

油橄榄叶提取物的抑菌活性研究

孔维宝, 杨树玲, 霍焕燃, 景洋, 张爱梅, 牛世全

(西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070)

摘要:以牛津杯扩散法考察油橄榄叶提取物(OLE)对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等8种致病菌的抑菌活性,用稀释法分析OLE对8种细菌生长的影响,并探究最低抑菌质量浓度(MIC)和最低杀菌质量浓度(MBC)。结果表明:以盐酸小檗碱作为对照,OLE对蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、抗四环素大肠杆菌的抑菌作用优于盐酸小檗碱;OLE对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌作用较强(MIC 1 mg/mL, MBC 2 mg/mL)。20 mg/mL的OLE对大肠杆菌的抑制作用最强,为极度敏感(大肠杆菌的 $d = (25.07 \pm 3.02)$ mm,抗四环素大肠杆菌的 $d = (24.89 \pm 1.58)$ mm);葡萄球菌次之(表皮葡萄球菌的 $d = (20.11 \pm 1.02)$ mm,金黄色葡萄球菌的 $d = (21.35 \pm 2.06)$ mm,金黄色葡萄球菌(SH7) $d = (20.01 \pm 1.21)$ mm);而芽孢杆菌处于中度敏感状态。OLE除对铜绿假单胞菌的对数生长期无明显影响外,对其余7种细菌的对数生长期均有延缓作用。OLE具有较强的抑菌活性,可作为一种绿色安全的植物源抑菌制剂。

关键词:油橄榄叶;提取物;抑菌活性;细菌

中图分类号:TS229;TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)02-0095-06

Antibacterial activity of olive leaves extract

KONG Weibao, YANG Shuling, HUO Huanran, JING Yang,
ZHANG Aimei, NIU Shiquan

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The antibacterial activities of olive leaves extract (OLE) against eight pathogenic bacteria including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc were investigated by Oxford cup diffusion method. The effects of OLE on the growth curve of eight bacteria, as well as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were analyzed by dilution method. The results showed that using berberine hydrochloride as the control, the inhibitory effects of OLE on *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and anti-tetracycline *Escherichia coli* were better than those of berberine hydrochloride. OLE had strong antibacterial effect on *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (MIC 1 mg/mL, MBC 2 mg/mL). OLE of 20 mg/mL had the strongest inhibitory effect on *Escherichia coli*, and was extremely sensitive ($d = (25.07 \pm 3.02)$ mm for *Escherichia coli*, $d = (24.89 \pm 1.58)$ mm for anti-tetracycline *Escherichia coli*), followed by *Staphylococcus* ($d = (20.11 \pm 1.02)$ mm for *Staphylococcus epidermidis*, $d = (21.35 \pm 2.06)$ mm for *Staphylococcus aureus*, $d = (20.01 \pm 1.21)$ mm for *Staphylococcus aureus* (SH7)), while *Bacillus* was in a moderately sensitive state. Except that OLE had no obvious influence on the logarithmic growth period of *Pseudomonas aeruginosa*, it could delay the logarithmic growth period of the other seven bacteria. OLE had strong antibacterial activity and

could be used as a green, safe and plant-derived bacteriostatic agent.

Key words: olive leaf; extract; antibacterial activity; bacteria

收稿日期:2019-04-02;修回日期:2019-10-23

基金项目:国家自然科学基金项目(31360192);2018年陇原青年创新创业团队项目;2017年度西北师范大学青年科技创新团队项目

作者简介:孔维宝(1981),男,教授,硕士生导师,博士,研究方向为油料生物资源技术(E-mail)kwbao@163.com。

油橄榄是世界上著名的木本油料树种,其叶片

提取物富含橄榄苦苷和黄酮等活性成分,且含量明显高于果实,具有较强的抑菌活性^[1-2]。在地中海地区,油橄榄叶提取物早已被人们当作民间医药来治疗发烧和其他疾病如疟疾等。橄榄苦苷是一类被归于裂环烯醚萜类的苦味单萜类皂苷,毒性极低,是油橄榄叶中最具抗菌活性的物质^[3]。此外,橄榄苦苷有很强的抗氧化活性,尤其是作为自由基清除剂,能够提高 SOD 活性^[4],并具有抗肿瘤、降血糖等药理作用^[5]。

