

16种植物挥发油对柏子仁黄曲霉菌的抑制作用考察

李婷¹, 姜丹¹, 常晓茜¹, 华国栋^{2*}, 刘春生^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 从16种植物(香茅、香叶、松节、山苍子、薄荷、干姜、丁香、姜黄、红花椒、肉桂、罗勒、迷迭香、青花椒、竹叶花椒、八角茴香、肉豆蔻)挥发油中筛选出对黄曲霉菌生长有较好抑制效果的植物挥发油。方法: 采用平板培养法从柏子仁药材表面分离得到黄曲霉菌, 利用水蒸气蒸馏法提取16种植物挥发油, 采用滤纸片熏蒸后测定黄曲霉菌的菌落直径, 对16种植物挥发油抑制黄曲霉菌生长的效果进行研究。结果: 采用性状、显微及DNA条形码鉴定的方法从柏子仁药材上成功分离了黄曲霉菌, 上述16种植物挥发油对黄曲霉菌的抑菌率分别为2.93%, 0.05%, 0.37%, 76.07%, 0.34%, 0.15%, 50.05%, 8.51%, 1.43%, 58.20%, 0.07%, 2.60%, 8.73%, 100.00%, 52.62%, 0.07%。结论: 16种植物挥发油对黄曲霉菌均有着不同程度的抑菌活性, 其中竹叶花椒挥发油、山苍子挥发油、肉桂挥发油的抑菌效果较好, 可为柏子仁生长储藏过程中防治黄曲霉菌的污染提供参考, 并为植物挥发油作为中药仓储过程中的抑菌剂提供应用依据。

[关键词] 挥发油; 黄曲霉菌; 抑菌率; 柏子仁; 药材仓储; 竹叶花椒; DNA条形码

[中图分类号] R22; R931; R282; S895.1+36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)05-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200447

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191105.1715.012.html>

[网络出版时间] 2019-11-06 16:28

Study on Inhibitory Effect of Volatile Oils in 16 Plants on *Aspergillus flavus* of Platycladi Semen

LI Ting¹, JIANG Dan¹, CHANG Xiao-xi¹, HUA Guo-dong^{2*}, LIU Chun-sheng^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To select volatile oils from 16 species of plants (*Cymbopogon citratus*, *Pelargonium graveolens*, *Pinus tabulaeformis*, *Litsea cubeba*, *Mentha haplocalyx*, *Zingiber officinale*, *Syzygium aromaticum*, *Curcuma longa*, *Zanthoxylum bungeanum*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Zanthoxylum schinifolium*, *Zanthoxylum armatum*, *Illicium verum*, *Myristica fragrans*) that have good inhibitory effect on the growth of *Aspergillus flavus*. **Method:** *Aspergillus flavus* was isolated from the surface of Platycladi Semen medicinal materials by plate culture method. The volatile oils of 16 plants were extracted by steam distillation. The colony diameter of *Aspergillus flavus* was determined by fumigation of filter paper, and the effect of volatile oils on the growth of *Aspergillus flavus* was systematically studied. **Result:** *Aspergillus flavus* was successfully isolated from Platycladi Semen by means of morphological, microscopic and DNA barcoding identification methods, the bacteriostatic rates of the above 16 kinds of volatile oils against *Aspergillus flavus* were 2.93%, 0.05%, 0.37%, 76.07%, 0.34%, 0.15%, 50.05%, 8.51%, 1.43%, 58.20%, 0.07%,

[收稿日期] 20190916(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8177141360)

[第一作者] 李婷, 在读硕士, 从事药用植物与分子生药学研究, Tel:010-84738624, E-mail: Abby1230@163.com

[通信作者] *刘春生, 教授, 从事药用植物与分子生药学研究, Tel:010-84738624, E-mail: max_liucs@263.net;

*华国栋, 教授, 从事临床中药与中药质量研究, Tel:010-67689957, E-mail: zhaojhuagd@126.com

2.60% , 8.73% , 100.00% , 52.62% , 0.07% , respectively. **Conclusion:** The volatile oils of 16 plants all have different degrees of antibacterial activities for *Aspergillus flavus* , and volatile oils of *Zanthoxylum armatum* , *Litsea cubeba* and *Cinnamomum cassia* have good inhibitory effect. This study can provide a theoretical basis for the prevention and control of *Aspergillus flavus* in the growth and storage of Platycladi Semen, and provide a basis for further research on plant volatile oil as bacteriostatic agents in the storage process of traditional Chinese medicine.

