

## 马尾松叶提取物的抗菌活性

毛胜凤<sup>1</sup>, 张立钦<sup>1</sup>, 张 健<sup>1</sup>, 林海萍<sup>1</sup>, 马良进<sup>1</sup>, 徐清信<sup>2</sup>

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省永嘉县林业局, 浙江 永嘉 325100)

**摘要:**采用滤纸片法, 检测不同质量浓度马尾松 *Pinus massoniana* 叶提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 八叠球菌 *Sarcina ventriculi*, 木霉 *Trichoderma viride*, 青霉 *Penicillium chrysogenum* 和黑曲霉 *Aspergillus niger* 等的抑制效果。结果表明, 马尾松叶的水、丙酮、乙醇溶液提取物对细菌的抑菌圈直径随着提取物质量浓度的增大, 对各种菌的抑菌效果越好, 马尾松叶乙醇提取物质量浓度为 100.0 g · L<sup>-1</sup> 时, 大肠杆菌抑菌圈直径为 25.6 mm; 对 3 种霉菌的抑菌效果与质量浓度的大小不成正比; 3 种提取物中以乙醇提取物的抑菌效果最好, 而水提物的抑菌效果较差。图 2 表 1 参 9

**关键词:**森林保护学; 马尾松叶; 提取物; 抗菌活性

中图分类号: S718.8; Q946.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)03-0359-04

### Antimicrobial activity of extracts from *Pinus massoniana* needles

MAO Sheng-feng<sup>1</sup>, ZHANG Li-qin<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, LIN Hai-ping<sup>1</sup>, MA Liang-jin<sup>1</sup>, XU Qing-xin<sup>2</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. Forest Enterprise of Yongjia County, Yongjia 325100, Zhejiang, China)

**Abstract:** The antimicrobial activity of ethanol, acetone, and aqueous extracts from *Pinus massoniana* needles on four bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Sarcina ventriculi*) and three mold fungi (*Trichoderma viride*, *Penicillium chrysogenum*, and *Aspergillus niger*) was evaluated by agar-diffusion bioassay. Filter paper discs impregnated with extracts at concentrations of 100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 g · L<sup>-1</sup> were placed on the agar surface. Reversal of the antiviral activity of mycophenolic acid was indicated by virus breakthrough in those cells in close proximity to the filter paper disc. All extracts, depending on their concentrations, showed different resistances to bacteria; however, their resistance to fungi differed. The assay showed that a 100.0 g · L<sup>-1</sup> ethanol extract concentration of *P. massoniana* needles had a 25.6 mm diameter zone of inhibition against *E. coli*. For the three kinds of extracts, ethanol had the highest resistance and aqueous the lowest. The results shows that the extracts of *P. massoniana* needles have antimicrobial activity. [ Ch, 2 fig. 1 tab. 9 ref. ]

**Key words:** forest protection; *Pinus massoniana* needles; extract; antimicrobial activity

植物源农药因其高效、低毒且与环境和谐而引起世界各国的关注<sup>[1]</sup>。Swain<sup>[2]</sup>说植物是生物活性化合物的天然宝库, 植物所产生的次生代谢产物超过 40 万种, 其中很多的化学物质有杀虫或抗菌作用。目前, 国内外对于植物源农药治理虫害方面已经有深入的研究, 但对病害方面的研究相对较少, 杀菌剂的研究要比杀虫剂的研究少得多<sup>[3]</sup>, 这其中又以禾本科 Gramineae 的植物研究得比较多, 而对于木本植物研究得比较少<sup>[4-7]</sup>。马尾松 *Pinus massoniana* 在我国分布极广, 北自河南及山东南部, 南至两广、台湾, 东自沿海, 西至四川中部及贵州, 遍布于华中华南各地。马尾松生长快, 适应性强, 造林更新容易, 能适应干燥瘠薄的土壤, 是浙江省重要的先锋造林树种和主要用材林树种, 但在马尾

收稿日期: 2007-06-18; 修回日期: 2007-09-17

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(2005C12022)

作者简介: 毛胜凤, 实验师, 硕士, 从事森林保护和微生物等研究。E-mail: maosf@126.com。通信作者: 张立钦, 教授, 博士, 从事森林保护研究。E-mail: zhangliqin@zjfc.edu.cn

松针提取物的杀菌效果方面很少有人研究。本研究通过马尾松叶提取物的抗菌活性研究,为马尾松叶的开发利用提供有效的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 实验所用的马尾松叶,于2006年7月采于浙江临安浙江林学院内。

