

doi:10.11937/bfyy.20171040

## 蕲艾挥发油体外抑菌作用及其机理

杨文婷<sup>1</sup>, 黄士栩<sup>1</sup>, 翁德会<sup>2</sup>, 吴士筠<sup>1</sup>

(1. 武汉工商学院 环境与生物工程学院, 湖北 武汉 430065; 2. 武汉华夏理工学院 生物与制药学院, 湖北 武汉 430223)

**摘要:**以湖北蕲春地区道地药材蕲艾为试材,通过水蒸气蒸馏法提取了其挥发油成分,利用抑菌圈法和常量稀释法考察了蕲艾挥发油的抑菌效果,并对其抑菌机理进行了初步研究,以期为蕲艾的药用资源化研究提供参考依据。结果表明:蕲艾挥发油对不同微生物的抑菌效果为金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>黑曲霉>青霉,金黄色葡萄球菌抑菌圈直径达1.5 cm,对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。不同时间菌体内外蛋白质和核酸含量的变化结果表明,蕲艾挥发油可增加细菌细胞膜的通透性,并对细菌核酸合成有一定抑制作用。

**关键词:**蕲艾;挥发油;抑菌活性;抑菌机理

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0022-07

艾叶为菊科植物艾(*Artemisia argyi* Lévl. et Vant.)的干燥叶,以湖北蕲州地区产者最为著

**第一作者简介:**杨文婷(1983-),女,硕士,副教授,现主要从事天然产物的开发利用等研究工作。E-mail:47389578@qq.com.

**责任作者:**吴士筠(1950-),女,本科,高级实验师,研究方向为天然产物的开发利用。E-mail:779642941@qq.com.

**基金项目:**湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B2017394);武汉工商学院校级学术团队基金资助项目(XSTD2015003)。

**收稿日期:**2017-07-18

名,故称蕲艾。蕲艾是蕲春“四宝”之一,作为中国国家地理标志产品,被誉为道地药材<sup>[1]</sup>,具有镇痛、抗炎、抗氧化等药理作用,其挥发油、总黄酮含量、药理药效等均明显优于其他地区所产艾叶<sup>[2]</sup>。目前对蕲艾的研究多集中在化学成分分析、道地性研究、药理作用研究等方面,在蕲艾抑菌方面的药理作用尚鲜见报道。湖北蕲春地区蕲艾资源丰富,若将其抑菌相关性能研究充分,可进一步开发蕲艾相关抑菌产品,为蕲艾资源的深度利用提供一定基础<sup>[3-4]</sup>。

WP had a little toxicity with  $\text{EC}_{50}$  value of  $60.5119 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The field experiment results showed that 43% tebuconazole SC and 50% prochloraz manganese WP had good control efficiency of 80.64% and 78.16%. But treatments of 43% tebuconazole SC, 50% prochloraz manganese WP, 10% difenoconazole WG, 40% carbendazim thiram bromothalonil WP and azoxystrobin SC of  $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  were fairly between each other, no significant difference. Treatment of 20% pyrimethanil WP had minimum control effect. According to indoor toxicity tests and field trails, 43% tebuconazole SC, 50% prochloraz manganese WP, 10% difenoconazole WG, 40% carbendazim thiram bromothalonil WP and azoxystrobin SC of  $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  could be used to control *Chiehqua Colletotrichum* in turn in practical production.

