桉叶提取物联合 PCMX 的协同抗菌作用研究

杨丽哲,方舟,冯科珂,洪海军 (联合利华(中国)有限公司上海分公司,上海,200335)

要: 文章研究探讨了桉叶提取物和 PCMX(4-氯-3,5-二甲基苯酚, CAS No: 88-04-0)在一般物体表面及织物的清洁消毒场景中常见菌的联合抗菌作用,本实验所采用的蓝桉叶提取物经测试表现出对多种革兰氏阳性菌和阴性菌的抑菌作用,经联

合药敏测试发现它和 PCMX 联用对于金黄色葡萄球菌,藤黄微球菌,人葡萄球菌,奥斯陆莫拉菌均表现出良好的协同抗菌作用,FIC值分别为 0.75, 0.75, 0.516, 0.75, 为桉叶提取物应用于PCMX配方产品,减少 PCMX 的用量,增加复合物的抗菌作用提供理论依据。

关键 词: 桉叶提取物; PCMX; 联合药敏; 协同抗菌

作者简介: 杨丽哲,硕士,毕业于华东理工大学,联合利华(中国)有限公司应用微生物组高级研究员,主要负责微生物基础技术应用与研究的相关工作。E-mail: Scarlett.Yang@unilever.com。



桉树 (Eucalyptus spp.)属于姚金娘科桉属乔木,原 产于澳大利亚,后引种中国云南、四川、贵州、江苏、 江西、广东、广西等地区[1]。蓝桉 (Eucalyptus globulus Labill.)是桉树的油,材兼用树种,具有对生长条件要求 低,木材品质好的特点,其桉树皮和桉树叶都具良好的经 济价值, 桉树皮可用于纸浆工业和纤维材料, 也因含有丰 富的单宁酸, 黄酮类物质和挥发油等物质可药用或者用于 食品添加,蓝桉叶呈镰刀状披针形,其植物精油和浸提物 被研究发现具有抗菌抑菌、抗氧化、降血糖的各种天然产 物,如挥发油类,间苯三酚衍生物类,黄酮类,酚酸类物 质, 鞣花酸类, 三萜类, 生物碱类等[2]。蓝桉叶抗菌抗病 毒活性有大量的文献报道, 田玉红, 周琪等研究发现广林 九号桉叶精油对金黄色葡萄球菌,枯草芽孢杆菌,大肠杆 菌, 黄曲霉, 黑曲霉最小抑菌浓度分别为10、20、20、 10、10 ml/L^[3], Bachir Rachi G和 Benali M采用琼脂扩散法 和肉汤稀释法发现了蓝桉叶精油对大肠杆菌和金黄色葡萄 球菌的抑菌作用, 革兰氏阴性菌大肠杆菌比革兰氏阳性菌 金黄色葡萄球菌对蓝桉叶精油更敏感[4]。

1. 实验部分

1.1主要仪器与试剂

Thermo 1300 SERIES A2生物安全柜、电子天平(梅特勒托利多)、Interscience Scan 4000自动菌落计数器、Interscience easy Spiral Dilute®自动稀释接种仪、Memmert IF750plus培养箱、Yamato SQL1010C立式压力蒸汽灭菌器、Evolution200紫外分光光度计ThermoFisher SCIENTIFIC、T100电热恒温水浴锅(Grant)、LEICA DM500光学显微镜、Flack Tek Speedmixer、VORTEX3漩涡振荡器

(IKA)、Eppendorf移液器(1 mL, 200 μL, 12道可调量程 30-300 μL, T12道可调量程 0.5-10 μL)、96孔板(Corning)、定性滤纸(新华)

去离子水、蓝桉叶提取物(固含量为16.78%, 英格生物)、PCMX(purity>99%, 山东奥友生物)、无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、TSA培养基(OXOID)、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)、TSB液体培养基(OXOID), 刃天青钠盐(>85%, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司)

肺炎克雷伯菌(ATCC10031)、大肠杆菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、铜绿假单胞菌(ATCC9027)、藤黄微球菌(CICC10209)、人葡萄球菌(ATCC27844)、奥斯陆莫拉菌(ATCC19976)均来自CICC代购或者CICC菌株保藏中心