1.1.2 供试菌种及培养基 本实验采用细菌4株,霉菌3株,由浙江林学院微生物实验室提供。细菌:金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*,大肠杆菌 *Escherichia coli*,枯草杆菌 *Bacillus subtilis*,八叠球菌 *Sarcina ventriculi*。选用牛肉膏蛋白胨培养基(LB)。霉菌:木霉 *Trichoderma viride*,青霉 *Penicillium chrysogenum*,黑曲霉 *Aspergillus niger*。选用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.1.3 实验仪器 EYELA水浴锅 SB-2000,旋转蒸发仪 N-1001,循环水式多用真空泵,超纯水器,超净工作台,LDZX-40AI型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅,容声 BCD-180G 冰箱,LRH-250A 生化培养箱,DJ 灵巧型粉碎机,超净工作台。

### 1.2 实验方法<sup>[8]</sup>

1.2.1 菌种活化 将所有供试的菌种移接入相应的试管斜面培养基上,每种菌移接数支。细菌置于37℃恒温培养箱内培养24 h,霉菌置于28℃培养箱培养48 h,取出置于0~4℃冰箱冷藏备用。

1.2.2 提取物的制备 ①马尾松叶乙醇溶液提取物的制备。称取粉碎过60目筛马尾松针叶100.0 g,放入2.5 L的广口瓶内,向瓶中加入体积分数为95%乙醇2.0 L,浸泡24 h后过滤。向滤渣中再加入体积分数为95%乙醇1.7 L,浸泡24 h后过滤。将2次滤液合并。用旋转蒸发仪浓缩回收溶剂,共得浸膏状提取物19.7 g。将浸膏状提取物放置常温,直至乙醇全部挥发。②马尾松叶丙酮提取物的制备。称取马尾松叶干粉100.0 g,放入2.5 L的广口瓶内。向瓶中加入丙酮2.0 L,浸泡24 h后过滤。向滤渣中再加入体积分数为95%甲醇1.7 L,浸泡24 h后过滤。将2次滤液合并。用旋转蒸发仪浓缩回收溶剂,共得浸膏状提取物16.8 g。将浸膏状提取物放置常温,直至丙酮全部挥发。③马尾松叶水提取物的制备。马尾松叶干粉100.0 g,放入2.5 L的广口瓶内。向瓶中加入蒸馏水2.0 L,浸泡24 h后过滤。向滤渣中再加入蒸馏水1.7 L,浸泡24 h后过滤。将2次滤液合并。用旋转蒸发仪浓缩回收溶剂,共得浸膏状提取物11.9 g。

1.2.3 供试材料灭菌 无菌水、滤纸片和培养基均采用常规湿热灭菌法处理,移液管、滤纸片和玻璃推棒等试验用品用干热灭菌法处理。

1.2.4 菌种活化与培养 用接种环在乙醇灯火焰上消毒后挑取菌种在已灭菌的试管斜面上划线接种,7种菌各接3支试管。接种后细菌置于37℃培养箱,霉菌置于28℃培养箱培养。

1.2.5 菌悬液制备 把预先进行菌种斜面活化的各菌种分别挑取2环制成菌悬液,然后对每种菌取2支盛有10 mL无菌水的试管排在试管架上,稀释菌液浓度,使其含菌量为10<sup>10</sup>~10<sup>11</sup>个·L<sup>-1</sup>,即得供试菌种,将各种菌的菌悬液贴好标签,备用。

1.2.6 浸泡滤纸片 将马尾松叶的不同溶剂提取物用二倍稀释法分别稀释成100.0,50.0,25.0,12.5,6.3,3.1,1.6 g·L<sup>-1</sup>等7个质量浓度,已灭菌的滤纸片在各溶剂中浸泡24 h,供抑菌实验用,用无菌水浸泡的滤纸片作对照。

1.2.7 抑菌实验方法 琼脂扩散滤纸片法测定抑菌圈直径大小。在无菌条件下,快速分别倒入冷却至45℃的培养基,至灭过菌的培养皿中凝固,每皿需培养基量为10~15 mL。在无菌条件下,按不同的菌种,用灭过菌的移液管吸取0.1 mL菌悬液注入相应的培养皿中,用无菌玻璃推棒推匀。用无菌镊子夹取浸泡在药剂中的滤纸片,滤去多余的汁液放入培养皿中,每皿放3片,呈正三角形放置。将以上培养皿放入培养箱中培养,细菌37℃下培养,24 h,真菌28℃培养,72 h,测量抑菌圈大小。

### 1.3 最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度测定<sup>[9]</sup>

用2倍稀释法将马尾松乙醇提取物、丙酮提取物和水提物分别稀释成100.0,50.0,25.0,12.5,6.3,3.1,1.6 g·L<sup>-1</sup>等7个质量浓度,在各个平皿内分别用2 mL移液管移入不同质量浓度的马尾松