[**Key words**] volatile oil; *Aspergillus flavus*; bacteriostatic rate; Platycladi Semen; storage of medicinal materials; *Zanthoxylum armatum*; DNA barcoding

中药材由于富含丰富的油脂、淀粉等,在采收、加工、运输、储藏等过程中极易感染黄曲霉菌^[1]。柏子仁为 2015 年版《中国药典》规定必须检测黄曲霉毒素的中药材之一^[2],其为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* 的干燥成熟种仁,在储藏过程中黄曲霉菌是主要病原真菌。黄曲霉菌的代谢产物黄曲霉毒素 B₁ 是目前已知霉菌中毒性最强的一种,会严重危害人体和动物的健康^[3]。在查阅到的有关柏子仁黄曲霉毒素污染调查的 8 篇报道中,总共 23 个批次,均有黄曲霉毒素检出,其中 20 个批次超标,不合格率高达 87%^[4]。因此,源头抑制柏子仁黄曲霉菌的生长进而降低黄曲霉毒素的污染具有非常重要的意义。

传统仓储采用合成杀菌剂进行熏蒸,但其存在易残留、降解周期长等一系列问题,目前较少在中药材的储藏过程应用。植物挥发油作为一种安全^[5]、非残留、可生物降解和环境友好的方法保护药材免受真菌污染而日益获得关注。例如,从葛缕子和芫荽的种子中提取的挥发性成分能显著抑制黄曲霉菌^[6],石菖蒲、大蒜、淫羊藿以及野芝麻的挥发油能抑制一些细菌和真菌的生长^[7]。然而,至今未有合适的方法能防治柏子仁药材储藏过程中产生的黄曲霉菌及毒素。因此,本研究从柏子仁药材上分离了黄曲霉菌,采用滤纸片熏蒸法对 16 种植物挥发油抗真菌活性进行评价,为开发更加高效、安全、经济的抗菌剂提供理论依据,并为柏子仁药材的安全储藏及其黄曲霉菌污染的防控提供参考。

1 材料

YXQ-70A 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯医疗有限公司),XSP-44X.9 型显微镜(上海光学仪器一厂),Tprofessional Standard Gradient 96 型梯度聚合酶链式反应(PCR)热循环仪(德国耶拿分析仪器股份公司),3K15 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司),FMB40 型雪花制冰机(上海比朗仪器有限公司),GL-88B 型旋涡混合器(海门市斯林贝尔仪器制造有限公司),BG-gds AUTO520 型凝胶成像系统

(南京华奥仪器有限公司),JY-SP3 型电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司),MM400 型混合球磨机(上海弗尔德莱驰有限公司)。

培养皿(浙江柏美特医用塑料有限公司),血球计数板(上海求精公司),真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒和 2 × Taq Plus PCR MasterMix(含染料)(北京博迈德科技发展有限公司,批号分别为 73621755,MT201-02),引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(自制,包括无水葡萄糖 18 g,琼脂 18 g 和马铃薯 200 g,即将马铃薯 200 g 切成小块,加水煮烂,8 层纱布过滤,加入琼脂 18 g,混匀溶解后加入无水葡萄糖 18 g,补足水分至 1 L,分装加塞,于 115 °C 灭菌 20 min 后可用)。

肉桂、青花椒、干姜、薄荷样品均购买于北京市双桥燕京中药饮片厂,迷迭香、红花椒、竹叶花椒、山苍子、罗勒、香叶、松节、丁香、肉豆蔻、香茅、八角茴香、姜黄购于北京市房山区西潞园社区市场,柏子仁药材由北京科园信海医药经营有限公司提供,所有实验材料于 4 °C 储存,并均经北京中医药大学刘春生教授鉴定为正品。

