

· 基础研究 ·

## 香樟精油对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及 抑菌机理研究<sup>△</sup>

杨英铎<sup>1</sup>, 陆大洪<sup>2</sup>, 杨冬梅<sup>2</sup>, 袁小晶<sup>2</sup>, 秦海燕<sup>2\*</sup>

(1. 绵阳外国语学校 高三七班, 四川 绵阳 621000; 2. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

**[摘要]** **目的:** 探讨香樟精油对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其抑菌机理。**方法:** 采用抑菌圈实验和试管二倍稀释法对香樟精油的抑菌活性、最低抑菌浓度(MIC)进行测定; 通过测定菌液中还原糖含量、蛋白质含量以及电导率的变化, 研究香樟精油对金黄色葡萄球菌的抑菌机理。**结果:** 香樟精油对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为12.5%; 香樟精油能影响金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性, 香樟精油作用4 h时, 香樟精油组菌液中还原糖含量比对照组分别增加了25.48%、31.02%、31.25% ( $P < 0.05$ ), 菌液中蛋白质含量比对照组分别增加了26.86%、31.43%、31.23% ( $P < 0.05$ )。**结论:** 金黄色葡萄球菌对香樟精油中度敏感, 其抑菌机制可能在于破坏细菌细胞膜结构, 引起内含物渗漏, 导致菌体缺乏营养物质而死亡。

**[关键词]** 香樟精油; 抑菌活性; 抑菌机理; 抑菌圈直径

### Antibacterial Activity and Mechanism of Essential Oil from *Cinamomum camphora* on *Staphylococcus aureus*

YANG Yingduo<sup>1</sup>, LU Dahong<sup>2</sup>, YANG Dongmei<sup>2</sup>, YUAN Xiaojing<sup>2</sup>, QIN Haiyan<sup>2\*</sup>

(1. Class Seven, Senior Grade Three, Mianyang Foreign Languages School, Mianyang 621010, China;

2. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antibacterial activity and mechanism of the essential oil from *Cinamomum camphora* on *Staphylococcus aureus*. **Methods:** The inhibition zone experiment and tube double dilution method were used to determine the essential oil's antimicrobial activity and the minimum inhibitory concentration (MIC). The antibacterial mechanism experiments were carried out by determining changes of reducing sugar content, protein content and electric conductivity. **Results:** The MIC to *S. aureus* was 12.5%. The essential oil could affect the membrane permeability of *S. aureus*. After treated with the essential oil for 4 hours, the reducing sugar content of the experimental groups was increased by 25.48%, 31.02%, 31.25% ( $P < 0.05$ ) than that of the control group, respectively, and the total content of proteins increased by 26.86%, 31.43%, 31.23% ( $P < 0.05$ ), respectively. The difference was significant. **Conclusion:** The essential oil showed obvious antibacterial activity against *S. aureus*. The antimicrobial mechanism is inferred that bacterial cell structure is damaged, cell membrane permeability increased.

**[Keywords]** Essential oil; antimicrobial activities; antibacterial mechanism; inhibition zone diameters.

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.3.013

香樟 *Cinamomum camphora* (Linn.) Presl. 系樟科樟属常绿乔木, 是我国亚热带绿阔叶林的主要树种之一, 也是常用的芳香绿化树种, 资源十分丰富。樟树性味辛温无毒, 其根、皮、叶、果实均作为药用, 具有散寒止痛、温中健脾、补火助阳等功效, 可用于治疗各种痛症、脾胃虚寒、肾阳虚衰、瘀血

内阻等<sup>[1-2]</sup>。樟树的根、茎、叶和果实均含精油, 其精油具有抗菌、抗炎、抗癌、止痛、驱虫、终止妊娠的作用<sup>[3]</sup>, 樟油也是工业和医药上生产樟脑、龙脑的主要原料。我国的樟树精油开发利用历史悠久, 使樟树精油在我国天然精油中占据了举足轻重的地位。近年, 关于樟树精油的提取、成分分析及抑菌

