文章编号: 1674-7054(2019)03-0226-05

31种瑶药提取物抑菌活性的筛选

杨若颖¹, 李 婵¹, 叶明亮¹, 张丹阳¹, 冯俊涛^{1,2}, 闫 合^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以烟草青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)为供试菌株, 采用二倍稀释法筛选了31种瑶药提取物的抑菌活性, 并测定了初筛高活性瑶药提取物对烟草青枯菌、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的最低抑菌浓度(MIC)。结果表明: 在500 mg·L⁻¹的质量浓度下, 有18种瑶药提取物表现出显著的抑菌活性; 在100 mg·L⁻¹的质量浓度下, 穿破石、独脚风、贯众等3种瑶药提取物对烟草青枯菌具显著的抑菌活性。穿破石、独脚风、贯众等3种提取物对烟草青枯菌的MIC分别为25, 25, 25 mg·L⁻¹, 对蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的MIC分别为12.5, 50, 50 mg·L⁻¹, 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的MIC分别为50, 25, 50 mg·L⁻¹。

关键词: 抑菌活性; 瑶药; 烟草青枯菌; 蜡状芽孢杆菌; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: S 481⁺.9 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.03.003

植物源农药的主要成分来源于自然, 具有选择性高、低毒、易降解, 害物不易产生抗药性等优点^[1], 从植物中寻找抑菌活性物质, 是研发新型杀菌剂的热点之一。瑶医药是瑶族人民长期与疾病作斗争的智慧结晶, 104味经典老班药中, 很多是治疗细菌感染的药物, 这为新型抑菌活性物质的发现提供了线索。事实上, 虽然国内外对具农药活性植物的筛选一直没有停止, 但针对瑶药的农用活性筛选却少见报道。本研究对我国部分瑶药植物的甲醇提取物进行抑菌活性的筛选, 旨在筛选出具有较高活性抑菌植物, 为开发新型植物源农药奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 烟草青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供; 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)标准菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923 购买自广东省微生物菌种保藏中心。供试瑶药购买自广西省南宁市大福子原生草药店, 并由西北农林科技大学生命学院李琰副教授鉴定。31种瑶药及其科属见表1。分析纯甲醇和分析纯 DMSO 购自四川西陇化工有限公司; 电子天平, ALC-1100.2, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 旋转薄膜蒸发器, R205B 型, 上海申生科技有限公司; 超声波清洗器, KQ-250B, 昆山市超声仪器生产公司; 循环水式多用真空泵, SHB-B95A 型, 郑州长城科工贸易有限公司。

1.2 瑶药样品的提取 采用超声波提取法将阴干的植物材料在40℃下烘干, 粉碎后过40目筛, 放入自封袋中。试验前称取50g的植物干粉, 加入甲醇进行超声波提取, 每次60min, 重复提取3次。过滤后浓缩, 保存于4℃冰箱内待用。

收稿日期: 2019-06-28

基金项目: “十三五”国家重点研发计划, 作物免疫调控与物理防控技术及产品研发(2017YFD0200900)

作者简介: 杨若颖(1998-), 女, 西北农林科技大学植保学院2016级本科生. E-mail: 15029670901@163.com

通信作者: 闫合(1983-), 男, 副教授. 研究方向: 农药学. E-mail: yh-run@163.com

1.3 培养基配制方法 室内生测用于活化细菌性病原菌菌株的液体培养液(LB培养基): 称取胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化钠 3 g, 加水定容至 1 L, 灭菌锅灭菌待用。

1.4 药剂配制 采用对供试病菌没有抑菌作用的二甲基亚砷作为溶剂, 将供试瑶药提取物溶解。用二甲基亚砷-水溶液将各瑶药提取物按其有效成分含量溶解稀释成 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 药液(作为母液备用)。