**Keywords:** Chiehqua *Colletotrichum*; isolation and identification; phylogenetic analysis; indoor toxicity; field control effect

该研究通过水蒸气蒸馏法提取蕪艾挥发油,采用抑菌圈法检测蕪艾挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、青霉的抑菌性能,并选择抑菌效果最明显的菌种进行最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)的测定<sup>[5]</sup>,并测定了蕪艾挥发油处理后菌体的核酸和蛋白质含量变化情况,以期探索蕪艾挥发油的抑菌机理提供参考依据<sup>[6]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试蕪艾由蕪春荆楚蕪艾制品有限公司提供;大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、青霉均由武汉工商学院环境与生物实验教学中心提供;牛肉膏、蛋白胨、琼脂、蛋白酶 K;无水乙醇、75%乙醇、二甲基亚砷(DMSO)、十二烷基硫酸钠(SDS)、NaNO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、蔗糖、苯酚、氯仿、异戊醇,以上试剂均为分析纯。

挥发油提取器;YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;SPX-100B-D 型振荡培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;K5500 型超微量紫外-可见分光光度计,北京凯奥科技发展有限公司;TG16-WS 型台式高速离心机,长沙湘麓离心机仪器有限

公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 蕪艾挥发油的提取

称取一定量的蕪艾,剪碎,置于 500 mL 的圆底烧瓶中,以 1:5 左右的比例加入蒸馏水,室温浸泡 2 h 后采用水蒸气蒸馏法提取 8 h,即得蕪艾挥发油,4 ℃保存备用<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.2 菌种的复苏与活化

将试验所需菌种在新鲜培养基上接种进行活化<sup>[8]</sup>,细菌 37 ℃倒置培养 24 h,霉菌 27 ℃倒置培养 24 h,然后将细菌接种至液体培养基中进行摇床培养 20 h,霉菌培养出孢子后制成孢子悬液,即分别得到菌种母液。

#### 1.2.3 蕪艾挥发油抑菌活性的测定

采用抑菌圈法。将牛肉膏蛋白胨培养基和查氏培养基融化后分别倒入培养皿中,静置至凝固,划线分区备用。吸取菌种母液和稀释 10 倍后的溶液各 10 μL,均匀涂布,5 min 后将直径为 5 mm 的小滤纸片平铺在琼脂板上,用移液枪分别吸取 7 种不同的受试物(表 1)各 5 μL,滴在小滤纸片中央,细菌 37 ℃倒置培养 24 h、霉菌 27 ℃倒置培养 24 h 后,观察记录菌落生长情况,并测量抑菌圈直径<sup>[9-10]</sup>。

表 1

受试物

Table 1

List of subjects

序号 Number	受试物 Subject	作用 Usage
1	无菌水	阳性对照
2	75%乙醇	阴性对照
3	无水乙醇	排除影响因素
4	蕪艾挥发油	抑菌试验
5	DMSO	排除影响因素
6	蕪艾挥发油: DMSO(1:1)	抑菌试验
7	蕪艾挥发油: 乙醇(1:1)	抑菌试验

#### 1.2.4 蕪艾挥发油 MIC 的测定

将蕪艾挥发油与 DMSO 均匀混合,梯度稀释,分别配制成浓度为 0、0.8、1.6、8.0、16.0、40.0、80.0、160.0 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液。在超净工作台上,将融化后的牛肉膏蛋白胨培养基倒入培养皿中,静置至凝固备用。吸取菌种母液 50 μL,均匀涂布,待菌液被培养基吸收后,分别吸取 10 μL 不同浓度的蕪艾挥发油溶液,均匀涂布,细菌 37 ℃

倒置培养 24 h,观察记录未见菌落生长的最小浓度。

#### 1.2.5 蕪艾挥发油的抑菌机理研究

对细菌细胞膜通透性的影响:吸取金黄色葡萄球菌母液 500 μL 于 1.5 mL 离心管中,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃去上清液,加入 300 μL 0.9% NaCl 洗涤 1 次;再于 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃去上清液,收集

