

不同溶剂超声提取桉叶提取物的抑菌活性研究

田英 孙大伟

武汉华夏理工学院生物与制药工程学院 湖北 武汉 430000

【摘要】：以桉叶为原料采用超声波提取法，以水和乙醇为溶剂制备提取物；以三种病原微生物为指示菌评价抑菌活性。结果表明：乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌抑菌效果优于水提取物（ $P<0.05$ ），对大肠杆菌二者无显著差异。乙醇提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌活性最强，且显著高于白色念珠菌（ $P<0.05$ ）。说明桉叶乙醇提取物对革兰氏阳性菌和阴性菌抑制作用突出，具有开发潜力的天然抑菌材料。

【关键词】：桉叶；超声提取；抑菌活性

DOI:10.12417/2705-098X.26.10.010

桉树为桃金娘科桉属植物，原产澳大利亚、菲律宾及印度尼西亚等太平洋周边国家，19世纪末引入我国^[1]。我国桉树人工林主要分布于广西、广东、福建等地^[2]，品种众多，包含尾叶桉、赤桉、蓝桉等^[3]。桉树易受病原微生物侵染，叶部病害在全球范围内发生普遍^[4]。当前研究多集中于栽培管理与病虫害防治，对桉叶活性成分、功能及应用研究较少，资源利用不充分。

研究表明，桉叶富含1,8-桉叶素、黄酮类、单宁酸、柠檬烯、 α -蒎烯、蓝桉醇等多种天然抑菌成分^[5]。桉叶挥发油具有抑菌、抗虫、祛痰等功效^[6]，其中1,8-桉叶素可通过破坏致病菌细胞膜、抑制酶活性、干扰菌体代谢发挥抗菌作用，已在医疗领域作为抗菌抗炎辅助制剂应用^[7-9]。

目前桉叶活性成分提取方法主要有溶剂提取、微波提取、超临界流体萃取和超声波提取。溶剂提取法操作简单，但需要控制温度以保持成分稳定^[10]；微波提取法高效省时，但容易造成热敏性成分分解氧化；超临界流体萃取条件温和，但成本较高^[3]。超声波提取法快速高效、提取温度低，可较好保护活性成分，优势明显但应用较少^[11]。本研究采用超声波提取法，以蒸馏水和乙醇为溶剂提取桉叶活性成分，研究其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的抑菌活性，为桉叶活性成分的进一步分离纯化及生产应用提供实验依据与技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

(1) 材料与试剂。桉叶：亳州市众草亭药业有限公司，产自河北；蛋白胨：北京奥博生物技术有限公司；牛肉浸粉、琼脂粉、酵母粉、胰蛋白胨：白鲨生物科技有限公司；可溶性淀粉：国药集团化学试剂有限公司；琼脂：海博生物；山梨酸钾：麦克林；无水乙醇：国药沪试有限公司；生理盐水：湖南科伦制药有限公司。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌

均为武汉华夏理工学院实验室现有保藏菌种。

(2) 仪器与设备。多频恒温超声波提取机：上海比朗仪器制造有限公司；立式压力蒸汽灭菌器：合肥华泰医疗设备有限公司；多功能粉碎机：永康市小宝电器有限公司；恒温培养箱、全温空气摇床：上海福玛实验设备有限公司；生物安全柜：济南鑫贝西生物；恒温水浴锅：常州国华电器有限公司。

1.2 实验分组与方法

(1) 实验分组：实验分为空白对照组、阳性对照组和实验组。空白对照组采用蒸馏水，阳性对照组采用1%山梨酸钾溶液；实验组分别为桉叶水提取物组与桉叶乙醇提取物组。各组分别作用于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌，每组设置3次平行重复。

(2) 桉叶提取物的制备：桉叶经粉碎机粉碎后，采用电子天平准确称取6g，加入60mL蒸馏水，浸泡20min。将混合液置于多频恒温超声波提取机中，设置超声时间7s、间隔3s、提取温度50℃，提取30min。提取液经滤纸过滤后，收集滤液于4℃条件下保存备用。桉叶乙醇提取物制备方法同上，仅将提取溶剂更换为乙醇。

(3) 菌种培养与菌悬液制备：①菌种培养与活化：大肠杆菌接种于LB固体培养基（胰蛋白胨2g、酵母提取物1g、氯化钠2g、琼脂4g，定容至200mL，加100 μ L氢氧化钠），金黄色葡萄球菌接种于营养琼脂培养基（蛋白胨2g、牛肉膏0.6g、氯化钠1g、琼脂4g，定容至200mL，pH7.2-7.4），白色念珠菌接种于沙保氏培养基（蛋白胨2g、葡萄糖8g、琼脂4g，定容至200mL）。上述所有培养基均经121℃高压蒸汽灭菌30min后使用。使用接种环蘸取斜面菌种，在对应平板上进行Z字形划线活化培养，大肠杆菌与金黄色葡萄球菌于35 \pm 1℃培养24h，白色念珠菌于28 \pm 0.5℃培养48h，至平板长出单菌落。②菌悬液制备：培养好的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠

菌的培养皿口及接种环均过火灭菌，分别挑取1~2个单菌落置于生理盐水中，制备成菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL。再分别吸取上述菌液100 μ L加入900 μ L生理盐水中，充分混匀，制备成浓度为 1×10^7 CFU/mL的菌悬液备用。

(4) 牛津杯法抑菌实验：大肠杆菌、金黄色葡萄球菌采用 Mueller-Hinton 培养基（称取 8.4 g 定容至 200 mL），白色念珠菌采用沙保氏培养基进行抑菌实验。取 100 μ L 菌悬液加入培养基用涂布棒涂布，使菌体均匀分布。用镊子将 4 个牛津杯（7.8 \times 6 \times 10 mm）置于培养基上，分别加入 150 μ L 桉叶水提取物、桉叶乙醇提取物、1%山梨酸钾（阳性对照）和蒸馏水（阴性对照）。大肠杆菌与金黄色葡萄球菌于 35 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 h，白色念珠菌于 28 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 48 h，观察并测定抑菌圈直径。

(5) 数据统计分析：本实验三种菌群实验数据结果均由三个独立的实验得出，实验结果均使用 GraphPad Prism 10 进行统计分析。实验结果显著差异由 P 值表示：*表示 P<0.05、**表示 P<0.01、***表示 P<0.001、****表示 P<0.0001。

2 结果与分析

2.1 比较桉叶提取物对不同菌群的抑菌效果

桉叶提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌圈汇总（表 1）。

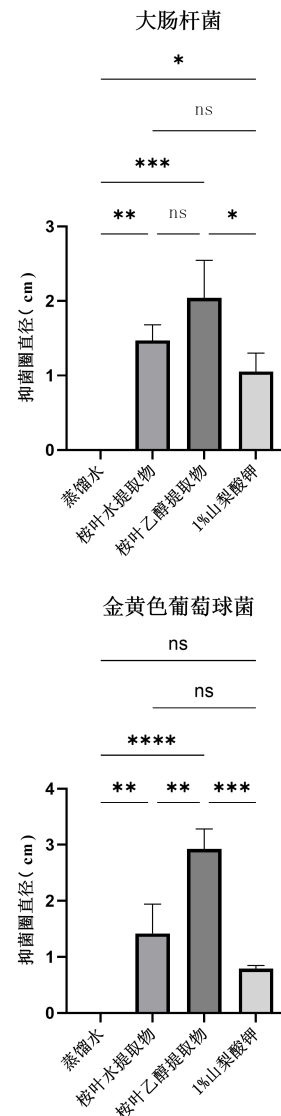
表 1 桉叶提取物抑菌圈直径汇总表

	蒸馏水	桉叶水提取物	桉叶乙醇提取物	1%山梨酸钾
大肠杆菌(一)	0	1.71cm	2.14cm	0.85cm
大肠杆菌(二)	0	1.31cm	1.49cm	0.98cm
大肠杆菌(三)	0	1.39cm	2.49cm	1.33cm
金黄色葡萄球菌(一)	0	2.02cm	2.61cm	0.85cm
金黄色葡萄球菌(二)	0	1.05cm	3.31cm	0.79cm
金黄色葡萄球菌(三)	0	1.18cm	2.86cm	0.74cm
白色念珠菌(一)	0	0	0.73cm	1.33cm
白色念珠菌(二)	0	0	0.75cm	1.65cm

白色念珠菌(三) 0 0 0.75cm 1.89cm

2.2 桉叶提取物抑菌效果统计分析

基于抑菌圈直径数据，采用 GraphPad Prism 软件对桉叶不同提取物、阳性对照及阴性对照的抑菌效果进行统计学分析，结果如下（图 1）：针对大肠杆菌，桉叶水提取物抑菌效果显著高于阴性对照（P<0.01）；桉叶乙醇提取物的抑菌圈直径大于桉叶水提取物，但差异无统计学意义；桉叶乙醇提取物抑菌效果显著优于阳性对照（P<0.05），而桉叶水提取物与阳性对照差异无统计学意义。针对金黄色葡萄球菌，桉叶水提取物抑菌效果显著高于阴性对照（P<0.01）；桉叶乙醇提取物抑菌效果显著优于水提取物（P<0.01）和阳性对照（P<0.001）；水提取物与阳性对照差异无统计学意义。针对白色念珠菌，桉叶水提取物与阴性对照均无抑菌圈，二者差异无统计学意义；阳性对照抑菌效果显著优于水提取物（P<0.0001）；桉叶乙醇提取物抑菌效果显著优于水提取物和阳性对照（P<0.001）。



