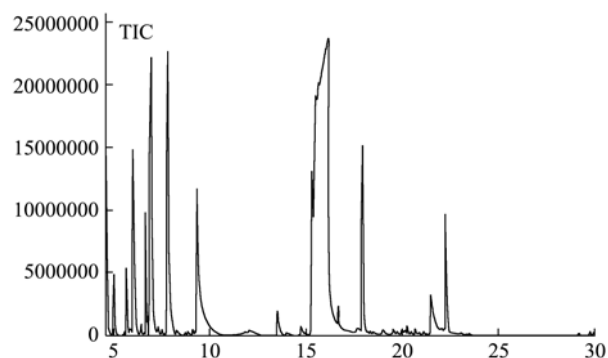


图2 牛至油化学成分的总离子流图

Fig.2 Total ion chromatogram of chemical components of oregano oil

表6 牛至油化学成分分析

Table 6 Analysis of the chemical components of oregano oil

峰号	保留时间/min	化合物	分子式	分子量	相对含量/%
1	1.515	丙酮	C ₃ H ₆ O	58	0.56
2	4.489	α -侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.38
3	4.600	α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	3.97
4	5.014	蒹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.08
5	5.570	环己烷	C ₁₀ H ₂₀	140	0.03
6	5.663	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.01
7	5.817	α -月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.20
8	6.004	β -月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136	3.95
9	6.422	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.19
10	6.639	异松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.93
11	6.785	2-十四烯	C ₁₄ H ₂₆	194	0.17
12	6.963	间-异丙基苯	C ₁₀ H ₁₄	134	8.50
13	7.330	桉叶油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.20
14	7.512	邻-异丙基苯	C ₁₀ H ₁₄	134	0.06
15	7.822	γ -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	7.66
16	9.083	葑酮	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.10
17	9.327	β -松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	6.26
18	13.526	百里酚甲醚	C ₁₁ H ₁₆ O	164	0.58
19	14.751	2-甲酸基苯氧乙酸	C ₉ H ₈ O ₄	180	0.13
20	15.311	百里香酚	C ₁₀ H ₁₄ O	150	1.89
21	16.181	香芹酚	C ₁₀ H ₁₄ O	150	51.73
22	16.694	α -萜橙烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.19
23	17.914	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	3.81
24	20.274	1-甲基-4-(1-亚甲基-5-甲基-4-己烯基)环己烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.09
25	22.282	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.38
总计					98.05

从表 6 可以看出,从牛至精油中共分离鉴定出 25 种挥发性化合物,包括 2 种酚(53.62%)、14 种烯(28.01%)、2 种炔(8.56%)、2 种醇(6.46%)、2 种酮(0.66%)、1 种醚(0.58%)和 1 种酸(0.13%)。其中相对含量较高的化学成分有香芹酚(51.73%)、间-异丙基苯(8.50%)、 γ -松油烯(7.66%)、 β -松油醇(6.26%)、 α -蒎烯(3.97%)、 β -月桂烯(3.95%)、石竹烯(3.81%)、氧化石竹烯(2.38%)、异松油烯(1.93%)以及麝香草酚(1.89%),共占总化学成分含量的 92.08%。

由表 5 和表 6 可见,不同植物源的挥发油根据其活性成分的不同,会表现出不同的抑菌活性,肉桂油和牛至油的主要化学成分分别为醛类和酚类化合物。大量研究表明,肉桂醛和香芹酚是醛类和酚类挥发油中抑菌作用最强的活性成分^[16]。经 GC-MS 分析鉴定的肉桂油主要成分是肉桂醛(52.17%),牛至油主要成分是香芹酚(51.73%)。根据目前已有报道可知,肉桂醛抑菌杀菌的作用机理可能主要是醛基是一个亲水基团,易被细菌或真菌表面的亲水基吸附而穿入细胞壁,从而破坏细菌或真菌的细胞壁多糖结构发挥其抑菌杀菌的效果;香芹酚可以通过挤压开磷脂的脂肪酸链,增加细胞膜流动性和通透性,从而让细胞质中的离子流出细胞外致细胞死亡^[9,17]。两者作用机制的不同是其表现出不同抗菌活性的原因。当肉桂油和牛至油进行复配时,具有相加效应,多种成分共存时可提高各成分单独使用的效果,这可能是两种或两种以上的成分相互协同作用的结果^[18],这需进一步微观的实验验证。

3 结论

植物挥发油对 7 种肠道微生物均有一定程度的抑菌作用,其综合抑杀菌能力最好的是醛类的肉桂油和酚类的牛至油,其次为酚类的百里香油。最值得一提的是,虽然这三种植物精油对所有供试菌具有较强的抑制作用,但是整体来看其对肠道致病菌的抑制作用强于对肠道益生菌的抑制作用;而桉叶油、茶树油、薄荷油、迷迭香油、茴香油表现出的抗菌活性并不明显,这与抑菌圈直径测定的结果相吻合。当将抑菌效果最好的肉桂油、牛至油和百里香油进行复配时,整体抑菌效果最好的是肉桂-牛至复配组合,其对肠道致病菌的抑制作用全表现出相加作用(FICI \leq 0.75),而对肠道益生菌的生长却没有影响(FICI=1),为开发新型绿色、安全、高效的抗生素替代品提供理论依据。

参考文献

[1] OTTER J A. Superbug: the fatal menace of MRSA [J].