菌体,加入 500  $\mu\text{L}$  0.9% NaCl 溶液制成菌悬液,加入 100  $\mu\text{L}$  8.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  蕓艾挥发油的 DMSO 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  培养,分别在 20、40 min 和 6、20 h 后,5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min,所得上清液分别在 260 nm 和 280 nm 测定吸光度值<sup>[11-12]</sup>。对细菌 DNA 含量的影响:配制浓度为 0、4、8、16、40  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的蕓艾挥发油的 DMSO 溶液,分别加入到 1 mL 菌悬液中,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 18 h 后,收集菌液。取 500  $\mu\text{L}$  菌液,加入 5  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K (10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 50  $\mu\text{L}$  10% SDS,55  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 后,等体积加入酚/氯仿/异戊醇溶液混匀,10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min,取上清液;加入等体积氯仿/异戊醇溶液混匀,10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min,取上清液;加入 0.1 倍体积的 3  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸钠(pH 5.2)和 2 倍体积预冷的无水乙醇,−20  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min,离心弃去上清液,沉淀用 75%乙醇洗涤,干燥,沉淀溶于 100  $\mu\text{L}$  超纯水中,

于 260 nm 处测定其吸光度值<sup>[13-15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 蕓艾挥发油的抑菌效果

由表 2 可知,金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径明显比其它 3 种微生物的抑菌圈直径大一些,而且在稀释一定倍数后,对金黄色葡萄球菌仍然具有明显的抑菌效果(图 1、2),而大肠杆菌则不太明显(图 3、4)。由图 5、6 可知,蕓艾挥发油对黑曲霉和青霉的生长初期是有一定的抑菌效果,但是由于霉菌生长周期较长,在后期的生长过程中,孢子的繁殖和散播使菌丝生长蔓延至滤纸片上,因而无法判断其抑菌效果。因此,该试验采用抑菌作用最明显的金黄色葡萄球菌作为研究对象,并进一步对其最小抑菌浓度(MIC)和抑菌机理进行研究。

表 2

蕓艾挥发油的抑菌效果比较

Table 2

Comparison of antibacterial activity of *Artemisia argyi* essential oil

cm

序号 Number	受试物 Subject	供试菌 Test organism			
		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	青霉 <i>Penicillium notatum</i>
1	无菌水	0	0	0	0
2	75%乙醇	0.7	0.6	0.6	0.5
3	无水乙醇	1.3	1.1	0.7	0.6
4	蕓艾挥发油	1.5	1.0	0.9	0.9
5	DMSO	0.8	0.6	0.5	0.5
6	蕓艾挥发油 : DMSO(1 : 1)	1.2	0.8	0.9	0.8
7	蕓艾挥发油 : 无水乙醇(1 : 1)	1.0	0.7	0.7	0.9

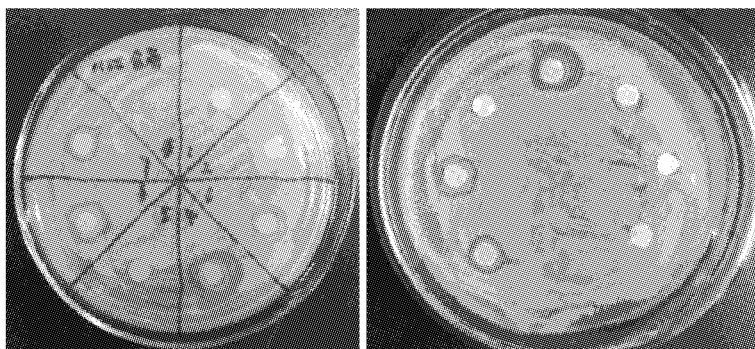


图 1 蕓艾挥发油对金黄色葡萄球菌母液的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* against *Staphylococcus aureus* liquor