随着抗生素类和磺胺类等抗菌药物的大量使用,细菌的耐药性不断增强。因此,研发高效、广谱、低残留、低毒的药物将成为防治细菌感染类疾病的重中之重。研究发现中药或天然植物提取物可抑制或直接杀灭病原菌而不产生耐药性^[6-7],因此抗菌中药逐步成为研究热点。而橄榄苦苷作为一种裂环烯醚萜类化合物,对细菌具有较强的抑制效果。本文以甘肃陇南油橄榄叶提取物(Olive leaves extract, OLE)为试样,分析其对几种常见细菌的抑菌活性,为油橄榄叶提取物制备成抗菌制剂提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

油橄榄叶提取物(OLE):由陇南田园油橄榄科技开发有限公司提供,主要活性成分及含量为橄榄苦苷 34.62%、总多酚 0.15%、总黄酮 10.23%。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) CVCC1570、抗四环素大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) CVCC 1882、金黄色葡萄球菌(SH7),购自中国兽医药品监察所;表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) CMCC26069、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CMCC(B)63302,购自北京北纳创联生物技术研究院;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),保藏于西北师范大学生命科学学院微生物实验室。

牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉、BR 生化试剂,购自海博生物技术有限公司。氯化钠、盐酸小檗碱、氯化三苯四氮唑(TTC)、二甲基亚砜(DMSO),分析纯。

1.1.2 仪器与设备

LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;BT-25S 型电子天平,德国赛多利斯;IS-RDV1 型恒温振荡器,美国 Crystal;HFsafe 1500 型生物安全柜,上海力申科学仪器有限公司;WP-RO-10B 型实验室专用超纯水机,四川沃特尔科技发展有限公司;TU-1810DPC 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;DNP-

9052-1A 型电热恒温培养箱,上海鸿都电子科技有限公司;不锈钢数显卡尺,天津市量具厂;KQ-500DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

10 倍稀释法制备菌悬液:分别吸取稀释至 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 倍的菌悬液 100 μ L 于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基中涂布,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 18 h,对菌落数在 30~300 之间的培养皿进行计数,求平均值。最终挑选菌液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 菌悬液备用。

1.2.2 最低抑菌质量浓度(MIC)、最低杀菌质量浓度(MBC)测定

采用 96 孔板肉汤稀释法^[8]测定 OLE 对 8 种供试菌的 MIC 和 MBC。盐酸小檗碱作为对照,每孔中加入牛肉膏蛋白胨液体培养基 100 μ L,96 孔板的 A~D 行第 1 孔中加入 100 μ L 64 mg/mL 的 OLE 样品,E~H 行第 1 孔中加入 100 μ L 64 mg/mL 的盐酸小檗碱样品,二倍稀释法使药液浓度呈梯度递减,第 10 孔中取出的药液与培养基混合液弃去,第 11 孔为加药不加菌液的阴性对照,第 12 孔为加菌液不加药的空白对照。除第 11 列和第 12 列,每孔中加入 5 μ L 菌悬液,置于微型振荡器上振荡 1 min,使各孔内溶液混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 18 h,以肉眼观察无浑浊的药液质量浓度即为受试菌的 MIC。

另取洁净微孔板,每孔中加入 100 μ L 牛肉膏蛋白胨液体培养基,取各板中肉眼可见浑浊孔的前一澄清孔中培养液 5 μ L 置于该板中培养,每孔 3 个重复,在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 18 h 后,加入 5 g/L 氯化三苯四氮唑(TTC)5 μ L,35 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后观察,有细菌生长呈红色,继续取前一孔培养液进行观察,直至无红色即为该菌的 MBC。

1.2.3 抑菌活性测定

采用牛津杯法^[9]评价 OLE 对 8 种供试细菌的抑菌活性。吸取 100 μ L 菌悬液涂布于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基中,静置 30 min 后,将平板均分为 4 个区,分别放入 5 个牛津杯(装量 250 μ L),每种细菌重复 3 次,静置 15 min 后置于 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。观察并测量各抑菌圈直径(d),记录抑菌圈大小。按照抗菌药物敏感性实验执行标准根据抑菌圈直径判定细菌对 OLE 的敏感度。细菌对 OLE 表现出敏感度越高则 OLE 对该细菌具有更好的抑菌效果。