2 方法

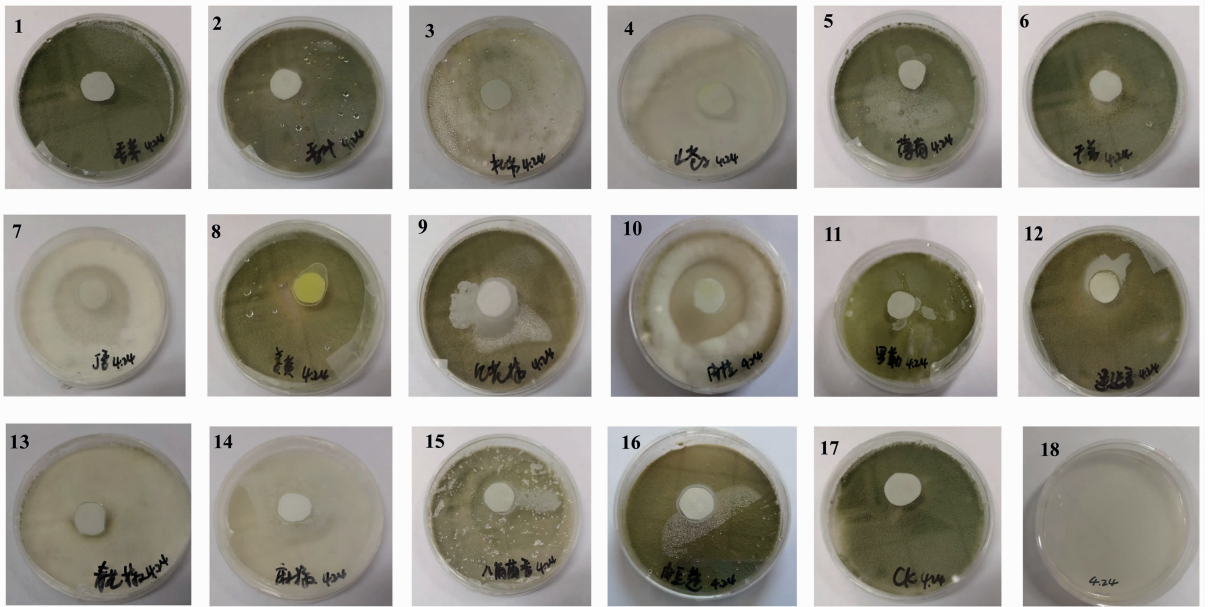
2.1 黄曲霉菌的分离与鉴定

2.1.1 黄曲霉菌的分离 取柏子仁药材约 1.0 g 于 10 mL 无菌离心管中,加入无菌水 5 mL,涡旋均质 5 min,结束后吸取水洗液 500 μL 至 PDA 培养基中,用涂布器涂布均匀。只加入无菌水的作为空白组,每组实验重复 3 次。接种后的平板密封,于 28 °C 黑暗条件下孵育 7 d。取 7 d 后的培养基,采用菌丝顶端纯化法挑取形态学与黄曲霉菌相似的菌落接种至新的 PDA 培养基,密封后于 28 °C 黑暗条件下孵育 7 d。

2.1.2 黄曲霉菌的鉴定 对获得的单一黄曲霉菌株进行形态、显微及 DNA 条形码鉴定。形态学鉴定:菌落生长较快,黄色或黄绿色,表面可见黄色粉末。显微学鉴定:无菌接种环挑取少许黄曲霉菌于

发油的抑菌平板中, 黄曲霉菌菌丝长满整个平板, 肉桂、山苍子、丁香所含挥发油的抑菌平板中则有较为明显的抑菌圈, 而竹叶花椒挥发油的抑菌平板中未见有黄曲霉菌的生长, 见图 3。对每个平板黄曲霉菌菌落径向直径进行测定, 见表 1。结果发

现竹叶花椒、山苍子、肉桂的挥发油对黄曲霉菌生长的抑制效果较好, 分别为 100.00%、76.07%、58.20%, 剩余的挥发油对黄曲霉菌没有显著的抑制作用, 推测原因可能是其对特定的病原菌有着特殊的作用^[8]。



1~18. 香茅、香叶、松节、山苍子、薄荷、干姜、丁香、姜黄、红花椒、肉桂、罗勒、迷迭香、青花椒、竹叶花椒、八角茴香、肉豆蔻、空白组、空板
图 3 16 种挥发油熏蒸黄曲霉菌的平板

Fig. 3 Plates of fumigation of *Aspergillus flavus* with 16 kinds of volatile oils

表 1 16 种挥发油对黄曲霉菌的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activities of 16 kinds of volatile oils against *Aspergillus flavus*

No.	挥发油种类	菌落直径/cm	抑菌率/%
1	香茅	85.07 ± 1.85	2.93
2	香叶	87.6 ± 0.13	0.05
3	松节	87.32 ± 0.28	0.37
4	山苍子	20.97 ± 0.52	76.07
5	薄荷	87.34 ± 0.14	0.34
6	干姜	87.51 ± 0.08	0.15
7	丁香	43.77 ± 0.21	50.05
8	姜黄	80.18 ± 0.46	8.51
9	红花椒	86.39 ± 0.09	1.43
10	肉桂	36.63 ± 0.58	58.20
11	罗勒	87.58 ± 0.06	0.07
12	迷迭香	85.37 ± 3.55	2.60
13	青花椒	79.99 ± 0.92	8.73
14	竹叶花椒	0	100.00
15	八角茴香	41.25 ± 1.59	52.62
16	肉豆蔻	87.58 ± 0.30	0.07
17	空白组	87.64 ± 0.14	0