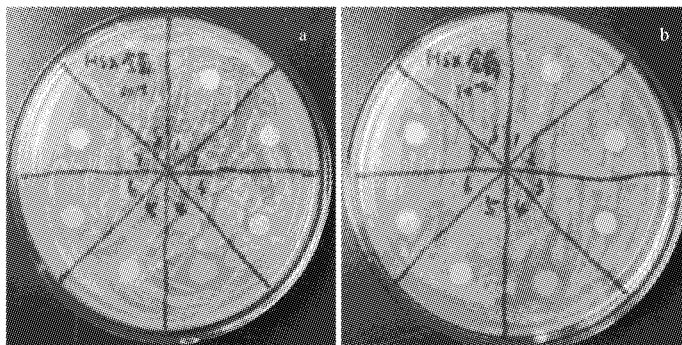


图 2 蕲艾挥发油对 10 倍稀释(a)和 100 倍稀释(b)金黄色葡萄球菌母液的抑菌效果

Fig. 2 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* on mother liquor of *Staphylococcus aureus* 10 times(a) and 100 times(b)

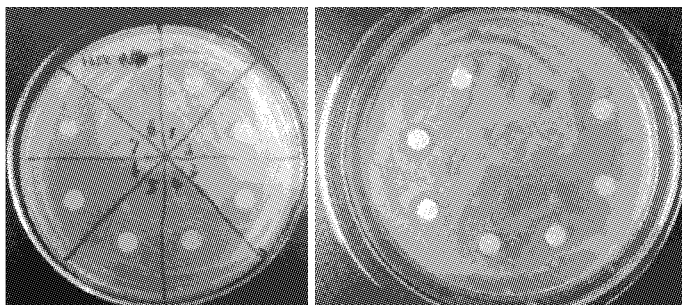


图 3 蕲艾挥发油对大肠杆菌母液的抑菌效果

Fig. 3 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* against *Escherichia coli* liquor

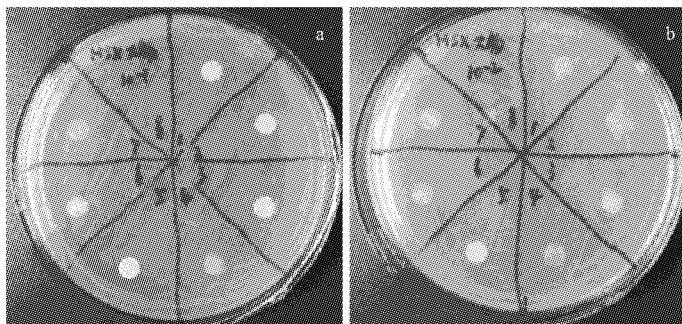


图 4 蕲艾挥发油对 10 倍稀释(a)和 100 倍稀释(b)大肠杆菌母液的抑菌效果

Fig. 4 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* against *Escherichia coli* diluted 10 times(a) and 100 times(b)

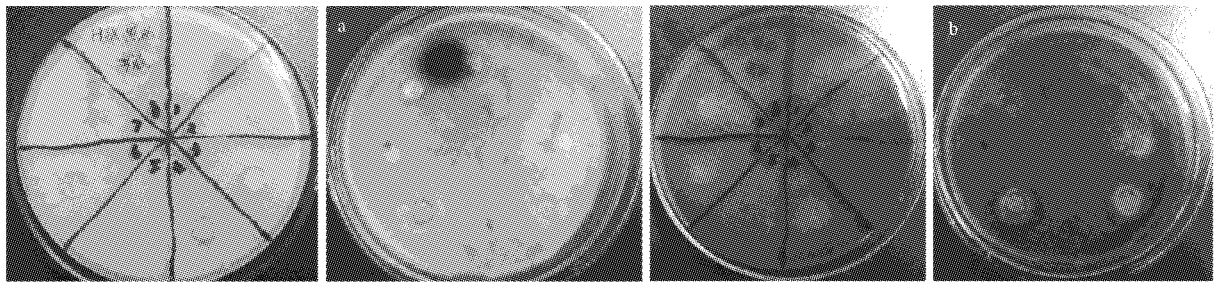
## 2.2 蕲艾挥发油 MIC 的测定

由 2.1 的结果可知,蕲艾挥发油对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最明显,故选其作为试验菌种,进行 MIC 的测定。由图 7 可知,蕲艾挥发油在 0、0.8、1.6  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度下,金黄色葡萄球菌均有明显的生长,但呈现下降趋势;而当蕲艾挥发