1.2.4 OLE 对细菌生长曲线的影响

采用稀释法^[10]分析 OLE 对 8 种供试细菌生长曲线的影响。依次将菌悬液和不同质量浓度的

OLE 溶液加入灭菌后的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37℃、160 r/min 振荡培养。每隔 6 h 置于超净工作台内取样一次,于 540 nm 波长处测定其吸光度,绘制细菌生长曲线。

1.2.5 数据处理

实验数据以“平均值 ± 标准偏差”表示,用 SPSS18.0 和 Origin 9.0 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 MIC 与 MBC

采用稀释法分析 OLE 对 8 种供试菌的 MIC 和 MBC,结果见表 1。

表 1 OLE 与盐酸小檗碱的最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC)

细菌	MIC/(mg/mL)		MBC/(mg/mL)	
	OLE	盐酸小檗碱	OLE	盐酸小檗碱
枯草芽孢杆菌	2	0.5	4	1
蜡状芽孢杆菌	8	16	16	32
表皮葡萄球菌	1	0.5	2	1
金黄色葡萄球菌	2	4	4	8
金黄色葡萄球菌 (SH7)	1	0.5	2	1
大肠杆菌	1	1	2	2
抗四环素大肠杆菌	8	16	16	32
铜绿假单胞菌	-	-	-	-

由表 1 可知,OLE 与盐酸小檗碱在测试质量浓度下对铜绿假单胞菌无抑制作用。OLE 对表皮葡

萄球菌、金黄色葡萄球菌 (SH7) 及大肠杆菌的抑制作用较强,对蜡状芽孢杆菌、抗四环素大肠杆菌的抑制作用较弱。OLE 对各细菌的 MIC 与 MBC 以及抑菌活性分别为:表皮葡萄球菌 (MIC 1 mg/mL, MBC 2 mg/mL) = 金黄色葡萄球菌 (SH7) (MIC 1 mg/mL, MBC 2 mg/mL) = 大肠杆菌 (MIC 1 mg/mL, MBC 2 mg/mL) > 枯草芽孢杆菌 (MIC 2 mg/mL, MBC 4 mg/mL) = 金黄色葡萄球菌 (MIC 2 mg/mL, MBC 4 mg/mL) > 蜡状芽孢杆菌 (MIC 8 mg/mL, MBC 16 mg/mL) = 抗四环素大肠杆菌 (MIC 8 mg/mL, MBC 16 mg/mL)。与对照盐酸小檗碱相比,OLE 对枯草芽孢杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌 (SH7) 的抑菌效果低于盐酸小檗碱,而对蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、抗四环素大肠杆菌的抑菌效果优于盐酸小檗碱,对大肠杆菌的抑菌效果与盐酸小檗碱的相当。有研究报道^[8,11] 橄榄苦苷对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.031 2 ~ 0.125 mg/mL; 橄榄总黄酮对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌均有抑制作用,对大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 0.25、0.125、0.062 5 mg/mL。以上研究与本实验结果存在差异,这可能主要与供试样品的来源及纯度有关系。

2.2 抑菌活性

OLE 对 8 种细菌的抑菌圈大小和细菌的敏感度如表 2 所示。

表 2 OLE 对 8 种细菌的抑菌圈大小及细菌敏感度

细菌	抑菌圈直径/mm				
	空白对照	1 mg/mL OLE	5 mg/mL OLE	10 mg/mL OLE	20 mg/mL OLE
枯草芽孢杆菌	8.00	8.12 ± 1.02	8.56 ± 0.54	10.37 ± 1.32	11.32 ± 1.32
蜡状芽孢杆菌	8.00	8.00	8.00	8.15 ± 1.35	10.12 ± 1.58
表皮葡萄球菌	8.00	8.04 ± 0.64	11.12 ± 0.54	15.67 ± 3.02	20.11 ± 1.02
金黄色葡萄球菌	8.00	8.35 ± 1.58	10.57 ± 1.21	16.25 ± 0.64	21.35 ± 2.06
金黄色葡萄球菌 (SH7)	8.00	8.64 ± 2.32	10.74 ± 2.06	15.89 ± 2.21	20.01 ± 1.21
大肠杆菌	8.00	8.12 ± 2.28	10.01 ± 2.06	15.01 ± 1.71	25.07 ± 3.02
抗四环素大肠杆菌	8.00	8.07 ± 2.06	10.02 ± 3.02	15.00 ± 2.59	24.89 ± 1.58
铜绿假单胞菌	8.00	8.00	8.00	8.00	8.58 ± 2.06

