

14 种红树植物对动物病原菌的抑菌活性

邓业成, 骆海玉, 张丽珍, 秦 卉, 廖永梅, 李瑞钰

(广西师范大学 生命科学学院, 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘要: 采用带药培养基涂布法测定了 14 种红树植物甲醇提取物及从中分离获得的 2 种纯化合物对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)和蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) 9 种动物病原菌的抑菌活性。结果表明, 苦郎树(*Clerodendrum inerme*)、海漆(*Excoecaria agallocha*)、白骨壤(*Avicennia marina*)、苦槛蓝(*Myoporum bontioides*)、银叶树(*Heritiera littoralis*)和榄李(*Lumnitzera racemosa*)有比较广谱的抗菌活性。苦槛蓝和海漆的抑菌活性较高, 最低抑制浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)值分别为 1~4 g/L 和 2~6 g/L。从苦郎树中分离获得的纯化合物 KLS-46 对伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌和蜡样芽胞杆菌的 MIC 值分别为 0.1、0.05、0.1 和 0.05 g/L, 对其余 5 种病原菌的 MIC 值均大于 0.4 g/L。从病原菌对红树植物的敏感性看, 藤黄微球菌和蜡样芽胞杆菌对红树植物比较敏感。

关键词: 红树植物; 动物病原菌; 抑菌活性

中图分类号: S 435.72

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)03-0037-05

红树林是一类特殊而重要的海洋植物资源, 是生长在热带、亚热带低能海岸潮间带, 受潮水浸淹的木本植物群落^[1]。全世界红树植物共有 20 科 27 属 70 种(含 1 变种), 中国分布有 12 科 25 属 27 种(含 1 变种)^[2]。红树植物由于生长在海岸潮间带的特殊环境, 在代谢过程中形成许多陆生植物所不具备的特殊次生物质, 这些次生物质是发现新型结构抗菌物质的天然资源库^[3]。研究表明, 红茄苳(*Rhizophora mucronata*)具有抗艾滋病、抗菌、杀虫、抗牛痘病毒、抗脑心肌炎病毒等药理活性^[4-5]。木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)中的一些化学成分显示了良好的抗炎和抑制肿瘤生长等作用^[6]。玉蕊(*Barringtonia acutangula*)有抗肿瘤和抗微生物作用^[7-8]。老鼠簕(*Acanthus ilicifolius*)有抗氧化、抗癌、抗病毒、抗炎和肝保护作用等, 其中的 2-苯吡恶唑啉酮有止痛、解热、抗惊厥、催眠、肌肉松弛、诱变、杀利什曼原虫(*Leishmania* spp.)和抗真菌作用, 其核糖衍生物可抗癌和抗病毒^[9-10]。从海漆(*Excoecaria agallocha*)分离到的化合物具有显著的抗肿瘤活性^[3, 11]。可见红树植物在医学领域有广阔的应用前景。目前国内外对

红树植物的抗菌效果研究很少。作者选择分布于广西的 14 种红树植物, 测定了其提取物及其两个化合物对动物病原菌的抑菌活性, 旨在为红树植物的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物病原菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)。

收稿日期: 2011-04-21; 修回日期: 2011-12-21

基金项目: 广西自然科学基金项目(桂科自 0991097); 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室科研项目(桂科能 1001Z014)

作者简介: 邓业成(1965-), 男, 广西全州人, 教授, 博士, 主要从事天然产物研究, E-mail: dyecheng@163.com

上述 9 种动物病原细菌由桂林医学院微生物实验室提供。

1.1.2 供试红树植物

水黄皮 (*Pongamia pinnata*), 卤蕨 (*Acrostichum aureum*), 苦郎树 (*Clerodendrum inerme*), 银叶树 (*Heritiera littoralis*), 桐花树 (*Aegiceras corniculata*), 秋茄 (*Kadelia candel*), 海漆, 榄李 (*Lumnitzera racemosa*), 白骨壤 (*Avicennia marina*), 木榄, 红海榄 (*Rhizophora stylosa*), 苦槛蓝 (*Myoporum bontiodides*), 老鼠簕, 海芒果 (*Cerbera manghas*)。

以上 14 种红树植物采自广西防城港, 采集部位均为植物的枝叶。

1.2 方法

1.2.1 植物成分提取及分离

植物成分的提取: 采用溶剂冷浸法。将采集的植物材料放在室内晾干, 再在 60℃ 恒温鼓风干燥箱中烘干至发脆, 用植物粉碎机粉碎。称取一定量的干粉, 放入玻璃容器中, 加 5 倍量的甲醇, 在室温下浸提 48 h, 抽滤。共浸提 2 次, 将 2 次滤液合并, 用旋转蒸发器在水浴中减压浓缩, 蒸干溶剂, 得膏状提取物。称质量, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