<sup>△</sup> [基金项目] 四川省教育厅基金项目(14zd1126); 西南科技大学大学生创新基金(CX16-069)

\* [通信作者] 秦海燕, 讲师, 研究方向: 药用植物活性资源开发; Tel: (0816)6089532, E-mail: qinhaiyan03@163.com

效果有较多的研究报道<sup>[4-7]</sup>,但对于樟树精油抑菌机理研究却不多见。本文在测定香樟精油抑菌活性的基础上,以金黄色葡萄球菌为供试菌,通过研究精油对金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性、蛋白质含量、还原糖含量的影响,揭示香樟精油的抑菌作用机制,为充分挖掘我国丰富的挥发油类中药及促进樟树精油最大程度的利用提供理论依据。

## 1 材料

供试菌种金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC26112,中国医学菌种保藏中心);香樟精油(江西金海天然香料油科技公司,药用级,批号:JH20150147),经西南科技大学袁小红教授鉴定为天然香樟精油;营养琼脂、营养肉汤、丙酮、葡萄糖、3,5-二硝基水杨酸等购自成都科龙化学试剂公司。

## 2 方法

### 2.1 精油稀释液的制备

精确称取一定量香樟精油置于烧杯中,加入蒸馏水与聚山梨酯-80,搅拌,使精油均匀分散于水中,再加入蒸馏水定容至100 mL后,得香樟精油质量浓度为 $180 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、聚山梨酯-80体积分数为 $10 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的香樟精油溶液,装入棕色瓶作为母液,稀释配制一系列质量浓度的香樟精油溶液。

### 2.2 菌悬液的制备

将供试菌种在斜面培养基上活化2代后,用接种环从斜面上轻刮菌苔一环,收集到内盛10 mL无菌水的三角瓶中,配成终浓度为 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液,备用。

### 2.3 香樟精油的抑菌活性测定

以丙酮作为稀释剂,取0.5 mL精油,加入0.5 mL丙酮配置成体积分数为50%的溶液,震荡摇匀,丙酮二倍稀释法配制一系列体积分数的精油溶液。待培养皿中培养基凝固后,在无菌条件下,取0.2 mL菌悬液涂布到培养皿上。将直径6 mm的无菌滤纸片在香樟精油中浸泡2 h,沥干,平铺在培养皿上,每平板铺3片,空白对照组无菌滤纸片在丙酮中浸泡2 h。于37 °C恒温箱内培养24 h后观察,并测定抑菌圈的直径。平行实验3次。抑菌圈实验判定标准:滤纸片直径为6 mm时,抑菌圈直径大于20 mm,极敏;15~20 mm,高敏;10~15 mm,中

敏;7~9 mm,低敏;小于7 mm,不敏感<sup>[8]</sup>。

### 2.4 最小抑菌浓度(MIC)的测定<sup>[9]</sup>

将2.3项下所得的不同体积分数的香樟精油溶液各1 mL加入15 mL融化的固体培养基中混合均匀,待培养基凝固后,即得含不同体积分数的香樟精油供试样品的平板。在平板上画线接种菌液,37 °C培养1 d。观察菌体生长情况,生长菌体为阳性(+),不生长菌体为阴性(-),以不生长菌的试验样品的最低浓度为香樟精油最低抑菌浓度(MIC),以1 mL丙酮加入15 mL融化的固体培养基作为空白对照,重复2次。

### 2.5 菌液电导率的测定

经过电导率预实验,量取含聚山梨酯-80的质量浓度为30、60、90  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 香樟精油,加入培养至对数期的金黄色葡萄球菌菌液中,震荡培养,按钱丽红等<sup>[10]</sup>的方法每隔30 min取菌液,离心,得到上清液,用数字电导率仪测定其电导率值。以不加精油只加同等体积蒸馏水和助溶剂聚山梨酯-80作为对照组(聚山梨酯-80在对照组中的终体积分数为 $0.05 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。平行实验3次,取平均值。