注: $d = 8$ mm 为不敏感或敏感度不明显, $8 \text{ mm} < d < 10 \text{ mm}$ 为低度敏感, $10 \text{ mm} \leq d < 15 \text{ mm}$ 为中度敏感, $15 \text{ mm} \leq d < 20 \text{ mm}$ 为高度敏感, $d \geq 20 \text{ mm}$ 为极度敏感。

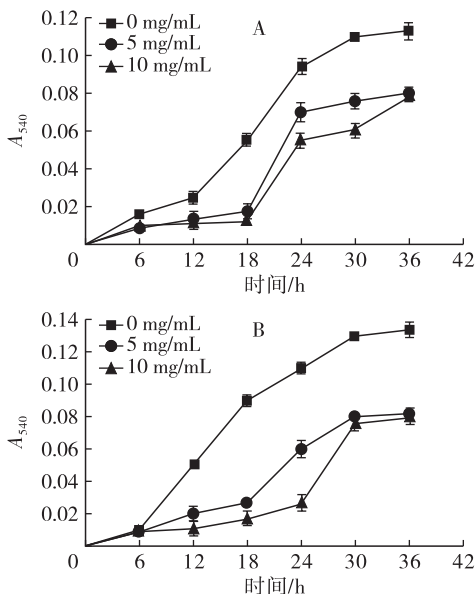
由表 2 可知,8 种细菌对空白对照均表现出不敏感或敏感度不明显,实验质量浓度范围内铜绿假单胞菌对 OLE 表现不敏感或低度敏感,OLE 对其他 7 种细菌都有抑菌作用。OLE 质量浓度为 1 mg/mL 时,蜡状芽孢杆菌和铜绿假单胞菌表现为不敏感,其他细菌均表现为低度敏感。OLE 质量浓度为 5 mg/mL 时,枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌分别表现为低度

敏感与不敏感,表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌 (SH7)、大肠杆菌及抗四环素大肠杆菌均表现为中度敏感。OLE 质量浓度为 20 mg/mL 时,大肠杆菌、抗四环素大肠杆菌处于极度敏感 ($d = (25.07 \pm 3.02) \text{ mm}$, $d = (24.89 \pm 1.58) \text{ mm}$), 表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌 (SH7) 处于极度敏感 ($d = (20.11 \pm 1.02) \text{ mm}$, $d =$

(21.35 ± 2.06) mm, $d = (20.01 \pm 1.21)$ mm), 枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌处于中度敏感($d = (11.32 \pm 1.32)$ mm, $d = (10.12 \pm 1.58)$ mm)。以上结果显示:OLE 在实验质量浓度范围内对大肠杆菌、抗四环素大肠杆菌的抑菌活性最强,其次为金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌(SH7),而枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌对 OLE 表现出敏感度不高。苯酚类或抗氧化物通过与细胞的肽聚糖作用来破坏细胞壁结构或损害细胞膜,两者共同作用抑制细菌的生长^[12]。由于橄榄苦苷羟基邻位二取代结构的稳定性强^[13],以及大肠杆菌、抗四环素大肠杆菌(革兰氏阴性菌)细胞壁肽聚糖含量低和层次少,橄榄苦苷易于进入和产生抑制作用。表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌(SH7)、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌均为革兰氏阳性菌,菌体细胞壁结构紧密,以及芽孢强抗逆性使得橄榄苦苷对枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌的作用较弱。