1.5 供试菌种的准备 将供试菌种在试验前 1 d 转接到 LB 培养液中, 置于 28°C 恒温摇床箱中活化 12 h。

1.6 室内抑菌活性筛选和最低抑菌浓度(MIC)测定方法 采用二倍稀释法对瑶药提取物进行室内抑菌活性筛选和最低抑菌浓度(MIC)测定^[2]。测定方法: (1) 室内抑菌活性筛选方法: 实验操作在 96 孔板上进行, 每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 稀释后细菌数量达 $10^4\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试菌悬液与 $50\ \mu\text{L}$ 质量浓度为 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 药液, 使药液最终浓度为 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 24 h 后观察结果; 再进一步将母液稀释为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 药液, 实验操作方法同上, 使药液最终浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 24 h 后观察结果; (2) 最低抑菌浓度(MIC)测定方法: 取编号为 1~5 的试管以及适量的蒸馏水, 放入灭菌锅里灭菌待用。灭菌完成后, 除 1 号试管加入 4 mL 无菌水外, 其余试管均加入 2 mL 无菌水。将 1 mL 配制好的质量浓度为 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液加入 1 号试管中, 混合均匀后, 将混合后的药液取 2 mL 加入到 2 号试管中, 以此操作至 5 号试管为止。使药液浓度稀释为 200, 100, 50, 25, 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 共 5 个浓度。在 96 孔板上每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 稀释后细菌数量达 $10^4\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试菌悬液与 $50\ \mu\text{L}$ 药液, 使药液最终浓度为 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 以硫酸链霉素作为对照药剂。培养 24 h 后, 通过肉眼比对发现微孔内液体澄清透明经震荡后仍无沉淀产生, 则此微孔对应的药液浓度即为此提取物对待测病菌的 MIC 值。

2 结果与分析

2.1 31种瑶药提取物对烟草青枯菌的室内抑菌活性筛选 采用二倍稀释法在 500, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 测定了 31 种瑶药植物的甲醇提取物对烟草青枯菌的抑菌活性实验, 结果表明: 在 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下有 18 种瑶药提取物表现出显著的抑菌活性, 在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质量浓度下有 3 种瑶药提取物表现出显著的抑菌活性(表 1)。

表 1 供试瑶药对烟草青枯的初筛活性

Tab. 1 Primary screening of antibacterial activity of Yao medicinal plants against *Ralstonia solanacearum*

样品 Plants	科名 Family	属名 Genus	拉丁名 Latin name	抑菌活性/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Inhibitory activity	
				500	100
破骨风	木犀科	素馨属	<i>Jasminum lanceolarium</i>	+	-
白钻	五味子科	南五味子属	<i>Schisandra henryi</i>	+	-
山八角	八角科	八角属	<i>Illicium simonsii</i>	+	-
来角风	姜科	山姜属	<i>Alpinia japonica</i>	+	-
六耳铃	菊科	艾纳香属	<i>Blumea laciniata</i>	+	-
藤三七	落葵科	落葵薯属	<i>Anredera cordifolia</i>	+	-
贯众	鳞毛蕨科	鳞毛蕨属	<i>Dryopteris setosa</i>	+	+
追骨风	桑科	榕属	<i>Ficus pumila</i>	+	-
广狼毒	天南星科	海芋属	<i>Alocasia odora</i>	-	-
金线草	蔷薇科	委陵菜属	<i>Potentilla discolor</i>	+	-
草苈蓉	列当科	草苈蓉属	<i>Orobanchae coerulea</i>	-	-
毛老虎	杜鹃花科	杜鹃花属	<i>Rhododendron molle</i>	-	-
天星草	报春花科	点地梅属	<i>Androsace umbellata</i>	+	-

续表 1 Continued Tab. 1

样品 Plants	科名 Family	属名 Genus	拉丁名 Latin name	抑菌活性/(mg · L ⁻¹) Inhibitory activity	
				500	100
红药子	蓼科	翼蓼属	<i>Pteroxygonum giraldii</i>	-	-
独脚风	藤黄科	红厚壳属	<i>Calophyllum membranaceum</i>	+	+
八百厘	大戟科	巴豆属	<i>Croton tiglium</i>	-	-
穿破石	桑科	柘属	<i>Cudrania cochin</i>	+	+
六月雪	茜草科	白马骨属	<i>Serissa japonica</i>	-	-
苏铁树叶	苏铁科	苏铁属	<i>Cycas revoluta</i>	-	-
定心菜	豆科	猪屎豆属	<i>Crotalaria assamica</i>	-	-
入山虎	芸香科	花椒属	<i>Zanthoxylum nitidum</i>	-	-
红九牛	夹竹桃科	杜仲藤属	<i>Urceola huaitingii</i>	-	-
冬凌草	唇形科	香茶菜属	<i>Isodon rubescens</i>	+	-
味草	唇形科	筋骨草属	<i>Ajuga nipponensis</i>	+	-
十大功劳	小檗科	十大功劳属	<i>Mahonia fortunei</i>	+	-
大接骨风	爵床科	驳骨草属	<i>Gendarussa ventricosa</i>	-	-
木芙蓉叶	锦葵科	木槿属	<i>Hibiscus mutabilis</i>	+	-
曼陀罗果	茄科	曼陀罗属	<i>Datura stramonium</i>	+	-
上山虎	海桐花科	海桐花属	<i>Pittosporum illicioides</i>	+	-
小叶金不换	爵床科	驳骨草属	<i>Justicia gendarussa</i>	-	-
通光散	萝藦科	牛奶菜属	<i>Marsdenia tenacissima</i>	-	-

