

铁树种子提取物的抑菌活性

袁素素, 秦武洒, 张耀, 张玮玮, 叶秀娟* (福建农林大学, 福建福州 350002)

摘要 [目的]研究铁树种子提取物的抑菌活性。[方法]采用纸片扩散法、牛津杯法、琼脂稀释法和荧光染色法, 研究提取物抑菌活性。[结果]提取物具有光谱抗菌活性, 对禾谷镰刀菌的 IC_{50} 为 1.65 mg/mL, 对其分生孢子的 IC_{50} 为 2.93 mg/mL, 改变禾谷镰刀菌菌丝尖端几丁质的量和线粒体内膜负电性。[结论]提取物具有较好的抑菌活性。

关键词 苏铁; 种子提取物; 病原菌; 抑菌活性

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)31-0012-03

Antibacterial Activity of Water Extracts of *Cycas siamensis* Seeds

YUAN Su-su, QIN Wu-sa, ZHANG Yao, YE Xiu-juan* et al (Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract [Objective] The aim was to study antibacterial activity of extract of *Cycas siamensis* seed. [Method] The antibacterial activity of extract of *Cycas siamensis* seed was studied by filter paper method, agar dilution method and fluorescent staining method. [Result] The extract had a broad-spectrum antibacterial activity, and the IC_{50} of *Fusarium graminearum* and spores were 1.65 and 2.93 mg/mL. The extracts changed hypha chitin and mitochondrial membrane potential. [Conclusion] The extract has stronger antibacterial activity.

Key words *Cycas siamensis*; Seed extracts; Pathogenic bacteria; Antibacterial activity

苏铁(*Cycas siamensis*), 在我国又名莎树或欏木, 是距今 2 亿年前地质历史时期的裸子植物^[1]。苏铁茎秆高大, 供人采食淀粉, 但多食有害^[2], 常作为药用本草, 又名继之、铁蕉、凤蕉、凤尾蕉(松)等。苏铁广泛分布于全球热带、亚热带地区, 我国分布 1 属 10 种, 其中 5 种已经被林业部列为国家级濒危保护植物^[1]。目前, 苏铁植物常作为园林和庭院观赏树种^[3], 苏铁的种子可药用^[4]。笔者研究了铁树种子提取物的抑菌活性, 旨在为保护和利用苏铁植物提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料 10 种供试菌: 小白菜炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)、烟草炭疽病菌(*Colletotrichum nicotianae*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*)、芭乐炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、苹果黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)、凸脐蠕孢菌(*Exserohilum monoceras*)、落花生球腔菌(*Mycosphaerella arachidicola*), 均由福建农林大学教育部重点实验室提供。

23 种人体肠道病原细菌: ATCC10987 蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), ATCC29212 粪肠球菌(*Enterococcus faecali*), ATCC27270 屎肠球菌(*Enterococcus faecium*), CMCC26069 表皮葡萄球菌(*Staphylococcus*), ATCC29521 两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*), ATCC11774 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), ATCC1911、CMCC54004 单核增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*), CMCC(B)28001 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*), ATCC29213 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), ATCC25944 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*), ATCC10536、ATCC8739、ATCC25922、O157: H7、K7 大肠杆菌(*Escherichia coli*), CMCC(B)49005 奇异变形杆菌(*Micrococcus luteus*),

ATCC9027 铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*), ATCC12076 沙门氏菌(*Salmonella*), ATCC12022 福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*), CMCC51252 痢疾志贺氏菌, ATCC17202 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), CMCC(B)52204 小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*), 均由福建福州市疾病预防控制中心提供。

铁树种子采自福建农林大学校园, 去除种皮, 洗净, 晾干备用。

1.2 方 法

1.2.1 提取物的提取。 100 g 铁树种子加入 400 mL 水进行匀浆, 4 ℃ 过夜, 8 000 r/min 离心 30 min, 浸提 2 次, 收集上清液冷冻干燥, 得提取物干粉备用。