2.3 OLE 对细菌生长曲线的影响

2.3.1 OLE 对芽孢杆菌生长曲线的影响(见图 1)



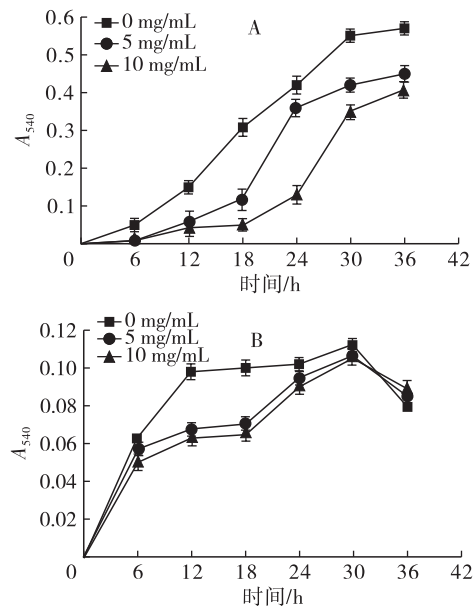
注:A 为蜡状芽孢杆菌,B 为枯草芽孢杆菌。

图 1 不同质量浓度 OLE 对芽孢杆菌生长曲线的影响

由图 1(A)可知,在不添加 OLE 的培养基中,蜡状芽孢杆菌在培养 12 h 后细菌生物量的积累明显加快,12~30 h 为蜡状芽孢杆菌的对数生长期。添加 OLE 质量浓度为 5 mg/mL 溶液的培养基中蜡状芽孢杆菌在培养 18 h 后适应环境并快速繁殖,在 18~24 h 处于对数生长期,与对照组比较,此时细菌的对数生长期相对延缓,说明 OLE 对蜡状芽孢杆菌的生长有一定的抑制作用。当添加 OLE 质量浓度为 10 mg/mL 的溶液时,培养到 18 h 后蜡状芽孢

杆菌开始迅速增长,在培养 18~24 h 时处于对数生长期,但菌体浓度低于 5 mg/mL 组,表明蜡状芽孢杆菌随着 OLE 质量浓度的增加,对数生长期被相应延缓或推迟。由图 1(B)可知,当不添加 OLE 时,培养到 6 h 后枯草芽孢杆菌开始增长,在培养 6~30 h 时处于对数生长期。OLE 质量浓度为 5 mg/mL 时,在培养 18 h 后枯草芽孢杆菌快速生长并进入对数生长期。在 OLE 质量浓度为 10 mg/mL 时,培养 24 h 后枯草芽孢杆菌增长明显加快,24~30 h 为快速生长期。表明随着 OLE 质量浓度的增加,枯草芽孢杆菌的延迟期增长,对数生长期延后。实验发现蜡状芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌对数生长期分别为 12~30 h、6~30 h,添加不同质量浓度的 OLE 后均可延缓蜡状芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌进入对数生长期。生长曲线迟缓期的长短主要因菌种、接种量、菌龄及营养物质等不同而异。本实验中迟缓期延长的原因可能是 OLE 中的活性成分作为菌体生长的抑制剂对其生长起到了抑制作用。

2.3.2 OLE 对大肠杆菌生长曲线的影响(见图 2)



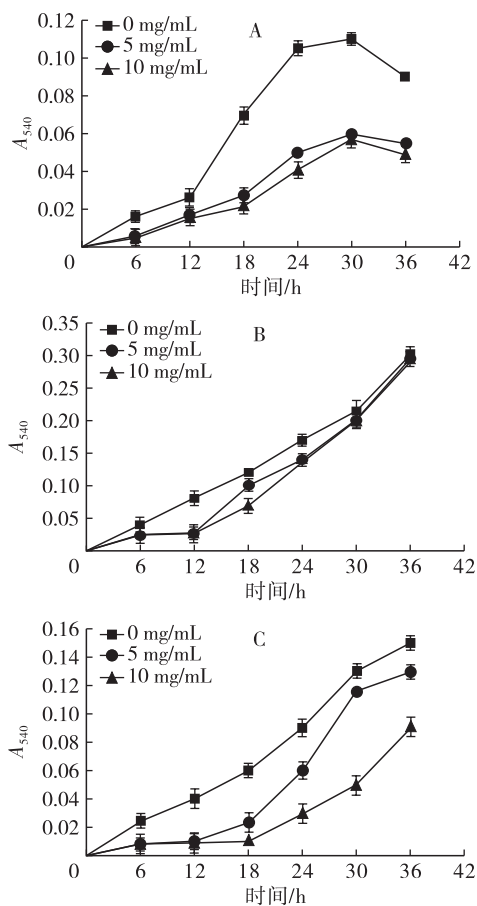
注:A 为抗四环素大肠杆菌,B 为大肠杆菌。

图 2 不同质量浓度 OLE 对大肠杆菌生长曲线的影响

由图 2 可知,抗四环素大肠杆菌组和大肠杆菌组的生长曲线趋势趋于一致。不添加 OLE 时,培养 6 h 后细菌数开始快速增长并进入对数生长期。当 OLE 质量浓度为 5 mg/mL 时,抗四环素大肠杆菌和大肠杆菌的对数生长期为 18~30 h,此时对数生长期被延缓,细菌生长速率减慢且所需时间范围变宽。当 OLE 质量浓度为 10 mg/mL 时,抗四环素大肠杆菌和大肠杆菌在培养 18 h 后细菌数迅速增加,在 18~30 h 为对数生长状态,但菌体浓度低于 5 mg/mL