(-)-epingaione 的分离及鉴定: 参照 Deng^[12]的方法。

KLS-46 的分离: 先用液-液萃取法将苦郎树叶甲醇提取物初步分离为石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物 4 部分, 通过测定各萃取物对甘蔗凤梨病菌的抑菌活性, 确定苦郎树的抑菌活性成分主要集中在石油醚萃取物中。对石油醚萃取物用硅胶柱色谱进行多次分离, 洗脱溶剂系统为石油醚/丙酮。同时测定各流分对甘蔗凤梨病菌的抑菌活性, 最终分离得到活性流分 KLS-46。该化合物在甲醇中结晶时为无色针状晶体, 其化学结构正在鉴定中。

1.2.2 抑菌活性和最低抑菌浓度测定

采用带药培养基涂布法测定。参照慕立义^[13]的方法并加以改进。用丙酮和无菌水(1:1)组成的混合溶剂溶解样品, 配成所需浓度的药液。在洁净工作台上取 1 mL 药液(对照用混合溶剂代替药液)与 9 mL 牛肉膏-蛋白胨培养基混匀, 倒入直径为 9 cm 的玻璃培养皿中, 制成厚薄均匀的带药培养基。将保存的菌种接到牛肉膏-蛋白胨固体培养基上, 37℃ 培养 24 h, 用接种环取菌落分散于无菌水中, 制备成浓度

为 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 的菌悬液。取菌悬液 0.1 mL 加到培养基表面, 用涂布器涂布均匀, 置 37℃ 恒温培养箱中培养。每处理重复 3 个皿。培养 72 h 后观察记录菌落的生长情况。测定最低抑菌浓度时, 制备系列浓度的带药培养基, 接菌培养, 不长菌的最低浓度即为最低抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 14 种红树植物甲醇提取物对 9 种动物病原菌的抑菌活性

采用带药培养基涂布法测定了 14 种红树植物甲醇提取物对大肠杆菌、绿脓杆菌、伤寒沙门氏菌、痢疾志贺菌、普通变形杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、溶壁微球菌和蜡样芽胞杆菌 9 种动物病原菌的抑菌活性, 结果见表 1。在质量浓度为 10 g/L 时, 苦郎树、海漆和白骨壤对大肠杆菌除外的 8 种病原菌有抑菌活性, 苦槛蓝、银叶树和榄李对大肠杆菌和绿脓杆菌除外的 7 种病原菌有抑菌活性, 水黄皮和红海榄对 9 种病原菌均无抑菌活性, 其余 6 种红树植物对 1~4 种病原菌有抑菌活性。表明苦郎树、海漆、白骨壤、苦槛蓝、银叶树和榄李 6 种红树植物有比较广谱的抗菌活性。从病原菌对红树植物的敏感性看, 藤黄微球菌和蜡样芽胞杆菌对红树植物比较敏感, 有 11 种红树植物对它们有抑菌活性, 大肠杆菌不敏感, 所有红树植物对它均无抑菌活性, 绿脓杆菌比较不敏感, 有 11 种红树植物对它无抑菌活性。

2.2 12 种红树植物提取物及 2 种化合物对动物病原菌的最低抑菌浓度

采用带药培养基涂布法进一步测定了在质量浓度为 10 g/L 时有抑菌活性的 12 种红树植物甲醇提取物对动物病原菌的最低抑菌浓度, 同时还测定了从苦槛蓝和苦郎树中分离获得的 2 个纯化合物的最低抑菌浓度, 结果见表 2。在抗菌谱比较广的 6 种红树植物中, 苦槛蓝和海漆的抑菌活性较高, MIC 值分别为 1~4 g/L 和 2~6 g/L。榄李的 MIC 值为 1~8 g/L, 苦郎树和银叶树的 MIC 值为 2~10 g/L, 白骨壤的 MIC 值为 4~10 g/L。在 2 种纯化合物中, (-)-epingaione 对所测定的 9 种动物病原菌的 MIC 值均大于 0.4 g/L, 即在浓度为 0.4 g/L 时均无抑菌活性; KLS-46 对伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌和蜡样芽胞杆菌的 MIC 值分别为 0.1、0.05、0.1 和 0.05 g/L, 对其余 5 种动物病原菌的 MIC 值均大于 0.4 g/L。

表 1 14 种红树植物提取物对动物病原菌的抑菌活性

Tab. 1 Inhibitory activity of extracts from 14 mangrove plants against animal pathogens

样品	处理后 72 h 菌落生长情况(每处理重复 3 次)								
	大肠杆菌	绿脓杆菌	伤寒沙门氏菌	痢疾志贺氏菌	普通变形杆菌	金黄色葡萄球菌	藤黄微球菌	溶壁微球菌	蜡样芽胞杆菌
苦槛蓝	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---
水黄皮	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
卤蕨	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	---
苦郎树	+++	---	---	---	---	---	---	---	---
银叶树	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---
秋茄	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	---
海漆	+++	---	---	---	---	---	---	---	---
白骨壤	+++	---	---	---	---	---	---	---	---
木榄	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	---
红海榄	+++	+++	+++	+++	-++	+++	+++	+++	+++
老鼠簕	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	---
海芒果	+++	+++	---	+++	+++	---	---	+++	---
榄李	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---
桐花树	+++	+++	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
对照	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注: 质量浓度为 10 g/L; “+” . 有菌落生长; “-” . 完全无菌落生长; “+++” . 3 个重复(培养皿)都长菌; “---” . 3 个重复都不长菌; “-++” . 3 个重复中 1 个重复不长菌, 有 2 个重复长菌