1.2.2 抗真菌活性检测。 采用纸片扩散法, 将 10 种植物病原真菌接种于培养皿中, 28 ℃ 恒温培养, 待真菌生长的圆面直径为 3 cm 时, 将已灭菌的滤纸圆片置于距菌边缘 0.5 cm 处, 在滤纸片上加入 15 μL 提取物溶液, 以无菌水为对照, 继续培养至菌丝长至滤纸片边缘时, 观察有无抑菌结果。

1.2.3 抗细菌活性检测。 采用牛津杯法, 将 50 μL 细菌溶液加入含有 5 mL 脑心浸液肉汤(BHI)液体培养基的试管中, 37 ℃、150 r/min 活化 12 h 后备用。加热 100 mL 1.5% BHI 固体培养基, 倒入 10~12 个培养皿(90 mm × 15 mm)中冷凝。将 100 μL 活化细菌溶液加入 20 mL 温度为 45~50 ℃ 的 0.7% BHI 固体培养基中并混匀, 细菌浓度约为 1×10^8 CFU/mL, 倒入含有 5 个牛津杯的水平平板中冷凝, 然后拔出牛津杯。1 孔加入 50 μL 1 mg/mL 制真菌素为阳性对照, 1 孔加入 50 μL 无菌水为阴性对照, 3 孔加入粗提液, 4 ℃ 冰箱过夜后, 置于 37 ℃ 恒温培养箱中 6~12 h, 观察有无抑菌活性。

1.2.4 禾谷镰刀菌的半抑制浓度(IC_{50})测定。 采用琼脂平板稀释法, 准确称量待测样品, 用无菌水配成不同浓度溶液, 过 0.22 μm 的滤头除菌。加热融化 0.7% 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基, 待冷却至 40~50 ℃ 时, 分别吸取 0.5 mL 上

作者简介 袁素素(1988—), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学和农药学。* 通讯作者, 教授, 从事药理学和活性蛋白研究。

收稿日期 2017-08-24

述样品溶液和无菌水分别与 1.5 mL 0.7% PDA 培养基于培养皿(30 mm × 15 mm)中混匀。取直径 6 mm 禾谷镰刀菌菌饼置于平皿中心位置,28 °C 恒温培养至对照组真菌长至平皿边缘时,用十字交叉法测量真菌的生长直径并计算提取物对禾谷镰刀菌的 IC₅₀,每个处理 3 个重复。运用 SPSS 统计学软件对试验数据进行单因素方差分析和 Probit 回归分析,计算 IC₅₀。

$$\text{菌丝生长抑制率} = (\text{对照组菌丝生长面积} - \text{处理组菌丝生长面积}) / \text{对照组菌丝生长面积} \times 100\%$$

1.2.5 抗禾谷镰刀菌分生孢子萌发活性测定。

1.2.5.1 禾谷镰刀菌分生孢子制备。将禾谷镰刀菌接种于羧甲基纤维素钠(CMC)液体培养基中,28 °C、150 r/min 条件下摇床培养 4~5 d,过滤取孢子,用无菌水将孢子稀释成约 1 × 10⁶ CFU/mL,将等体积的 0.05% 葡萄糖溶液与孢子溶液混合备用。

1.2.5.2 禾谷镰刀菌分生孢子的 IC₅₀测定。采用凹玻片法,准确称量待测样品,用无菌水配成不同浓度的样品溶液,过 0.22 μm 滤头除菌。处理组为 20 μL 样品溶液与 20 μL 上述孢子悬浮液混匀,对照组为 20 μL 无菌水与 20 μL 的上述孢子悬浮液混匀。加于凹玻片中央,并置于有 2 层无菌水浸湿滤纸片的培养皿(90 mm × 15 mm)中,28 °C 恒温保湿培养至对照组孢子萌发率在 90% 以上时,用光学显微镜观察并记录各组孢子的萌发情况,每个处理至少观察 300 个孢子,每个处理 3 次重复。运用 SPSS 统计学软件对试验数据进行单因素方差分析和 Probit 回归分析,计算 IC₅₀。

$$\text{分生孢子萌发率} = \text{分生孢子萌发数} / \text{观察分生孢子数} \times 100\%$$

$$\text{分生孢子萌发抑制率} = (\text{对照组分生孢子萌发率} - \text{处理组分生孢子萌发率}) / \text{对照组萌发率} \times 100\%$$