1.2实验方法

1.2.1 抑菌环法

参照 QB/T2738标准方法^[5],采用已经预先灭菌干燥的滤纸片(直径约5 mm,采用新华定性滤纸制作)放入培养皿内铺开,将桉叶浸膏提取物采用水溶解,PCMX由于水溶性差采用无水乙醇溶解配制,制备到预设浓度,加在滤纸片上,每片20 μL,放入生物安全柜开盖室温晾干备用;制备10⁵ cfu/ml的新鲜菌悬液,采用无 easy Spiral Dilute 自动稀释接种仪涂板,选择连续加菌模式,每板200 μL菌液,使菌液均匀涂布整个平板,干燥5 min;将制备好的加样滤纸片贴于涂好菌的 TSA平板上,每个平板上贴3片滤纸片,置于36 ℃培养18 h后采用 Interscience Scan 4000分析测量抑菌环(ZOI,zone of inhibition)。实验同时采用无菌去离子水代替样品进行平行实验作为阴性对照组来判定实验的有效性。

实验所采用的菌株和待测物质的预设浓度如表1所示:

表1 测试浓度和测试菌株

菌株名称	菌株代号	桉叶提取物浓 度(水溶)/%	PCMX浓度 (醇溶)/%	
大肠杆菌	ATCC25922			
金黄色葡萄球菌	ATCC6538			
铜绿假单胞菌	ATCC9027	16.78	-	
藤黄微球菌	CICC10209		5	
人葡萄球菌	ATCC27844			
奥斯陆莫拉菌	ATCC19976			

1.2.2 最小抑菌浓度 (MIC) 改良微量肉汤法

参照消毒技术规范的最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration)测定方法(营养肉汤稀释法)改良为微量肉汤法,将桉叶提取物先采用双倍的 TSB肉汤稀释制备为初始浓度为8.39%的桉叶 TSB肉汤混合液,再采用单倍 TSB肉汤进行对倍稀释,得到一系列待测的含桉叶提取物的单倍肉汤待测液,浓度分别为8.39%,4.195%,2.10%……等;按照同样的方法制备 PCMX的待测溶液,先采用无水乙醇将 PCMX配制为3%的 PCMX乙醇溶液,采用双倍 TSB肉汤进行对倍稀释为1.5%的单倍 PCMX溶液(乙醇含量为50%),再采用单倍 TSB肉汤进行对倍稀释,得到一系列待测的含 PCMX的单倍肉汤待测液,浓度分别为1.5%,0.75%,0.375%……,由于乙醇溶液本身具有抑菌性需要采用对应含量的乙醇溶液制备单倍肉汤待测液作为对照,分别为50%乙醇 TSB肉汤,25%乙醇 TSB溶液,12.5%乙醇 TSB肉汤……。

将上述系列梯度稀释液加入微量平板(96孔板), 每孔200 μL, 再加入20 μL含菌量为105-106 cfu/ml的菌 悬液,将96孔板置于36℃培养箱培养18h后,取出观察 浊度变化,同时在每个微量孔中加入20 μL刃天青指示 剂(预先采用无菌去离子水配制刃天青至0.1%浓度并采用 0.22 μm滤膜过滤使用),继续放回36℃培养箱中培养 4-6 h, 取出观察刃天青的颜色变化, 在终点生长判定时采 用刃天青指示剂辅助混浊度判定是因为刃天青 (resazurin) 是一种无毒的氧化还原染料在细胞质中, 刃天青可在多种 还原酶的作用下由蓝/紫色态被还原为红色或者粉色,而蓝 桉叶提取物本身具有颜色,系列梯度测试溶液的颜色为黄 褐色至淡黄色,单依赖浊度不容易判定菌的生长情况,刃 天青的蓝紫色/红粉色有别于底物本身颜色,是一个快速高 效的辅助手段,同时以单倍 TSB 肉汤加菌和不加菌分别作 为阳性和阴性对照,以阳性培养后浑浊加刃天青后变成红 色, 阴性培养后澄清加刃天青后紫色不变色作为实验成功