油浓度达到  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  之后,未见菌苔生长,说明蕲艾挥发油对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2.1 蕲艾挥发油对细菌细胞膜通透性的影响

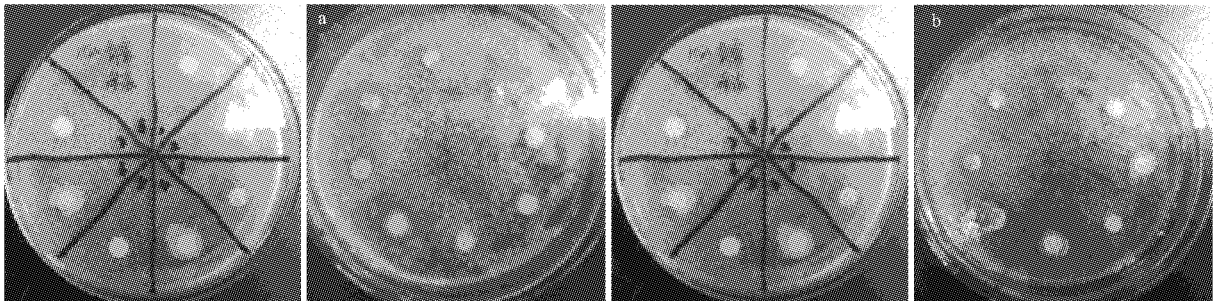
细胞膜相当于是细胞对外界的一种保护,在阻止外源性物质进入细胞的同时也阻止内源性物



注:a. 生长 1 d 的黑曲霉菌;b. 生长 5 d 的黑曲霉菌。  
Note:a. *Aspergillus niger* grown for 1 day;b. *Aspergillus niger* grown for 5 days.

图 5 蕲艾挥发油对黑曲霉的抑菌效果

Fig. 5 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* on *Aspergillus niger*



注:a. 生长 1 d 的青霉菌;b. 生长 5 d 的青霉菌。  
Note:a. *Penicillium* grown for 1 day;b. *Penicillium* grown for 5 days.

图 6 蕲艾挥发油对青霉的抑菌效果

Fig. 6 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* against *Penicillium*

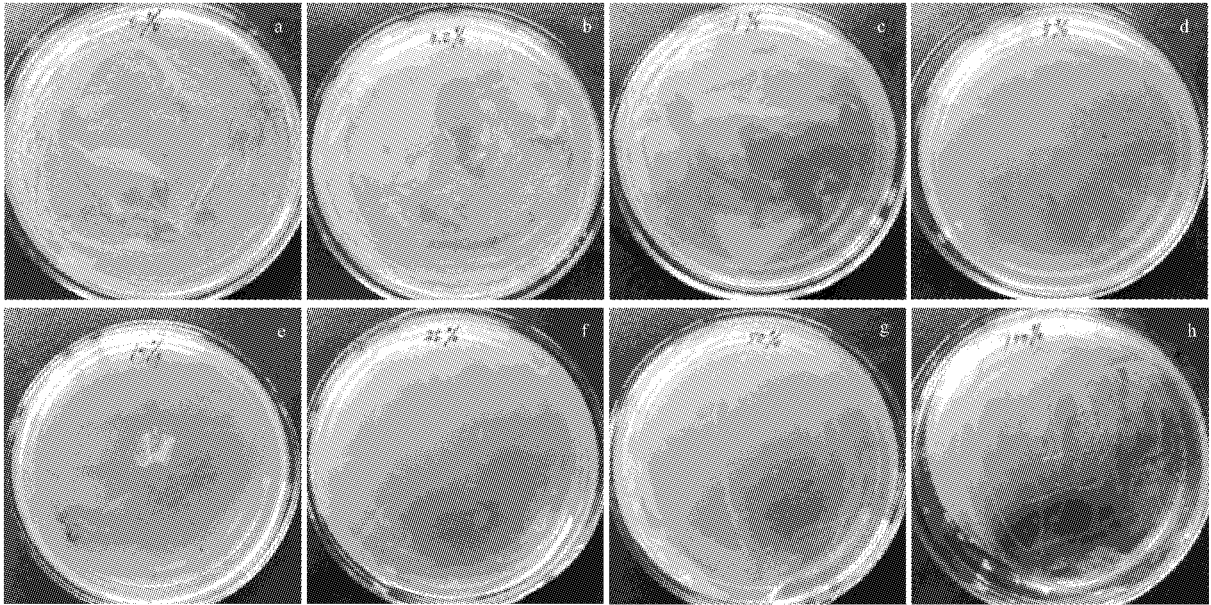
质流出。但是,当细胞膜破损后,胞内物质就会被释放出来,小分子如某些离子,大分子则如蛋白质或核酸(DNA 和 RNA),而蛋白质在 280 nm 处有最大吸收,核酸在 260 nm 处有最大吸收,因此通过在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值,可初步判断细菌细胞膜的完整与否。