1.2.6 荧光染色试验。将禾谷镰刀菌接种于马铃薯葡萄糖(PD)水培养基中,28 °C、150 r/min 条件下摇床培养 24 h。吸取含有菌丝的 PD 水培养基与等量含有提取物溶液混合,提取物终浓度为 8.7 mg/mL,对照组为 PBS 缓冲液,继续培养过夜。用刚果红染料和罗丹明染液分别处理对照组和样品组。刚果红黑暗条件下染色 1 h,罗丹明染色 30 min,多余的染液用 PBS 缓冲液清洗,制作玻片,共聚焦显微镜和荧光显微镜观察并拍照。

1.2.7 提取物稳定性试验。

1.2.7.1 pH 稳定性。称取 1 mg 提取物溶于 200 μL 无菌水中。分别吸取 10 μL 提取物溶液和 90 μL pH 为 2、3、4、5、6、8、9、10、11、12 的缓冲液,混匀,静置 30 min,以苹果黑腐皮壳菌为指示菌,用纸片扩散法检测有无抑菌活性。

1.2.7.2 存放时间稳定性。称取 5 mg 提取物溶于 1 mL 无菌水中。分别取 100 μL 铁树果提取物溶液于 6 个 1.5 mL 离心管中,在 20 °C 恒温下密封保存,并每隔 3 d 取 1 管置于 -20 °C 下保存备用,以苹果黑腐皮壳菌为指示菌,用纸片扩散法检测有无抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 铁树种子提取物的抗真菌活性 由图 1 可知,铁树果提取物对尖孢镰刀菌、苹果黑腐皮壳菌、禾谷镰刀菌、茄病镰刀菌和小白菜炭疽病菌 5 种植物病原真菌具有抑制活性,并且对禾谷镰刀菌的抑菌活性较强。