的判读依据。

测试菌株除表1外,增加肺炎克雷伯菌,对于系列梯度 PCMX 乙醇 TSB溶液的最小抑菌浓度判定需要排除乙醇 浓度干扰,只有 PCMX的 MIC值低于其对应乙醇溶液的 MIC值,才能判定为有效。

1.2.3 联合药敏实验肉汤棋盘稀释法(FIC值)

肉汤稀释棋盘法是常用的联合药敏实验方法,在上述 1.2.2测试核叶和 PCMX 乙醇溶液最小抑菌浓度的基础上, 再采用此方法来观察两个物质的协同拮抗作用就变得较为 容易;同1.2.2的制备方法来制备核叶提取物和 PCMX 的系列梯度测试液(初始配制浓度可根据1.2.2所测得的 MIC值的结果进行调整,一般采用 MIC值的2-3倍),在96微孔板里选取两个待测物质的6-8个稀释度,取各50 μ L分别排布在微孔板的行与列上,使板的排布如图1所示,使板的最后测试列和最后测试行为单独的系列稀释的核叶提取物和 PCMX 醇溶稀释液,在这些微孔内补50 μ L 单倍 TSB 溶液使微孔的总量为100 μ L,且有效物质的含量与对应其它列或者行的单有效物质含量一致。

A← B←	A⊬ 1/2B⊬	A← 1/4B←	A← 1/8B←	A← 1/16B←	A← 1/32B←	A← 1/64B←	A← 0B←		
1/2A← B←	1/2A← 1/2B←	1/2A← 1/4B←	1/2A← 1/8B←	1/2A← 1/16B←	1/2A← 1/32B←	1/2A← 1/64B←	1/2A← 0B←		
1/4A← B←	1/4A⊖ 1/2B⊖	1/4A← 1/4B←	1/4A← 1/8B←	1/4A∉ 1/16B∉	1/4A← 1/32B←	1/4A← 1/64B←	1/4A← 0B←		
1/8A← B←	1/8A← 1/2B←	1/8A← 1/4B←	1/8A← 1/8B←	1/8A← 1/16B←	1/8A← 1/32B←	1/8A← 1/64B←	1/8A← 0B←		
1/16A⊬ B⊬	1/16A← 1/2B←	1/16A← 1/4B←	1/16A← 1/8B←	1/16A← 1/16B←	1/16A← 1/32B←	1/16A쓴 1/64B쓴	1/16A← 0B←		
1/32A⊬ B⊬	1/32A← 1/2B←	1/32A← 1/4B←	1/32A← 1/8B←	1/32A← 1/16B←	1/32A← 1/32B←	1/32A← 1/64B←	1/32A← 0B←		
1/64A⊬ B⊬	1/64A← 1/2B←	1/64A← 1/4B←	1/64A← 1/8B←	1/64A← 1/16B←	1/64A← 1/32B←	1/64A← 1/64B←	1/64A← 0B←		
0A← B←	0A← 1/2B←	0A← 1/4B←	0A← 1/8B←	0A← 1/16B←	0A← 1/32B←	0A← 1/64B←	0A← 0B←		

图1 FIC实验96孔板设计

排好板后,在每个微孔板中加入 $10~\mu$ L的 10^5 - 10^6 cfu/ml的菌悬液,放入36~ C培养箱培养18~h,取出观察浊度变化,同时在每个微量孔中加入 $10~\mu$ L刃天青指示剂继续培养至24~h来辅助观察颜色的变化。

单物质的 FIC (Fractional inhibitory concentration) 和 Σ FIC 计算公式如下:

FIC (桉叶提取物)=联合时桉叶的 MIC /桉叶单独的 MIC

∑FIC = FIC (桉叶提取物) + FIC (PCMX)

2.结果与分析

2.1 抑菌环测量评价

抑菌环采用 Scan 4000分析测量, 部分菌的 ZOI分析见

图2, 抑菌环的测试数据汇总见表2所示。

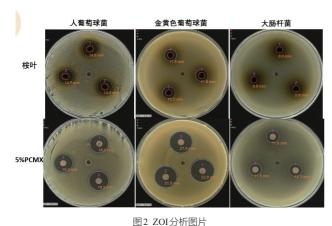


表2 ZOI测试结果

抑菌环直径/mm 桉叶提取物(16.78%) 5%PCMX 测试菌株 金黄色葡萄球菌 11.77 21.93 大肠杆菌 11.87 铜绿假单胞菌 藤黄微球菌 16.47 17.0 人葡萄球菌 14.7 18.37 奥斯陆莫拉菌 17.9 23.0