### 2.6 菌液中还原糖的测定

根据王林嵩<sup>[11]</sup>的方法,取生长到对数期的金黄色葡萄球菌液22.5 mL分别与25 mL质量浓度为30、60、90的香樟精油混合,振荡培养,分别在0、1、2、3、4、5 h时取5 mL混合液,离心( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,6 min),取上清液2 mL,50 °C恒温水浴中保温20 min,移取1 mL样品溶液、1 mL蒸馏水和1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸,摇匀,在520 nm波长下测吸光度,以标准葡萄糖溶液作标准曲线;以无菌水及聚山梨酯-80作为空白对照(聚山梨酯-80在对照组中的终体积分数为 $0.05 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。平行实验3次。

### 2.7 菌液蛋白质的测定

根据王林嵩<sup>[11]</sup>的研究方法,取生长到对数期的金黄色葡萄球菌22.5 mL分别与25 mL质量浓度为30、60、90  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的香樟挥发油混合摇匀,37 °C振荡培养,分别在0、1、2、3、4、5 h时移取3 mL样品,1200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心5 min,分别取上清液0.1 mL,加入5.0 mL考马斯亮蓝G-250配制的蛋白质试剂,充分振荡混合,2 min后于595 nm处测定吸光值,以0.1 mL蒸馏水加5.0 mL蛋白质试剂

为空白对照。以牛血清白蛋白作为标准蛋白，绘制标准曲线。以同等体积的无菌水及聚山梨酯-80作为空白对照组(聚山梨酯-80在对照组中的终体积分数为 $0.05 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。平行实验3次。

## 2.8 数据处理

实验结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，采用单因素方差分析检验其统计学意义。

## 3 结果与分析

### 3.1 香樟精油对金黄色葡萄球菌抑菌活性测定结果

香樟精油对金黄色葡萄球菌抑菌活性测定结果见表1、2和图1、2，不同体积分数香樟精油对金黄色葡萄球菌抑菌活性不同。纯精油对金黄色葡萄球菌的抑菌圈最大，为 $(12.6 \pm 1.23)$  mm，在10~15 mm，属中敏。精油抑菌圈直径随体积分数的增大而增强。最小抑菌浓度MIC值是测定抗菌物质抗菌活性大小的指标。当体积分数降到12.5%时，平板中没有检出菌落，6.25%时平板中检出少量菌落，当香樟精油的体积分数大于12.5%时，可完全抑制金黄色葡萄球菌的生长，故其对金黄色葡萄球菌的MIC为12.5%。

表1 不同体积分数香樟精油的抑菌圈直径( $n=9$ )

香樟精油体积分数(%)	抑菌圈直径/mm
100	$12.6 \pm 1.23$
50	$10.8 \pm 1.57$
25	$9.5 \pm 1.13$
12.5	$7.2 \pm 1.39$
6.25	
空白对照	