由表 3 可以看出,在细菌与蕲艾挥发油作用

20 min 后,就已经能够检测出核酸和蛋白质的存在,故说明蕲艾挥发油改变了金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性,使胞内物质释放出来。而随着时间的增加,核酸含量逐渐降低,推测可能是随着作用时间的增加,细菌核酸自行降解,或者蕲艾挥发油对金黄色葡萄球菌 DNA 的合成有抑制作用,需进一步研究证实。

表 3 金黄色葡萄球菌的核酸和蛋白质浓度  
Table 3 Nucleic acid and protein concentration of *Staphylococcus aureus*

作用时间 Actuation duration	核酸浓度 Nucleic acid concentration/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	蛋白质浓度 Protein concentration/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
20 min	187. 61	2. 60
40 min	249. 74	2. 99
6 h	256. 69	3. 04
20 h	287. 30	3. 13



注:a. 0; b.  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; c.  $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; d.  $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; e.  $16.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; f.  $40.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; g.  $80.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; h.  $160.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

图 7 不同浓度藜艾挥发油的抑菌效果

Fig. 7 Antibacterial effect of essential oil of *Artemisia argyi* under different concentration

2. 2. 2 藜艾挥发油对细菌 DNA 含量的影响

由图 8 可知,在藜艾挥发油浓度低于  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,细菌 DNA 含量呈上升趋势,表明在作用时间相同的条件下,藜艾挥发油浓度越高,菌体释放出来的核酸量也越多,故此浓度下的藜艾挥发油对细菌的破坏性最大,大量核酸被释放到上清中,同时进一步证明了此浓度为金黄色葡萄球菌的 MIC。但是在藜艾挥发油浓度超过  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  后,细菌的 DNA 含量开始明显

减少,且随着浓度的增加,含量减少更加明显,说明藜艾挥发油作用后,金黄色葡萄球菌的 DNA 合成受到明显抑制。因此初步推测藜艾挥发油可能是通过抑制了金黄色葡萄球菌 DNA 的合成,从而发挥体外抑菌作用。

3 结论与讨论

该研究对水蒸气蒸馏法提取的藜艾挥发油的抑菌效果及抑菌机制进行了初步研究,藜艾挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉、青霉均有一定抑菌效果,且对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最为明显, MIC 为  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,表明其有较强的抑菌性能,为其药理用途的进一步开发应用提供了一定参考。通过细菌培养后蛋白质和核酸泄漏情况和 DNA 含量变化情况分析,发现藜艾挥发油能改变细菌细胞壁和细胞膜的通透性,并对金黄色葡萄球菌 DNA 的合成有一定抑制作用,但具体作用于细菌的哪个酶或蛋白质靶点,有待通过分子水平的试验进一步深入研究。