Lancet Infect Dis., 2010, 10(8): 519-520

- [2] 吕媛,李耘,郑波.国内外细菌耐药监测研究介绍[J].中国临床药理学杂志,2011,27(4):311-317
LV Yuan, LI Yun, ZHENG Bo. Introduction to international and internal antimicrobial resistance surveillance [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2011, 27(4): 311-317
- [3] 胡燕,白继庚,胡先明,等.我国抗生素滥用现状、原因及对策探讨[J].中国社会医学杂志,2013,30(2):128-130
HU Yan, BAI Ji-geng, HU Xian-ming, et al. The present situation, causes and countermeasures of the abuse of antibiotics in China [J]. Chinese Journal of Social Medicineril, 2013, 30(2): 128-130
- [4] Devasahayam G, Scheld W M, Hoffman P S. Newer antibacterial drugs for a new century [J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2010, 19(2): 215-234
- [5] 陈建烟,李永裕,吴少华,等.植物精油生物活性作用机理研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24(9):1312-1318
CHEN Jian-yan, LI Yong-yu, WU Shao-hua, et al. Advances in mechanism of biological activities of plant essential oils [J]. Nat. Prod. Res. Dev., 2012, 24(9): 1312-1318
- [6] 韩飞,李瑾,潘悄悄,等.新型天然植物抗生素牛至油的研究进展[J].中国新药杂志,2015,24(3):303-308
HAN Fei, LI Jin, PAN Qiao-qiao, et al. Research progress in a new natural plant antibiotics-oregano oil [J]. China Journal of New Drugs, 2015, 24(3): 303-308
- [7] 唐经凡.抗生素的作用机理及应用[J].中国现代药物应用,2008,2(7):99-100
TANG Jing-fan. Mechanism and application of antibiotics [J]. Chin. J. Mod. Drug Appl., 2008, 2(7): 99-100
- [8] 李文茹,施庆珊,莫翠云,等.几种典型植物精油的化学成分与其抗菌活性[J].微生物学通报,2013,40(11):2128-2137
LI Wen-ru, SHI Qing-shan, MO Cui-yun, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of several typical essential oils [J]. Microbiol. China, 2013, 40(11): 2128-2137
- [9] 张赞彬,刘笑宇,姜萍萍,等.肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J].现代食品科技,2015, 31(5): 31-35
ZHANG Yun-bin, LIU Xiao-yu, JIANG Ping-ping, et al. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 31-35
- [10] 崔晓霞,王秀敏,侯晓礁,等.13 种抗生素类药物对大肠杆菌的体外抑菌试验[J].吉林畜牧兽医,2008,29(7):9-11
CUI Xiao-xia, WANG Xiu-min, HOU Xiao-jiao, et al.

- Bacteriostasis test of *E.coli* on 13 antimicrobial drugs *in vitro* [J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008, 29(7): 9-11
- [11] 王洁,王冬梅,齐富刚,等.丁香叶提取物对猪源性大肠杆菌的抑菌作用研究[J].饲料工业,2015,36(14):11-13
WANG Jie, WANG Dong-mei, QI Fu-gang, et al. Bacteriostasis of folium syringae extract on pig pathogenic *E.coli* [J]. Feed Industry, 2015, 36(14): 11-13
- [12] LU Fei, DING Yi-cheng, YE Xing-qian, et al. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(9): 1482-1487
- [13] Rota M C, Herrera A, Martinez R M, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils [J]. Food Control, 2008, 19: 681-687
- [14] Joris M. Effect of essential oils on gut bacteria and functionality in pig [D]. East Flanders Belgium provinces: University College Ghent, 2009
- [15] XING Fu-hua, HUA Hui-juan, Selvaraj J N, et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde [J]. Food Control, 2014, 46: 343-350
- [16] Macheboeuf D, Morgavi D P, Papon Y, et al. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population [J]. Anim. Feed Sci. Technol., 2008, 145(1-4): 335-350
- [17] Ultee A, Kets E P W, Alberda M, et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol [J]. Archives of Microbiology, 2000, 174(4): 233-238
- [18] Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Activite antibacterienne du thymol, du carvacrol, et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associes [J]. Pharmazie, 1993, 48(4): 301-304
- [19] 周德庆.微生物学实验教程(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2011
ZHOU De-qing. Microbiology experiment (third edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2011