表2 香樟精油对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度(MIC)的测定结果

香樟精油体积分数(%)	菌落生长情况
50	-
25	-
12.5	-
6.25	+
3.125	++
1.56	+++
空白对照	+++

注：-表示培养基未出现菌落，+表示培养基有菌落生长。

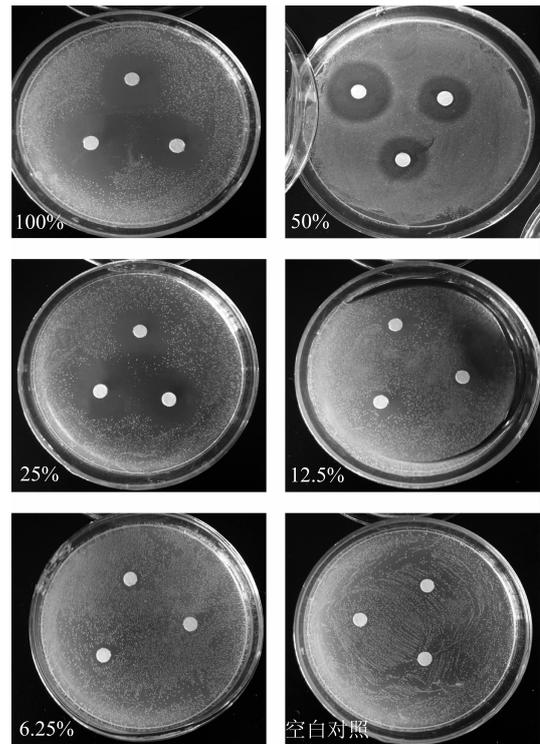


图1 不同体积分数香樟精油的抑菌圈活性

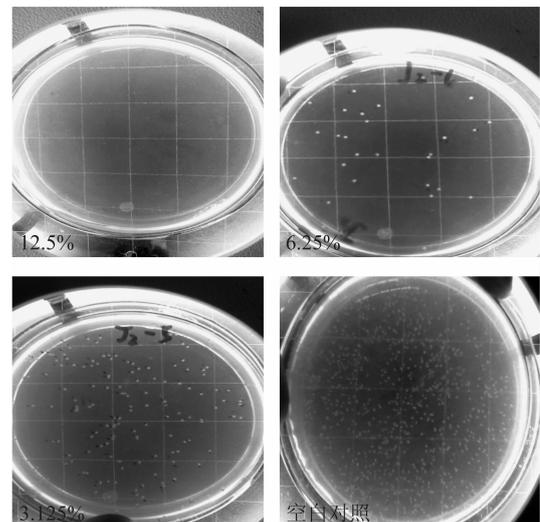
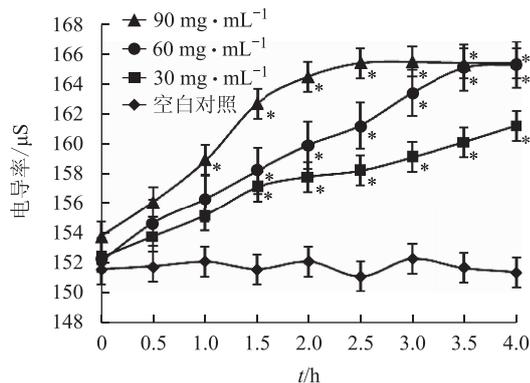


图2 不同体积分数香樟精油金黄色葡萄球菌菌落生长情况

### 3.2 香樟精油对金黄色葡萄球菌菌悬液电导率的影响

细胞膜是细菌的一个屏障，既可以阻挡外源物质的进入，也可以防止内部物质的流出。当细胞膜受到损坏，胞内物质就会释放出来，小分子如钾离子、钠离子、磷酸根离子等电解质外泄至培养液中，使培养液的电导率上升，因此，菌液电导率的变化反映了细菌细胞膜通透性的变化<sup>[12]</sup>。图3显示了经不同质量浓度香樟精油处理不同时间后，对金黄色

葡萄球菌菌液电导率的测定结果。由图3可知,在不同处理时间下菌液电导率均高于对照,对照组菌液电导率随处理时间的延长变化量不大;精油处理组随着作用时间的增加,菌液电导率显著上升,且与抑菌成分的质量浓度呈正相关,即质量浓度越高,电导率值越大。随着精油与细菌作用时间的增加,菌液电导率明显增加。与对照组相比,当作用4 h时,香樟精油组培养液电导率显著增加( $P < 0.05$ ),但各组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。说明精油对金黄色葡萄球菌细胞膜逐渐产生破坏作用,使小分子的离子( $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 等)从细菌细胞中大量渗出,致使菌液电导率逐渐上升,从而达到抑菌的目的。



注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;下同。

图3 香樟精油作用金黄色葡萄球菌后培养液电导率的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.3 香樟精油对细菌培养液还原糖的影响

糖类是微生物首要的碳源和能源储备物质。当细菌处于正常生理状态时,会吸收利用外源的营养成分,而当膜结构遭到破坏时,细胞内容物包括糖类发生外泄,通过测定细菌培养液中糖质量浓度的变化,可以了解细菌膜结构的完整性<sup>[10]</sup>。