提取液, 每个质量浓度重复 3 个皿, 然后倒入约 15 mL 已经高温灭菌的培养基, 充分混匀, 冷却凝固后, 每皿加入 0.1 mL 菌悬液, 然后用无菌涂布器涂布均匀, 培养方法同上。取出观察结果, 以 24 h 不长菌的提取液质量浓度为最低抑菌质量浓度, 48 h 不长菌的提取液质量浓度为最低杀菌质量浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同提取物对供试菌种的抑制效果

2.1.1 马尾松不同提物对细菌的抑菌效果 图 1 表明, 马尾松叶水提物对 4 种细菌都有一定的抑制作用, 对这 4 种细菌的作用随着提取物质量浓度的增大抑菌圈直径逐渐增大。马尾松叶水提物对金黄色葡萄球菌的效果最为显著, 质量浓度为  $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌圈直径达到 14.4 mm, 对八叠球菌效果次之, 其抑菌圈为 12.3 mm。马尾松叶丙酮提取物对 4 种细菌都有抑制作用, 随着马尾松叶丙酮提取物质量浓度的增大, 抑菌圈直径增大。其中对八叠球菌和金黄色葡萄球菌效果最好, 当质量浓度为  $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 八叠球菌的抑菌圈直径达到 16.0 mm, 金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到 16.0 mm。马尾松叶乙醇提取物对 4 种细菌都有一定的抑制作用, 随着马尾松叶乙醇提取物质量浓度的增大, 抑菌圈直径增大。其中对大肠杆菌的效果最好, 当质量浓度为  $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 大肠杆菌抑菌圈直径为 25.6 mm, 八叠球菌的抑菌圈直径达到 21.7 mm。比较图 1, 可以看出马尾松叶乙醇提取物对 4 种细菌的抑制效果均高于马尾松叶的丙酮提取物和水提取物。尤其是对大肠杆菌和八叠球菌, 抑菌圈直径分别增加了 13.0 和 5.7 mm。可见, 马尾松叶乙醇提取物对大肠杆菌的抑制效果最好, 丙酮提取物和水提取物对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好。

2.1.2 马尾松叶不同提取物对霉菌的抑菌效果 图 2 表明, 马尾松叶水提取物对 3 种霉菌都有一定的抑制作用, 但抑菌效果不与质量浓度成正比, 最佳抑菌质量浓度因霉菌不同而异。青霉在  $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌效果最好, 抑菌圈直径为 12.7 mm; 木霉在  $3.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时效果最好, 抑菌直径为 13.0 mm, 黑曲霉在  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时效果最好, 抑菌圈直径为 11.2 mm。马尾松叶丙酮提取物对 3 种霉菌都有一定的抑制作用, 其抑菌效果也不与质量浓度成正比, 对 3 种霉菌的最佳抑菌质量浓度为: 青霉在  $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌效果最好, 抑菌圈直径 16.8 mm; 木霉在  $25.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌圈直径为 12.0 mm; 黑曲霉在  $12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌圈直径为 10.4 mm。马尾松叶乙醇提物对 3 种霉菌都有一定的抑制作用, 其抑菌效果同样不与其质量浓度成正比。青霉在  $25.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌效果最好, 抑菌圈直径为 13.4 mm; 木霉在  $25.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时效果最好, 其抑菌圈为 17.2 mm; 黑曲霉在  $3.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑制效果最好, 抑菌圈为 16.2 mm。比较图 2 可见, 不同溶剂提取物对同一霉菌的抑制效果不同。马尾松叶乙醇提取物对木霉和黑曲霉的抑制效果最好, 在质量浓度为  $25.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌圈直径分别达到 17.2 和 16.2 mm; 丙酮提取物对青霉的抑制效果最好,  $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理时, 抑菌圈直径达到 16.8 mm。综上所述, 马尾松叶的不同溶剂提取物对 7 种供试菌均有一定的抑制作用, 不同提取物对细菌抑制作用随着提取物的质量浓度增大而增强, 而对霉菌作用时与质量浓度不成比例。

### 2.2 马尾松叶提取物的最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度

由表 1 可见, 马尾松叶水提取物、丙酮提取物和乙醇提取物对 7 种供试菌的最小抑菌浓度都一致, 在  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时均有抑菌效果。马尾松叶的 3 种提取物对细菌有杀菌作用而对霉菌没有杀菌作用, 其中乙醇提取物的杀菌效果比水提取和丙酮提取物的杀菌效果更好。

## 3 结论

本试验结果表明马尾松叶水提取物、丙酮提取物和乙醇提取物都有一定的抑菌效果; 而在这 3 种提取物中马尾松叶乙醇提取物的抑菌效果最好, 马尾松叶丙酮提取物和水提物的抑菌效果次之。