2.2 禾谷镰刀菌的 IC₅₀ 禾谷镰刀菌的 IC₅₀检测结果(图 2)表明,随着铁树提取物和百菌清浓度的升高,对禾谷镰刀

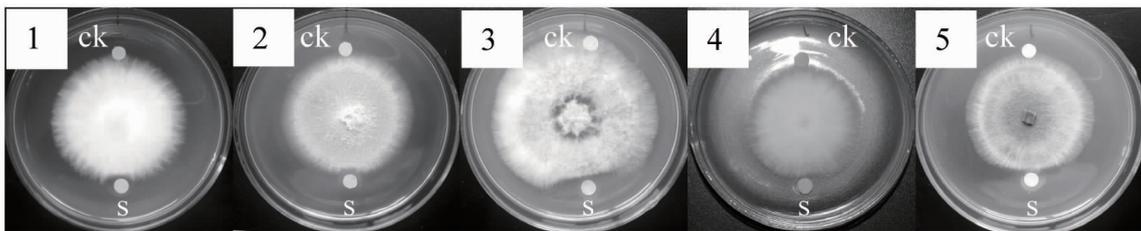


图 1 提取物抗植物病原真菌结果

Fig. 1 The inhibition of extract of *Cycas siamensis* seed to plant pathogens

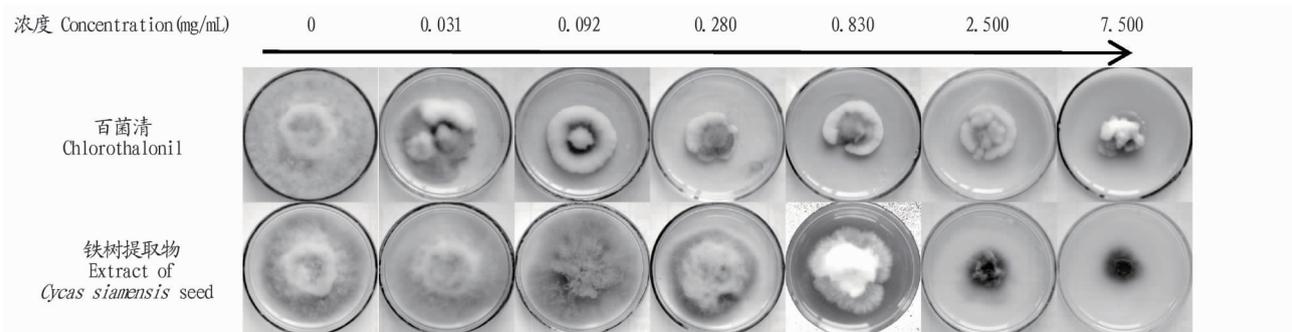


图 2 禾谷镰刀菌的 IC₅₀

Fig. 2 The IC₅₀ to *Fusarium graminearum*

菌的抑制作用随之加强。由表 1 可知,提取物对禾谷镰刀菌的 IC₅₀ 为 1.650 0 mg/mL,百菌清对禾谷镰刀菌的 IC₅₀ 为

0.004 7 mg/mL,可见,提取物对禾谷镰刀菌的抑制效果较百菌清弱。

表 1 用回归方程求禾谷镰刀菌的 IC₅₀

Table 1 The IC₅₀ values to *Fusarium graminearum*

样品 Samples	Probit 回归方程 Probit regression equation	置信区间 Confidence interval // mg/mL	IC ₅₀ mg/mL
铁树提取物 Extract of <i>Cycas siamensis</i> seed	Probit(p) = -0.214 + 0.980x	0.94 ~ 2.97	1.650 0
百菌清 Chlorothalonil	Probit(p) = 0.726 + 0.312x	0.00 ~ 0.02	0.004 7

2.3 禾谷镰刀菌分生孢子的 IC₅₀ 提取物对禾谷镰刀菌分生孢子具有抑制活性,进而检测提取物对禾谷镰刀菌孢子的 IC₅₀。由图 3 可知,在提取物浓度为 0.23 mg/mL 时,对禾谷镰刀菌孢子的萌发反而有促进作用,之后随着提取物浓度的增大,对禾谷镰刀菌孢子的抑制活性增强。运用 SPSS 软件对数据进行进一步处理,得到提取物对禾谷镰刀菌分生孢子的 Probit 回归方程为: Probit(p) = 0.741 + 1.585x, IC₅₀ 为 2.93 mg/mL。

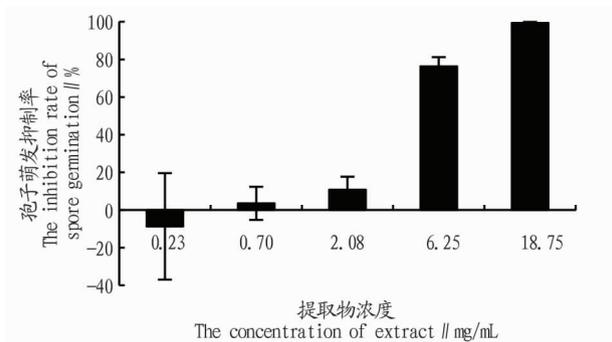
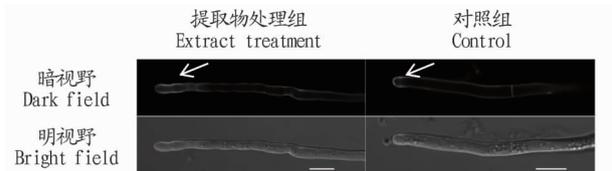