组。图2(A)表明添加OLE既可以延缓抗四环素大肠杆菌进入对数生长期的时间,又可以降低其菌体生长量,OLE对该菌株有较强的抑制作用。图2(B)表明OLE对大肠杆菌的抑制作用相对较弱。油橄榄叶中酚类物质具有抗肿瘤、抗癌作用,此外还有广泛的抑菌和抗氧化作用,如橄榄苦苷、芦丁、咖啡酸等及其一定比例混合物均显示较强的体外活性,具有联合抗菌作用。Lee等^[14]发现橄榄叶提取物中的橄榄苦苷和咖啡酸均表现出对微生物的抑制作用,且组合酚类化合物的抗菌效果显著高于酚类化合物单体。

2.3.3 OLE对葡萄球菌生长曲线的影响(见图3)



注:A为表皮葡萄球菌,B为金黄色葡萄球菌(SH7),
C为金黄色葡萄球菌。

图3 不同质量浓度OLE对葡萄球菌生长曲线的影响

由图3(A)可知,不添加OLE的培养基中表皮葡萄球菌培养12 h左右进入对数生长期,培养24 h时进入平稳期,之后细菌数开始快速降低。OLE质量浓度为5 mg/mL时,表皮葡萄球菌在培养18 h之后细菌数增加较快,18 h左右进入对数生长期,培养30 h后达到最大菌液浓度,此时表皮葡萄球菌对数生长期相对对照组被延缓,说明OLE对表皮葡萄球菌有一定抑菌作用。在OLE质量浓度为

10 mg/mL时,表皮葡萄球菌在培养6 h后繁殖较快,数目增加明显,18 h左右进入对数生长期,培养30 h后细菌数开始下降。由图3(B)可知,当不添加OLE时,金黄色葡萄球菌(SH7)在开始培养后持续快速增长。OLE质量浓度为5 mg/mL时,培养6 h细菌开始适应环境,12 h后快速生长,对数生长期出现在培养12~36 h之间。OLE质量浓度为10 mg/mL时,金黄色葡萄球菌(SH7)生长曲线趋势与5 mg/mL组相一致。由图3(C)可知,不添加OLE时,培养6 h后金黄色葡萄球菌进入对数生长期。OLE质量浓度为5 mg/mL时,培养12 h后金黄色葡萄球菌菌数开始增加,18 h后进入对数生长期,相比对照组,此时对数生长期被延缓,细菌生长速率减慢。当OLE质量浓度为10 mg/mL时,金黄色葡萄球菌在培养18 h后细菌数迅速增加,于18 h达对数生长状态。以上结果表明,OLE对葡萄球菌生长曲线的对数生长期均具有延缓作用。吴遵秋等^[12]利用稀释法分析了橄榄苦苷对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌生长曲线的影响,结果显示橄榄苦苷对3种细菌生长曲线的影响均表现为延缓细菌的对数生长期,与本研究结果类似。植物源提取的酚类物质具有广谱的抑菌性,特别是黄酮类化合物,从不同物种中提取的黄酮类化合物抑菌作用均不相同。橄榄黄酮对变形杆菌有较强的抑制作用,对痢疾杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用更强;橄榄黄酮对牛乳中微生物的活动同样具有抑制作用,而且随着橄榄黄酮浓度的增加,抑菌作用明显增加^[15]。OLE对细菌对数生长期的延缓作用是其中多种活性物质相互协同作用的结果。

2.3.4 OLE对铜绿假单胞菌生长曲线的影响(见图4)

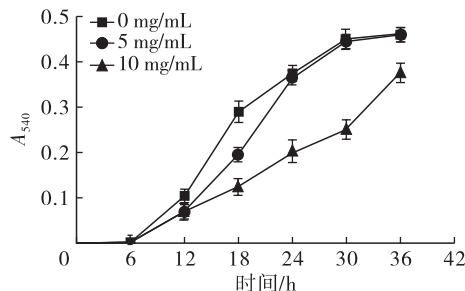


图4 不同质量浓度OLE对铜绿假单胞菌生长曲线的影响

由图4可知,与对照组相比,当OLE质量浓度为5 mg/mL时,对铜绿假单胞菌的生长抑制作用较小,但是当OLE质量浓度增至10 mg/mL时,生长抑制作用较明显,尤其是在生长后期。结果表明在实验质量浓度范围内,OLE对铜绿假单胞菌的生长抑