由图4可以看出,香樟精油处理过的金黄色葡萄球菌胞外环境中糖质量浓度不断升高,这是胞内的糖类物质渗漏到胞外,而使得培养基中糖质量浓度增加,对照组金黄色葡萄球菌胞外环境中糖质量浓度不断降低,这是由于随着细菌的生长繁殖,培养基中的糖类物质不断地被吸收利用而减少。当香樟精油作用4 h时,与对照组相比,30、60、90 mg·mL<sup>-1</sup>香樟精油组菌液还原糖含量分别增加了25.48%、31.02%、31.25% ( $P < 0.05$ ),达到了统计学差异水平,60、90 mg·mL<sup>-1</sup>组间差异不具有统计学意义。这也说明了香樟精油不仅可以影响细菌对还原糖的

吸收利用,还促使菌体内的糖泄露,使菌体失去能源物质,从而发挥其抑菌作用。

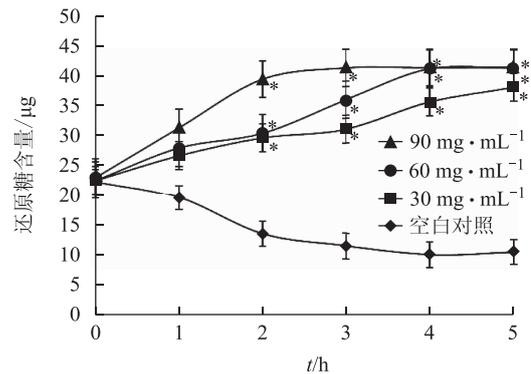


图4 不同质量浓度香樟精油对菌液还原糖含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.4 香樟精油对细菌培养液中蛋白质含量的影响

不同质量浓度香樟精油对菌液蛋白质含量的影响见图5,随培养时间的增加,对照组细菌处于对数生长期,消耗的蛋白质量增加,所以菌液中蛋白质的含量下降;经香樟精油作用后的菌液中的蛋白质含量较对照组显著增高,表明菌液中的金黄色葡萄球菌可能被抗菌成分损伤,菌体中的可溶性蛋白渗出,且超过了被菌体消耗掉的那部分蛋白质,使菌液中的蛋白质含量升高;且随香樟精油浓度的增加,菌液中的蛋白质含量也相应升高,表明精油浓度与金黄色葡萄球菌菌体蛋白质的渗透呈正相关;培养4 h后,与对照组相比,30、60、90 mg·mL<sup>-1</sup>香樟精油组菌液蛋白质含量分别增加了26.86%、31.43%、31.23% ( $P < 0.05$ ),达到了统计学差异水平,60、90 mg·mL<sup>-1</sup>组间差异不具有统计学意义。可见,添加香樟精油的培养菌液中其蛋白质质量浓度远高于对照组,证明了香樟精油可改变细菌细胞膜的通透性,致使细胞内的蛋白质渗漏到体外的培养液中。

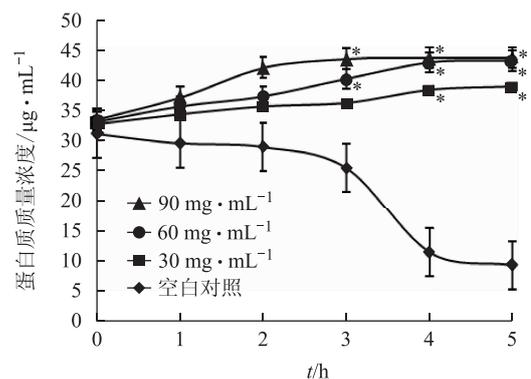


图5 不同质量浓度香樟精油对菌液蛋白质含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

#### 4 讨论

香樟精油抑菌活性实验结果与马英姿等<sup>[6]</sup>、李爱民等<sup>[7]</sup>的研究一致,表明樟树精油对金黄色葡萄球菌都具有较好的抑菌效果。本研究结果显示,香樟精油具有明显的抑菌活性,其最低抑菌浓度为12.5%。