最低杀菌质量浓度试验结果表明, 马尾松叶 3 种提取物对 7 种菌的最低杀菌质量浓度不同。从最低杀菌质量浓度可以看出: 马尾松叶乙醇提取物对 7 种菌的杀菌效果最好, 而马尾松叶水提取物和丙酮提取物次之; 马尾松叶的 3 种提取对霉菌没有杀菌作用, 其中乙醇提取物的杀菌效果比水提取物和丙酮提取物的杀菌效果更好。

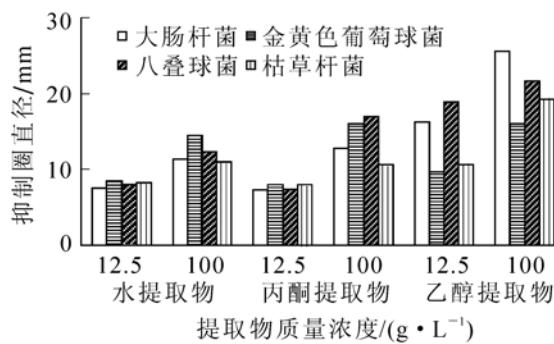


图1 马尾松叶提取物对细菌的抑制效果

Figure 1 Antimicrobial activity of the extracts of *Pinus massoniana* needles against four bacteria

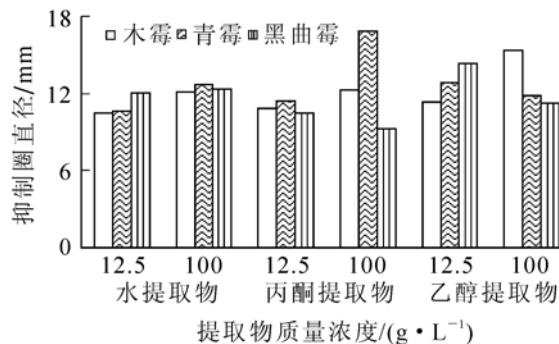


图2 马尾松叶提取物对霉菌的抑制效果

Figure 2 Antimicrobial activity of the extracts of *Pinus massoniana* needles against three mold fungi

表1 马尾松叶不同提取物的最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of different extracts from *Pinus massoniana* needles

菌种	最低抑菌质量浓度/(g·L⁻¹)			最低杀菌质量浓度/(g·L⁻¹)		
	水提取物	丙酮提取物	乙醇提取物	水提取物	丙酮提取物	乙醇提取物
大肠杆菌	1.6	1.6	1.6	6.3	3.1	3.1
金黄色葡萄球菌	1.6	1.6	1.6	6.3	6.3	3.1
八叠球菌	1.6	1.6	1.6	12.5	6.3	3.1
枯草杆菌	1.6	1.6	1.6	50.0	25.0	25.0
木霉	1.6	1.6	1.6	—	—	—
青霉	1.6	1.6	1.6	—	—	—
黑曲霉	1.6	1.6	1.6	—	—	—

说明：—表示无杀菌效果。

本试验表明，松叶提取物有抑菌作用，而提取物的成分组成，提取物的抑菌机制有待进一步研究。

## 参考文献：

- [1] 李永刚, 文景芝, 郝中娜. 植物源杀菌剂的研究现状与展望[J]. 东北农业大学学报, 2002, 33(2): 191–195.
- [2] SWAIN T. Secondary compounds of protective agents [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1997, 28: 479–501.
- [3] 操海群, 岳永德, 花日茂, 等. 植物源农药研究进展(综述)[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(1): 40–44.
- [4] ARRAGA A M, MACHADO M I L, CRAVEIRO A A, et al. Oil analysis of *Guazuma ulmifolia* leaves [J]. *Rev Brasile Farm*, 1996, 77: 45–46.
- [5] BORK P M, SCHMITZ M L, WEIMANN C, et al. Mahua Indian medicinal plants (Mexico). inhibitory activity on NF-κB as an anti-inflammatory model and anti-bacterial effects [J]. *Phytomedicine*, 1996, 3: 263–269.
- [6] CACERES A, CANO O, SAMAYOA B, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders (I) Scerrning of 84 plants against Entero bacteria [J]. *J Ethnopharmacol*, 1990, 30: 55–73.
- [7] CICCIO J F, ROSALES K M. Isolation of the lignan yatein from bark of *Bursera simaruba* (Burseraceae) [J]. *Ingenieria y Ciencia Quimica*, 1995, 15: 20–21.
- [8] 毛胜凤, 孙芳利, 段新芳, 等. 壳聚糖金属盐抑菌效果研究[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(1): 89–93.
- [9] 崔艳秋, 南蓬, 林满红, 等. 圆柏和龙柏主要挥发物及其抑菌和杀菌作用[J]. 环境与健康杂志, 2006, 23(1): 63–65.