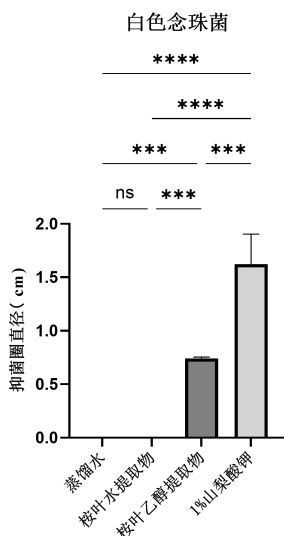


图1 桉叶乙醇提取物对不同菌群的抑菌效果分析

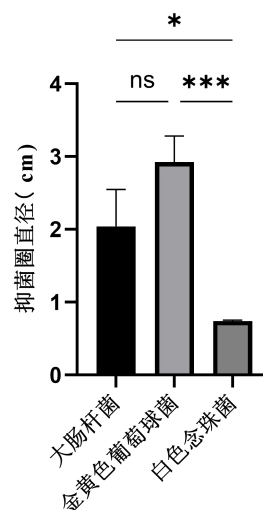


图2 桉叶乙醇提取物对不同菌群的抑菌效果分析

2.3 比较桉叶乙醇提取物对不同菌群的抑菌效果分析

综合上述结果可知,桉叶乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌均有明显抑菌作用,且效果优于桉叶水提取物,对白色念珠菌的抑菌效果显著高于阳性对照山梨酸钾,因此对其抑菌效果进一步开展统计分析。结果表明(图2),桉叶乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大于大肠杆菌,差异无统计学意义;其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果显著高于白色念珠菌($P < 0.001$),对大肠杆菌的抑菌效果显著高于白色念珠菌($P < 0.05$)。

3 结论

本实验采用多频恒温超声波提取法,以蒸馏水和乙醇为不同溶剂对桉叶进行提取;在此基础上,采用牛津杯法探究两种提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的抑菌作用。结果显示,桉叶水提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显抑菌效果,对白色念珠菌无显著抑菌作用;桉叶乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及白色念珠菌均具有抑菌作用,且对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最优。与水提取物相比,桉叶乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌效果更显著,差异具有统计学意义,对大肠杆菌的抑菌效果则无显著差异;阳性对照山梨酸钾对白色念珠菌的抑菌效果高于对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。综上,桉叶乙醇提取物具备良好的抑菌活性,在抑菌相关应用领域具有潜在的开发利用价值。

参考文献:

- [1] 谢耀坚.科技创新引领中国桉树研究和产业迅猛发展[J].桉树科技,2022,39(01):35-42.
- [2] XIE Y J,ARNOLD R J,WU Z H,et al.Advances in eucalypt research in China[J].Frontiers of Agricultural Science and Engineering,2017,4(4):380-390.
- [3] 田玉红.广西桉叶挥发性成分分析及抗菌抗氧化性能研究[D].广西大学,2006.
- [4] CROUS P W,WINGFIELD M J,CHEEWANGKOON R,et al.Foliar pathogens of eucalypts[J].Studies in Mycology,2019,94:125-298.
- [5] 陶奕,殷梦,张皓冰.桉叶提取物抗菌作用及主要挥发性成分的年度变化[J].中成药,2015,37(05):1050-1055.
- [6] 汤韶明,周莉华,侯雄军,等.不同品种桉叶制备的桉叶止咳糖浆的药效学实验比较[J].江西医药,2012,47(11):958-961.
- [7] 王-明.1,8-桉叶油素对大肠杆菌 O101 的抗菌和抗群体感应活性及其作用机制研究[D].四川农业大学,2023.
- [8] 任潞,杨心仪,李适廷,等.1,8-桉叶油素对三种牙周致病菌的抑菌作用研究[J].临床口腔医学杂志,2023,39(03):131-134.
- [9] 董雪瑞,董国通,王聪,等.中药提取物的抑菌作用研究[J].工业微生物,2023,53(02):40-42.
- [10] 姜萍,刘鑫,萧伟,等.巨尾桉叶中原花色素提取工艺比较及不同溶剂萃取物生物活性的研究[J].生物质化学工程,2015,49(4):19-24
- [11] 李萃邦,徐胜臻,徐文兴,等.桉树叶活性成分提取方法及生物活性研究进展[J].湖北农业科学,2018,57(06):12-16+25.