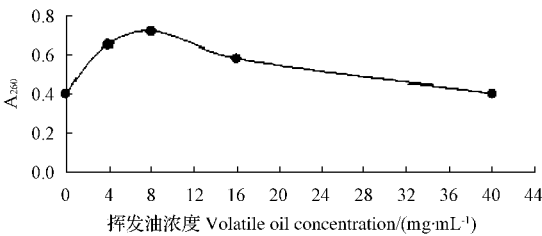


图 8 不同浓度藜艾挥发油对细菌 DNA 含量的影响

Fig. 8 Effect of different concentrations of volatile oil on the content of bacteria DNA

## 参考文献

- [1] 洪宗国. 蕲艾的道地性研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2015(2): 33-37.
- [2] 郭胜男. 蕲艾挥发性成分的质量评价及其抗氧化活性研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [3] 刘巍, 刘萍, 刘薇芝, 等. 蕲艾的研究概况[J]. 中国药师, 2011, 14(10): 1531-1533.
- [4] 许俊洁, 卢金清, 郭胜男, 等. 不同部位与不同采收期蕲艾精油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015(21): 51-57.
- [5] 阮健, 陈彤. 板蓝根类制剂抑菌生物效价测定方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2016(2): 261-266.
- [6] 周本宏, 松长青, 姜姗, 等. 地榆鞣质提取物的抗菌活性及对金黄色葡萄球菌的抑菌机制研究[J]. 中国药师, 2016, 19(3): 464-469.
- [7] 吴晓菊, 和文娟, 杨清香, 等. 水蒸气蒸馏法提取神香草精油的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(14): 39-41.
- [8] 王珊. 实验室酵母菌种的保藏和活化[J]. 啤酒科技, 2014(1): 33.
- [9] 全艳玲, 于洪梅, 贾宏敏, 等. 抑菌圈法比较研究两种聚脲杀菌性能[J]. 实验科学与技术, 2015, 13(3): 27-28.
- [10] 李欣, 乔家驹, 冯汉青, 等. 杜仲雄花乙酸乙酯提取物的抑菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(11): 62-65.
- [11] 唐俊妮. 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶相关基因的功能与特征分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [12] 姜玮. 长白山杜香挥发油抑菌活性成分提取及抑菌机理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [13] 唐俊妮, 龙飞, 史贤明, 等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1467-1469.
- [14] 熊明华, 朱继荣, 王光利, 等. 一种快速经济提取革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌基因组 DNA 的方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(2): 385-390.
- [15] 刘松鑫, 韦会平, 程君, 等. 紫茎泽兰挥发油对金黄色葡萄球菌的抗菌机制[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(21): 1742-1745.

## Antibacterial Effect and Mechanism of Essential Oils From *Artemisia argyi in vitro*

YANG Wenting<sup>1</sup>, HUANG Shixu<sup>1</sup>, WENG Dehui<sup>2</sup>, WU Shijun<sup>1</sup>

(1. Environmental and Biological Engineering College, Wuhan Technology and Business University, Wuhan, Hubei 430065; 2. College of Biology and Pharmaceutical, Wuhan Huaxia University of Technology, Wuhan, Hubei 430223)

**Abstract:** *Artemisia argyi* was used as test material, the antibacterial activity of essential oils against different microorganism was studied by inhibition zone method and constant dilution method. The results showed that the antibacterial activity of essential oils were in the descending order of degree of influence were *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and *Penicillium*. The inhibition zone diameter against *Staphylococcus aureus* reached 1.5 cm, and the minimal inhibitory concentration was  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . According to the content change of protein and nucleic acid, the antibacterial mechanism of essential oils was enhancement of cell membrane permeability and inhibition of synthesis of nucleic acid.

**Keywords:** *Artemisia argyi*; volatile oil; antibacterial activity; antibacterial mechanism