图 3 禾谷镰刀菌分生孢子的 IC₅₀

Fig.3 The IC₅₀ to spores of *Fusarium graminearum*

2.4 荧光染色试验结果 刚果红染色试验中,通过观察图 4 中箭头指示菌丝尖端染色情况,提取物处理组的禾谷镰刀菌菌丝尖端有明显红色荧光,荧光强度强于对照组。在荧光绿染色试验结果(图 5)中,提取物处理组荧光强度明显强于对照组,因此推测提取物在作用于禾谷镰刀菌时,使菌丝尖端几丁质的量和线粒体内膜的电负性发生变化,对禾谷镰刀菌的生长产生不利影响。



注:箭头指示尖端;比例尺长度为 10 μm

Note:The arrows indicate hyphal tip;Scale bar indicates 10 μm

图 4 禾谷镰刀菌菌丝尖端刚果红染色电镜结果

Fig.4 Confocal microscope images of hyphal tip in *Fusarium graminearum* stained with Congo red

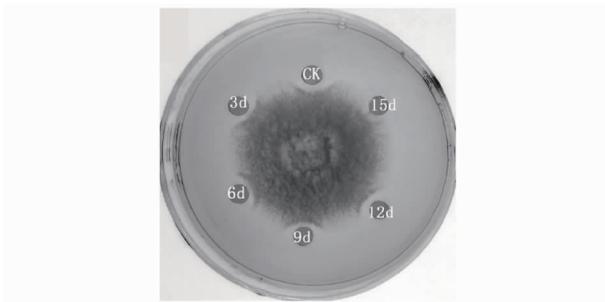
2.5 提取物稳定性检测 以苹果黑腐皮壳菌作为指示菌,检测提取物的稳定性。由图 6 可知,提取物 20 °C 放置 12 d 时具有抑制真菌的活性,放置 15 d 时抑菌活性丧失。由图 7 可知,在不同 pH(pH 2 ~ 12)处理后,提取物对真菌仍具有抑



图 5 禾谷镰刀菌菌丝荧光绿染色显微镜结果

Fig.5 Microscope images of *Fusarium graminearum* stained with SYTOX Green

制活性。试验结果表明,提取物具有耐酸碱、易于贮存的特性。

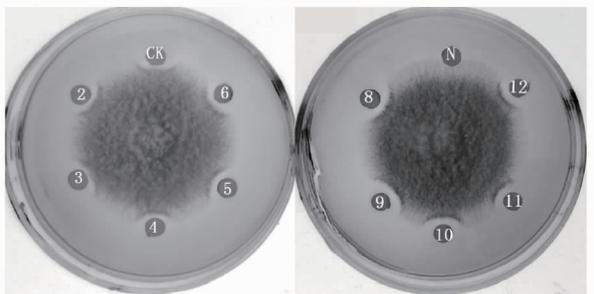


注:CK. PBS

Note:CK. PBS

图 6 铁树种子提取物的时间稳定性

Fig.6 Time stability of extract of *Cycas siamensis* seed



注:CK. PBS;N. 提取物;2 ~ 12. 相应的 pH

Note:CK. PBS;N. Extract;2 ~ 12. Corresponding pH

图 7 铁树种子提取物的 pH 稳定性

Fig.7 pH stability of extract of *Cycas siamensis* seed

2.6 抗人体肠道病原细菌活性 采用牛津杯法检测提取物对人体肠道病原细菌的抑制活性。结果表明,铁树种子提取物对 5 种大肠杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌具有抑制活性。

丙基甲醇(3.89%)、丁酸酐(2.56%)和邻苯二酚(2.94%)。酚类物质中,愈创木酚、4-甲基愈创木酚、苯酚等酚类物质与辐射松木醋液^[18]酚类物质组成含量有区别,说明木醋液成分差异来源于木醋液原料及生产工艺。