注: "一"代表无抑菌圈

从抑菌圈的结果可以看出,桉叶提取物对于大肠杆菌,铜绿假单胞菌的作用较差,没有抑菌环,5%PCMX对于铜绿假单胞菌也没有抑菌环,但是对于大肠的抑菌环有11,87 mm;桉叶提取物对于藤黄微球菌,人葡萄球菌,奥斯陆莫拉菌的抑菌环都和5%PCMX比较接近,表现出良好的抑菌效果;桉叶提取物对于金黄色葡萄球菌的抑菌环相比5%PCMX比较明显,约为5%PCMX的一半大小,表明它在金黄色葡萄球菌的抑菌能力上和5%PCMX有差距,可以通过后续的MIC实验来进一步验证。

2.2 单一物质的最小抑菌浓度

最小抑菌浓度的测试结果如表3所示,其中PCMX醇溶液所得MIC值的微孔所含对应的乙醇浓度的量均低于测试菌组乙醇对照组的对应MIC值浓度,因此可以判定PCMX的MIC值有效。

从数据观察来看,PCMX对革兰氏阳性菌和阴性菌的MIC值均比较接近,和PCMX作为一个酚类的消毒杀菌因子的广谱性能一致,而桉叶提取物有对于革兰氏阳性菌和阴性菌的MIC值差异较大,这也是植物提取物的常见抗菌特点,具有选择性不具有广谱性,和2.1抑菌环的测试结果也具有一致性;和作为中效消毒剂因子PCMX相比,桉叶

表3 最小抑菌浓度测试结果

菌株名称	GP/GN	桉叶提取物 浓度/mg/L	PCMX浓度 (醇溶)/mg/L	无水乙醇 / %
肺炎克雷伯菌	GF	20975	78.1	6.25%
金黄色葡萄球菌	GP	2621.9	156.25	12.5%
大肠杆菌	GF	20975	156.25	12.5%
铜绿假单胞菌	GNF	10488	156.25	12.5%
藤黄微球菌	GP	655.5	156.25	12.5%
人葡萄球菌	GP	5244	156.25	12.5%
奥斯陆莫拉菌	GNF	327.7	39.1	3.125%

注: "GP"代表革兰氏阳性菌, "GNF"代表革兰氏非阴性菌, "GF"代表革兰氏非阴性菌

提取物对于革兰氏阴性发酵菌的 MIC值较高,但对于藤黄 微球菌和奥斯陆莫拉菌的 MIC值仅为 PCMX 的4-10倍,抑制效果非常明显,和2.1部分抑菌环实验结果也非常一致。

2.3 复配的联合抗菌活性

根据此轮测试结果,可以调整桉叶提取物的初始配制浓度为2.1-4.2%,PCMX醇溶液的有效含量为312.5-625 ppm,进行后续的协同抗菌测试,协同抗菌的96孔板和刃天青对于终点的判定见图3,FIC指数和联合抗菌的评价见表4.







图3 FIC实验结果刃天青显色判读 表4 复配的联合抑菌效果

菌株名称	FIC(桉叶 提取物)	FIC (PCMX)	∑FIC	联合效果评价
肺炎克雷伯菌	1	1	2	拮抗作用
金黄色葡萄球菌	0.25	0.5	0.75	协同作用
大肠杆菌	1	1	2	拮抗作用
铜绿假单胞菌	0.5	0.5	1	相加作用
藤黄微球菌	0.5	0.25	0.75	协同作用
人葡萄球菌	0.016	0.5	0.516	协同作用
奥斯陆莫拉菌	0.25	0.5	0.75	协同作用

由表4可以看出,桉叶提取物和 PCMX 的复合物在对肺炎克雷伯菌,大肠杆菌这两株革兰氏阴性发酵菌的 FIC 值都大于1,表现为拮抗作用,对于阴性非发酵菌铜绿假单胞菌的 FIC 值等于1,表现为相加作用,对于金黄色葡萄球菌,藤黄微球菌,人葡萄球菌这三株革兰氏阳性菌,和另外一株革兰氏阴性菌奥斯陆莫拉菌的 FIC 值都小于1,分别