注: 1. 对烟草青枯菌的活性测定采用二倍稀释法; 2. “抑菌活性”列, 标注“+”和“-”分别表示该样品“具显著抑菌活性”和“无显著抑菌活性”

Note: The activity of *Ralstonia solanacearum* was assayed by double dilution method; the ‘+’ and ‘-’ in the column of inhibitory activity indicate significant inhibitory activity and no significant inhibitory activity, respectively.

2.2 抑菌活性显著的瑶药提取物的 MIC 测定结果 采用二倍稀释法对穿破石、独脚风、贯众等 3 种瑶药提取物进行最低抑菌浓度测定(表 2)。结果表明: 3 种瑶药提取物对烟草青枯菌、蜡状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均有显著的抑制效果。3 种瑶药提取物对烟草青枯菌的 MIC 分别为 25, 25, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对蜡状芽孢杆菌的 MIC 分别为 12.5, 50, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 50, 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 3 种瑶药提取物对烟草青枯菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 测定结果

Tab. 2 Assay of MIC of extracts of three species of Yao medicinal plants against *R. solanacearum*, *B. cereus*, *S. aureus*

瑶药/(mg · L ⁻¹) Yao medicinal plant	抑菌活性 Antimicrobial activity/(mg · L ⁻¹)		
	烟草青枯菌 <i>R. solanacearum</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
100	-	-	-
50	-	-	-
穿破石 <i>Cudrania cochin</i>	25	-	+
12.5	+	-	+
6.25	+	+	+
MIC	25	12.5	50

续表2 Continued Tab.2

瑶药/(mg·L ⁻¹) Yao medicinal plant	抑菌活性 Antimicrobial activity/(mg·L ⁻¹)		
	烟草青枯菌 <i>R. solanacearum</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
独脚风 <i>Calophyllum membranaceum</i>	100	-	-
	50	-	-
	25	-	+
	12.5	+	+
	6.25	+	+
	MIC	25	50
贯众 <i>Dryopteris setosa</i>	100	-	-
	50	-	-
	25	-	+
	12.5	+	+
	6.25	+	+
	MIC	25	50
硫酸链霉素 <i>Streptomycin sulphate</i>	100		
	50		
	25		
	12.5		
	MIC	7.50	9.80
		11.40	

注: 1. “-”表示无细菌生长, 培养液澄清透明无沉淀; 2. “+”表示有细菌生长, 培养液浑浊有沉淀

Note “-” indicates no bacterial growth, and the culture solution was clear, translucent and contained n precipitation “+” indicates bacterial growth and the culture solution was not clear and contained precipitations.

3 讨论

我国对具农药活性植物的筛选, 一般是参考《本草纲目》等古籍和《中国土农药志》《中国有毒植物》等专著及在生产中人们使用的土农药^[3]。前期, 国内多位学者对我国陕、甘、青、新、宁、苏、粤、桂、鄂、闽、川、黔等地区的2000多种野生植物或中草药进行了农用活性的筛选, 发现了砂地柏、牛心朴子、掌叶千里光、辛夷、广陈皮、博落回等多种植物具有较好的杀虫活性; 茄科、百部科、藜科、马钱科、豆科、菊科、仙茅科、玄参科、芸香科、天南星科、姜科、唇形科、菊科、桔梗科、忍冬科、伞形科、蓼科、大戟科等植物的杀虫活性值得深入研究; 豆科、禾本科、菊科、伞形科、十字花科、马兜铃科、唇形科、葫芦科、蓼科、木兰科、百合科、木犀科、莎草科和樟科等植物的杀菌活性具开发应用前景。近10余年来, 国内学者筛选的范围进一步扩大, 同时更加注重对植物源物质特殊生物活性的发现^[4]。