4 讨论

本研究先对柏子仁药材表面真菌进行分离与培养, 结果发现其表面存在大量黄曲霉菌, 说明目前柏子仁药材黄曲霉菌及其毒素污染严重。然后对 16 种植物挥发油抑制黄曲霉菌生长的效果进行研究, 结果表明竹叶花椒、山苍子及肉桂的挥发油对黄曲霉菌生长的抑制效果较好, 三者的抑菌率分别为 100%、76.07% 和 58.20%, 这与之前研究报道肉桂挥发油^[9]、山苍子挥发油^[10]对中药材黄曲霉菌有较好的抑菌作用一致; 但本研究首次报道竹叶花椒可抑制黄曲霉菌的生长且抑菌率达到了 100%。16 种挥发油的抑菌效果存在一定差异, 其原因可能与 16 种挥发油所含次生代谢产物种类或其含量不同有关, 例如 AKARCA^[11] 研究发现挥发油所含酚类和黄酮类成分通常是其对致病菌有抗菌作用的主要化合物。

综上所述, 竹叶花椒、肉桂及山苍子的挥发油具有较高的抑菌活性, 其中竹叶花椒挥发油具有极为显著的抑菌活性, 且其来自食用植物, 说明挥发油有望成为一种绿色植物源抑菌剂, 将在中药材仓储

中发挥独特的优势。经文献调研后发现,目前很少有关于竹叶花椒挥发油在中药材中抑菌效果的研究,仅仅集中在其药理作用^[12]与栽培工艺^[13-14]方面,本实验不足之处在于未对竹叶花椒挥发油进行成分分析。后续将对竹叶花椒挥发油的成分进行分析,并对其抑菌作用机制进行深入研究。此外,植物挥发油是一类由萜烯类、醛类、酯类、醇类等混合组成的化合物,因此,本课题组将进一步采用混合挥发油抑制黄曲霉菌的生长,以提升其抑菌效果,为解决黄曲霉毒素污染问题提供参考。

[参考文献]

[1] 李婷,胡小松,巩颖,等. 中药材中黄曲霉毒素的防控措施研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(7):228-234.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:22-273.

[3] WANG H W, YANG Z X, YING G Y, et al. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi[J]. Ind Crop Prod, 2018,120:180-186.

[4] 陈建茹,董伟伟,彭娟,等. 储藏条件对柏子仁污染黄曲霉毒素的影响及脱除方法探讨[J]. 中国现代中药,2018,20(6):725-728,733.

[5] SADHASIVAM S, SHAPIRO O H, ZIV C, et al. Synergistic inhibition of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production by combination of pomegranate peel extract and azole fungicide[J]. Front Microbiol, 2019,doi:10.3389/fmicb.2019.01919.

[6] LASRAM S, ZEMNI H, HAMDI Z, et al. Antifungal and anti-aflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L.,

Coriandrum sativum L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus* [J]. Ind Crop Prod,2019,134:11-18.

[7] ARASU M V, VIAYARAGHAVAN P, ILAVENIL S, et al. Essential oil of four medicinal plants and protective properties in plum fruits against the spoilage bacteria and fungi[J]. Ind Crop Prod,2019,133:54-62.

[8] TANG X, SHAO Y L, TANG Y J, et al. Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*) [J]. Molecules,2018,23(9):E2108.

[9] 戴向荣. 肉桂油抑制黄曲霉作用研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2007.

[10] LI Y J, KONG W J, LI M H, et al. *Litsea cubeba* essential oil as the potential natural fumigant: inhibition of *Aspergillus flavus* and AFB₁ production in licorice [J]. Ind Crop Prod,2016,80:186-193.

[11] AKARCA G. Composition and antibacterial effect on food borne pathogens of *Hibiscus sarrattensis* L. calyces essential oil[J]. Ind Crop Prod,2019,137:285-289.

[12] 马捷,李梅,宁莉萍,等. 竹叶花椒枝和叶精油化学成分及其对二磷酸腺苷诱导血小板聚集的影响研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,doi:10.16333/j.1001-6880.2019.9.010.

[13] 王纪辉,侯娜,梁美. 水分胁迫下竹叶花椒的生理响应[J]. 江苏农业学报,2019,35(3):676-681.

[14] 唐海龙,龚伟,王景燕,等. 水肥处理对竹叶花椒土壤养分和微生物的影响[J]. 浙江农林大学学报,2019,36(2):318-325.

[责任编辑 刘德文]