中国日化科技

为0.75, 0.75, 0.516, 0.75, 表现出了良好的协同作用。

3. 讨论

桉树提取物在我国有丰富的资源, 有悠久的使用历 史,是一种在已使用化妆品原料目录和中国现有化学物质 名录都存在的成分,水溶性良好,具有愉悦的中草药气 味,关于它的抗抑菌性能也具有大量的文献报道; PCMX 是常用的酚类消毒剂,具有广谱抗抑菌性能,具有特征性 气味,对于淡水无脊椎动物和鱼类有毒性,水溶性差。本 实验采用一般物体硬表面和织物场景的几株常见菌进行测 试,抑菌圈实验和最小抑菌实验表明桉叶提取物对几株常 见菌均表现出了抑制作用,联合药敏实验表明桉叶提取物 和 PCMX 联用,对于尤其革兰氏阳性菌和奥斯陆莫拉菌具 有良好的协同作用。金黄色葡萄球菌是化妆品和日用品常 见的致病菌, 人葡萄球菌, 藤黄微球菌和奥斯陆莫拉菌是 生活场景尤其织物表面常见的异味菌,金黄色葡萄球菌, 人葡萄球菌和藤黄微球菌可存在于人体皮肤表面, 利于皮 脂腺的脂肪酸产生异味[6], 而奥斯陆莫拉菌是阴干环境异 味的常见菌, 具有较好的耐干旱特性, 如果衣物洗涤后没 有及时晾晒或在日照不充分的环境中晾晒, 奥斯陆莫拉菌

可以活跃生长产生臭味^[7]。本实验的测试结果对核叶提取物应用于 PCMX 配方中,增效配方的抗抑菌性能,减少配方中 PCMX 的用量,增强配方的除菌除异味的性能提供良好的数据支持。

参考文献

- [1] Qi S X. Eucalyptus in China[M].2nd ed.Beijing: China Forestry Publishing House,2002.
- [2] 唐云,李伟. 蓝桉的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2015,9(46):923-931.
- [3] 田玉红,周琪,颇俊华.广林九号桉叶精油的抑菌活性研究[J].湖北农业科学,2013,52(21):5193-6.
- [4] Bachir R G, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and Staphylococcus aureus[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012,2(9):739–742.
- [5] 中华人民共和国轻工业行业标准. 日化产品抗菌抑菌效果的评价方法: QB/T 2738-2023[S]. 中华人民共和国工业和信息化部, 2023.
- [6] Troccaz M,Gaia N,Beccussi S,et al. Mapping axillary microbiota responsible for the body odours using a culture-independent approach[J]. Journal of Investigative Dematolo gy,2010,130(02):529-540.
- [7] 庭野悠, 竹内浩平. 衣物"生干臭"原因解析及除味织物护理产品的开发 [J].中国洗涤用品工业, 2013(2): 60-64.

Research of the Antibacterial Effects Between Eucalyptus Leaf Extract and PCMX

Yang Li-zhe, Fang Zhou, Feng Ke-ke, Hong Hai-jun (Unilever (China) Limited Shanghai Branch, Shanghai, 200335)

Abstract: This paper studied the antibacterial effect of Eucalyptus leaf extract and PCMX (4-chloro-3,5-dimethylphenol, CAS No: 88-04-0) on common bacteria in general hard surfaces and fabric cleaning and disinfection. The leaves of Eucalyptus globulus used in this experiment has been verified to have antibacterial activity against both gram positive and gram negative bacteria. This study found that the combination of Eucalyptus leaf extract and PCMX showed good synergistic antibacterial effect against Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Staphylococcus hominis, and Moraxella osloensis by combined chemosensitivity testing method, the FIC values tested 0.75, 0.75, 0.516, and 0.75. This study provides a theoretical basis for the application of Eucalyptus leaf extract in PCMX formula products, reducing the usage of PCMX and increasing the antibacterial effect of the complex.

Keywords: Eucalyptus leaf extract; PCMX; combined chemosensitivity; synergy antibacterial effect