药物对细菌的抑菌作用机制,主要是通过破坏细胞壁及细胞膜的完整性、抑制三羧酸循环途径、抑制蛋白和核酸的合成等方面来实现的<sup>[13]</sup>。香樟精油主要成分为樟脑、 $\beta$ -芳樟醇、桉油醇、 $\alpha$ -松油醇、蛇床-6-烯-4-醇<sup>[5]</sup>,其中,芳樟醇具有抗细菌、抗真菌和抗病毒作用<sup>[14]</sup>,是樟树叶精油中的主要抗菌成分。香樟精油能够使菌液中电导率值、还原糖含量以及蛋白质含量发生明显的变化,但发生明显变化的突变点各不相同。其中对电导率最大的影响在1.5 h左右,还原糖含量的影响从2 h后开始,蛋白质含量的影响从3 h开始,且糖和蛋白质的变化率明显高于电导率变化率,说明对应于这些变化的内部原因并不是同时发生的,而是有其时间先后性的,即先从细胞中缓慢渗透出小分子物质使细胞代谢受到影响;随着作用时间增加,细胞膜表面的糖链及膜上镶嵌的蛋白质脱离细胞游离到菌液中;随着细胞膜结构被破坏,致使菌体受损进一步增加,蛋白质和糖大量泄露出胞体。蛋白质外泄对菌体细胞中的生理机能产生重要影响,糖大量外泄使菌体失去能源物质,使生物体的生长和繁殖受阻,甚至死亡。因而推断香樟精油破坏了细胞膜的完整性,使胞内无机盐离子、蛋白质、糖外漏,细胞膜是其抑菌作用靶点之一。

我国樟树资源非常丰富,但至今为止多只把它作为一种园林绿化树种来发展,对其精油抗菌活性及其机理的研究加深了樟树作为芳香类药材开发利用的广度和深度,为提高樟树综合经济效益提供

参考。

致谢:西南科技大学生命科学与工程学院免疫实验室及分析测试中心提供便捷的实验条件。

#### 参考文献

- [1] 陈寿仁. 樟科药用植物药理研究及开发[J]. 中国中医药信息杂志,1996,3(2):13-15.
- [2] 周汉芬,韦一良,胡健华,等. 樟树籽仁油醇解工艺研究[J]. 中国油脂,2005,30(8):53-56.
- [3] 郭丹,曾解放,范国荣,等. 樟树精油的化学成分及生物活性研究进展[J]. 生物质化学工程,2015,49(1):53-57.
- [4] 孙凌峰,周传军,彭春耕. 樟树枝叶精油的提取和分析研究[J]. 江西师范大学学报(自然科学版),1995,19(4):347-354.
- [5] 刘亚,李茂昌,张永聪,等. 香樟树叶挥发油的化学成分研究[J]. 分析试验室,2008,27(1):88-92.
- [6] 马英姿,谭琴,李恒熠,等. 樟树叶及天竺桂叶的精油抑菌活性研究[J]. 中南林业科技大学学报,2009,29(1):36-40.
- [7] 李爱民,唐永勤,卿玉波. 樟油的提取及其抑菌性研究[J]. 福建林业科技,2006,33(4):121-123.
- [8] 李悦,侯滨滨,静宝元. 葡萄柚精油抑菌活性的研究[J]. 食品研究与开发,2010,31(11):237-239.
- [9] 吴均,杨钦滢,赵晓娟,等. 山苍子油的抑菌活性及机理研究[J]. 食品工业科技,2013,34(17):119-125.
- [10] 钱丽红,陶妍,谢晶. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报,2010,37(11):1628-1633.
- [11] 王林嵩. 生物化学实验技术[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [12] M T 马迪根, J M 马丁克. 微生物生物学[M]. 李明春,杨文博,主译. 11版. 北京:科学出版社,2009.
- [13] 云宝仪,周磊,谢鲲鹏,等. 黄芩素抑菌活性及其机制的初步研究[J]. 药学学报,2012,47(12):1587-1592.
- [14] 陈尚铎,赵玲华,徐小军. 天然芳樟醇资源及其开发利用[J]. 林业科技开发,2013,27(2):13-15.

(收稿日期 2016-12-18)