对分离鉴定出的 97 种化学成分进行归类分析,其中醇类物质 11 种(15.11%),醛类物质 8 种(3.41%),酯类物质 12 种(3.99%),酸类物质 11 种(33.19%),酚类物质 14 种(11.72%),酮类物质 30 种(23.72%),含氮化合物 6 种(0.80%),其他化合物 5 种(1.41%)。稻壳木醋液中酮类组分最多达 30 种,其中 1-羟基-2-丙酮含量(10.11%)最高,高温裂解过程中,纤维素缩醛结构的开环和环内 C—C 键的断裂是形成 1-羟基-2-丙酮的主要原因。有机酸类物质 11 种,含量为 33.19%,且随分子量增大而递减。醋酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸,可为黏膜上皮细胞提供能源,具有促进水、钠吸收,刺激结肠上皮细胞增殖和黏膜生长,增加肠系膜血流和胃肠激素分泌等生理作用^[19]。饲料中适当添加有机酸可降低饲料 pH,起到杀菌、消毒作用;有机酸可刺激动物味蕾起到诱食剂的作用,同时可增进消化酶活性,延缓胃排空速度,促进营养物质吸收利用;有机酸可降低肠道 pH,抑制有害菌,促进乳酸菌等有益菌生长,提高机体抗病能力,增强免疫力。尽管木醋液用于家畜饲料添加剂取得良好效果,但是粗木醋液中甲醇、苯酚、甲酚等物质会影响饲料的安全性,醛类、吡啶类含氮化合物具有的特殊气味影响牲畜的采食性。开发饲料酸化剂应根据木醋液成分组成对粗木醋液进行精制。

3 结论

采用 RTX-WAX 极性石英毛细管柱对稻壳木醋液中有有机成分进行分离,经 MS 鉴定,主要成分为甲醇(6.68%)、1-羟基-2-丙酮(10.11%)、1-羟基-2-丁酮(2.28%)、乙酸(26.72%)、丙酸(1.85%)、糠醇(2.54%)、环丙基甲醇(3.89%)、丁酸酐(2.56%)和邻苯二酚(2.94%)。

(上接第 14 页)

3 结论与讨论

苏铁作为观赏植物,在园林中应用较多,研究多集中于铁树的栽培和管理^[5],铁树的种子常用于育苗^[6]。铁树种子作为中药,具有广谱抗菌活性,对多种植物病原真菌和人体肠道病原细菌都具有抑制活性。陶文琴等^[7]研究表明,苏铁蕨的根状茎水提液[1 g(生药)/mL]对表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌有较强的抑制活性。在铁树种子中分离得到 3 种抗菌肽,能抑制尖孢镰刀菌和白地霉 2 种植物病原真菌,以及马铃薯腐病菌、萎蔫短小杆菌和发根农杆菌等植物病原细菌的生长^[8]。此外,人们也发现种子中存在具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的蛋白^[9]和 V 型几丁质酶^[10]。综上,铁树种子中存在多种活性物质,进一步拓宽了铁树的潜在应用价值,值得进一步研究和挖掘。

参考文献

[1] 林鸿荣. 苏铁植物名实考[J]. 四川林业科技, 1995, 16(4): 55-61.

吉林省水稻种植广泛,稻壳资源丰富。以稻壳为原料生产生物质炭及可燃气体,为生物质资源综合利用提供了可行方法,对其生产过程中副产烟气冷凝液——稻壳木醋液化学成分的研究为稻壳资源深度综合利用提供了参考。