瑶族是我国少数民族之一, 在广西生活的瑶族占全国瑶族总人口60%以上, 大多聚居在金秀、巴马、都安、大化、富川和恭城等6个瑶族自治县内。瑶族人民在长期的生活实践中总结出一套有效的防病、治病经验, 其方法简单实用, 疗效确切。瑶医药是瑶族人民长期与疾病作斗争的智慧结晶, 具有鲜明的民族特色, 瑶族医药历来靠口传心授、代代相传而得以传承。在各级政府和诸多瑶医药专家共同努力下《瑶医效方选编》《中国瑶医学》《实用瑶医学》《中国现代瑶药》等著作先后出版, 标志瑶医药的理论体系初步形成^[5]。由于瑶族生活区域湿热的气候特点, 使瑶药具有不同于北方中医药系统的特色。104味经典老班药中, 大多数为治疗细菌感染的药物, 而这可以给杀菌剂的发现提供重要的线索。因此, 本研究针对瑶药开展抑菌农用活性筛选, 采用二倍稀释法筛选了31种瑶药提取物的抑菌活性, 并测定了初筛高活性瑶

药提取物对烟草青枯菌、蜡状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度。结果表明,穿破石、独脚风、贯众3种瑶药提取物均具有显著抑制烟草青枯菌、蜡状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等3种植物病原细菌的活性。

有研究表明,穿破石根提取物对梨锈病菌、稻瘟病菌、水稻纹枯病菌以及玉米炭疽病菌有很高的抑菌活性^[6],绵马贯众醇提液和水提液对金黄色葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、肺炎链球菌、白喉杆菌等革兰氏阳性菌有较强的抑制作用^[7]。由此可见,穿破石、贯众有多种抑菌活性,然而独脚风的抑菌活性却少见报道。因此,穿破石、独脚风、贯众这3种瑶药有开发为新型植物源杀细菌剂的潜力,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 何军,马志卿,张兴. 植物源农药概述[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,27(9):79-85.
- [2] 谢娜,李超,冯俊涛,等. 11种植物提取物对4种病原细菌的抑菌活性筛选[J]. 热带作物学报,2018,39(6):1166-1171.
- [3] 张兴,马志卿,冯俊涛,等. 植物源农药研究进展[J]. 中国生物防治学报,2015,31(5):685-698.
- [4] 张兴,吴志凤,李威,等. 植物源农药研发与应用新进展——特殊生物活性简介[J]. 农药科学与管理,2013,34(4):24-31.
- [5] 范建华,谢唐贵,曹斌,等. 广西瑶医药研究现状及发展对策[J]. 中国中医药图书情报杂志,2015,39(3):5-7.
- [6] 玉艳珍,邓业成,覃旭,等. 穿破石抑菌活性初步研究[J]. 农药,2009,48(3):224-226.
- [7] 罗海华,潘实清,刘长秀. 贯众提取液对革兰氏阳性球菌的抑菌作用[J]. 热带医学杂志,2003,3(2):169-171.

Screening of Antibacterial Activities of Extracts of 31 Species of Yao Medicinal Plants

Yang Ruoying, Li Chan, Ye Mingliang, Zhang Danyang, Yan He

(1. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Research & Development Center of Biorational Pesticides, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: With *Ralstonia solanacearum* as a test strain, antibacterial activities of extracts from 31 species of Yao medicinal plants were screened by double dilution method, and the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the extracts with high inhibitory activity against *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were determined. The results showed that extracts from 18 species of Yao medicinal plants showed significant antibacterial activity at the concentration of $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Further test showed that the extracts from three species of the Yao medicinal plants, such as *Cudrania cochinchinensis*, *Calophyllum membranaceum* and *Dryopteris setosissima*, had significant bacteriostatic activity against *R. solanacearum* at the concentration of $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. The MICs for these three species were $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, against *R. solanacearum*, $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, against *Bacillus cereus*, and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: antibacterial activity; Yao medicinal plants; *Ralstonia solanacearum*

(责任编辑:叶静)