制作用与其质量浓度直接相关。已有的研究显示橄榄黄酮和橄榄多酚对杆菌、葡萄球菌均有较强的抑制作用,且随着浓度的增加抑菌作用明显增加^[15-16]。因此,橄榄叶提取物中有效成分浓度与抑菌活性之间存在显著的正相关性。

3 结 论

(1)采用稀释法分析了OLE对8种致病菌的MIC和MBC。结果显示,OLE与盐酸小檗碱在测试质量浓度范围内对铜绿假单胞菌无抑制作用,对表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的抑制作用较强,对蜡状芽孢杆菌、抗四环素大肠杆菌的抑制作用较弱。

(2)OLE对8种致病菌的抑菌活性实验结果表明:在OLE质量浓度为20 mg/mL时,OLE对大肠杆菌的抑制作用最强,对大肠杆菌和抗四环素大肠杆菌的抑菌圈直径分别可达(25.07 ± 3.02) mm和(24.89 ± 1.58) mm;金黄色葡萄球菌为极度敏感,金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌(SH7)抑菌圈直径分别为(21.35 ± 2.06) mm和(20.01 ± 1.21) mm;而对芽孢杆菌抑制作用相对较弱,处于中度敏感状态;对铜绿假单胞菌的抑制作用最弱,处于低度敏感状态。

(3)OLE主要通过延长细菌生长的延迟期,延缓对数生长期和降低菌体浓度对测试菌起抑制作用,而且随着OLE质量浓度的升高抑制作用增强。

以上结果表明,富含橄榄苦苷和黄酮类物质的橄榄叶提取物具有较强的抑菌活性,在植物源绿色抑菌制剂开发领域具有良好的市场前景。

参考文献:

- [1] KORUKLUOGLU M, SAHAN Y, YIGIT A, et al. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. leaf extracts[J]. J Food Process Pres, 2010, 34(3): 383-396.
- [2] 郑洁,魏鉴腾,刘建飞,等. 油橄榄叶提取物生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 613-618.
- [3] 刘天亮,王玲洁,宋宗辉,等. 橄榄苦苷的药理作用及其研究进展[J]. 西南国防医药, 2016, 26(6): 685-687.
- [4] MARTINEZ - MARTOS J M, MAYAS M D, CARRERA P, et al. Phenolic compounds oleuropein and hydroxytyrosol exert differential effects on glioma development via antioxidant defense systems[J]. J Funct Foods, 2014, 11: 221-234.
- [5] SEPPORTA M V, FUCCELLI R, ROSIGNOLI P, et al. Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts[J]. J Funct Foods, 2014, 8: 269-273.
- [6] 徐海花,牛钟相,秦爱建,等. 细菌耐药性研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2010, 41(1): 156-160.
- [7] 郑晨,何晓静,菅凌燕. 细菌耐药性及特殊使用级抗菌药物使用情况分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(14): 118-120.
- [8] BISIGNANO G, TOMAINO A, CASCIO R L, et al. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol[J]. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(8): 971-974.
- [9] 王怡婷,张传波,齐麟,等. 胶州湾沉积物可培养细菌的多样性及其抑菌活性[J]. 微生物学报, 2016, 56(12): 1892-1900.
- [10] 杨鹏斌,于新. 绿色木霉菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 25-28.
- [11] 曲中堂,项昭保,赵志强. 橄榄总黄酮抑菌作用研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(4): 62-64.
- [12] 吴遵秋,姜友军,苏光灿,等. 油橄榄叶中橄榄苦苷的体外抗氧化和抑菌活性[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 94-99.
- [13] TRIPOLI E, GIAMMANCO M, TABACCHI G, et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health[J]. Nutr Res Rev, 2005, 18(1): 98-112.
- [14] LEE O H, LEE B Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(10): 3751-3754.
- [15] 项昭保,何从林,任绍光,等. 野生橄榄黄酮抑菌效应及其在牛奶保鲜中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(10): 69-70.
- [16] 王瑶,惠曦,田吉. 橄榄多酚对口腔致病菌的体外抑菌实验研究[J]. 泸州医学院学报, 2008, 31(6): 613-616.