参考文献

- [1] 刘晓庚,唐瑜,袁磊,等. 用稻壳制备超级活性炭的研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(9): 1-6, 12.
- [2] 吴彬,马正智,周伟,等. 从稻壳中提取制备低聚木糖研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2009(S1): 94-100.
- [3] 李赢,石刚,张梁,等. 高效利用稻壳联产木糖、多孔炭和二氧化硅[J]. 高等学校化学学报, 2015, 36(8): 1461-1466.
- [4] 阮榕生,姚远,王允圃,等. 微波辅助定向裂解稻壳炼制糠醛及醋酸的研究[J]. 现代化工, 2013, 33(5): 66-68.
- [5] 黄娇,方润,刘小梅,等. 有机溶剂型木质素提取方法探索[J]. 化学工程与装备, 2009(5): 16-20.
- [6] 于加平,李一卓. 稻壳中绿原酸的提取及含量测定[J]. 湖北农业科学, 2019, 48(2): 445-447.
- [7] 蔡碧琼,蔡珠玉,张福娣,等. 稻壳中黄酮提取物的抗氧化性质研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(4): 813-818.
- [8] 孔丝纺,姚兴成,张江勇,等. 生物炭的特性及其应用的研究进展[J]. 生态环境学报, 2015, 24(4): 716-723.
- [9] 侯婉桐,孟祥焘,聂胜强,等. 稻壳制备生物质炭对水中六价铬的吸附特性研究[J]. 台州学院学报, 2013, 35(6): 29-36.
- [10] 杜江江,蒋恩臣,王明峰,等. 稻壳炭对土壤理化特性及芥菜生长的影响[J]. 土壤, 2016, 48(6): 1159-1165.
- [11] 蔚芹,马希汉,朱卫红,等. 不同温度段苹果枝木醋液化学组成、抑菌及抗氧化活性比较[J]. 林业科学, 2009, 45(12): 16-21.
- [12] 周传余,郎英,周超. 木醋液在番茄上的应用效果研究[J]. 黑龙江农业科学, 2011(3): 47-49.
- [13] 普少瑕,崔宇,李春梅. 竹醋液的功能及其在动物生产中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(4): 122-125.
- [14] 赵怀宝,任玉龙. 短链脂肪酸在动物体内的生理特点和功能[J]. 饲料研究, 2016(3): 29-32.
- [15] 平安,杨国亭,于学军. 木醋液在农业上的应用研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(19): 244-247.
- [16] 孔祥霞,郭均友,单晓飞. 木醋液与抗生素对育肥猪肉品质的影响[J]. 山东畜牧兽医, 2015, 36(2): 3-5.
- [17] 韩杰,张飞,杜立彪,等. 生物炭和木醋混合物对断奶仔猪生长性能和血液生化指标的影响[J]. 现代畜牧兽医, 2014(10): 17-20.
- [18] 陈萍,朱洪吉,王建刚. 辐射松木醋液化学成分气相色谱质谱分析[J]. 山东化工, 2015, 44(21): 68-70.
- [19] 许运杰,方热军,戴求仲. 短链脂肪酸的营养生理作用[J]. 饲料研究, 2007(8): 26-28.

- [2] 潘春记,徐芸锋,潘雷灵,等. 铁树果急性中毒 38 例临床分析[J]. 中国当代医药, 2014, 21(6): 158-159.
- [3] 陈少萍. 朱蕉栽培管理[J]. 中国花卉园艺, 2015(6): 27-29.
- [4] 赖维远,孙皓. 铁树果中毒 30 例临床分析[J]. 现代临床医学, 2010, 36(2): 141-141.
- [5] 董帅敏,王娅蕾,付芸蕊,等. 铁树栽培管理技术要点[J]. 现代园艺, 2014(15): 73-74.
- [6] 罗益群. 铁树的人工授粉和种子繁殖实验[J]. 生物学通报, 2011, 46(11): 52-54.
- [7] 陶文琴,雷晓燕,麦旭峰,等. 4 种中药贯众原植物提取物的体外抗菌活性研究[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(4): 412-416.
- [8] YOKOYAMA S, KATO K, KOBA A, et al. Purification, characterization, and sequencing of antimicrobial peptides, Cy-AMPI, Cy-AMP2, and Cy-AMP3, from the Cycad (*Cycas revoluta*) seeds[J]. Peptides, 2008, 29(12): 2110-2117.
- [9] KONAREV A V, LOVEGROVE A, SHEWRY P R. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamensis* and other gymnosperms[J]. Phytochemistry, 2008, 69(13): 2482-2489.
- [10] TAIRA T, FUJIWARA M, DENNHART N, et al. Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas revoluta*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS[J]. Biochimica et biophysica acta-proteins and proteomics, 2010, 1804(4): 668-675.