表 2 12 种红树植物提取物及 2 种化合物对动物病原菌的最低抑菌浓度

Tab. 2 The MIC values of extracts and two compounds from 12 mangrove plants against animal pathogens

样品	MIC(g/L), 72 h								
	大肠杆菌	绿脓杆菌	伤寒沙门氏菌	痢疾志贺氏菌	普通变形杆菌	金黄色葡萄球菌	藤黄微球菌	溶壁微球菌	蜡样芽胞杆菌
苦槛蓝	-	-	2	2	4	2	1	4	2
卤蕨	-	-	-	-	-	-	4	-	8
苦郎树	-	10	4	4	8	4	2	4	2
银叶树	-	-	6	2	10	10	2	10	4
秋茄	-	-	-	-	-	-	4	-	6
海漆	-	6	4	2	6	4	2	4	2
白骨壤	-	10	6	4	6	8	4	8	4
木榄	-	-	-	6	-	-	10	-	8
老鼠簕	-	-	-	10	-	-	10	-	10
海芒果	-	-	10	-	-	10	10	-	10
榄李	-	-	8	2	6	8	1	8	4
桐花树	-	-	-	4	-	-	-	-	-
(-)-epingaione	>0.4	>0.4	>0.4	>0.4	>0.4	>0.4	>0.4	>0.4	>0.4
KLS-46	>0.4	>0.4	0.1	>0.4	>0.4	0.05	>0.4	0.1	0.05

注: (-)-epingaione 从苦槛蓝中分离获得, KLS-46 从苦郎树中分离获得, 均为纯化合物; “-” . 未测定 MIC 值, 因为样品对病原菌在浓度为 10 g/L 时无抑菌活性

3 讨论

海洋生物药物是目前研究开发的热点领域之一,红树植物是海洋生物的一部分,除了在海洋生态方面具有重要功能外,在医学领域也有多种药理功效和用途,具有很大的开发应用前景。本研究发现,从广西防城港红树林采集的 14 种红树植物大多数对动物病原菌有抗菌活性,其中苦郎树、海漆、白骨壤、苦槛蓝、银叶树和榄李 6 种红树植物的抗菌谱比较广,在提取物质量浓度为 10 g/L 时对 9 种供试病原菌中的 7 种以上有抗菌活性,苦槛蓝和海漆的抗菌活性较高, MIC 值分别为 1~4 g/L 和 2~6 g/L。所以这些红树植物作为抗菌药在医药领域有开发应用价值。作者在以前的研究工作中已发现多种红树植物提取物对植物病原真菌有抗菌活性^[14],并从苦槛蓝中分离鉴定出抗菌物质(-)-epingaione^[12],从苦郎树中分离出抗菌物质 KLS-46,这 2 种抗菌物质对植物病原真菌均有很好的抗菌活性,在农药领域也有开发应用前景。在本研究中发现,苦槛蓝中的抗菌物质(-)-epingaione 对供试的 9 种动物病原菌在浓度为 0.4 g/L 时没有抑菌活性,而苦槛蓝甲醇提取物对其中的 7 种动物病原菌抑菌活性较高,推测苦槛蓝对植物病原真菌和动物病原细菌的抗菌活性物质不同,还有其他的抗菌活性物质存在。苦郎树中的抗菌活性物质 KLS-46 只对部分动物病原细菌有活性,与其提取物的抗菌谱不一致,推测也可能还有其他抗菌活性物质存在。所以,要明确这 2 种红树植物的抗菌活性物质还需要进一步研究。对其他抗菌活性高且抗菌谱较广的红树植物也有待进一步研究其抗菌活性物质,这将有助于从红树植物中发现更多抗菌活性物质,为抗菌药物的开发奠定基础。

参考文献:

- [1] 林鹏. 红树林[M]. 北京: 海洋出版社, 1984: 1-94.
- [2] 赵萌莉, 林鹏. 红树植物多样性及其研究进展[J]. 生物多样性, 2000, 8(2): 192-197.
- [3] 王友绍, 何磊, 王清吉, 等. 药用红树植物的化学成分及其药理研究进展[J]. 中国海洋药物, 2004, 2: 26-31.
- [4] Premanathan M, Kathiresan K, Yamamoto N. *In vitro* anti-human immunodeficiency virus activity of polysaccharide from *Rhizophora mucronata*[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1999, 63(7): 1187-1190.
- [5] 何磊, 王友绍, 王清吉. 红树植物红茄苳化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(11): 5-7.
- [6] 尚随胜, 龙盛京. 红树植物木榄的活性成分研究概况[J]. 中草药, 2005, 36(3): 465-467.
- [7] Hasan C M, Khan S, Jabbar A. Neoclerodane diterpenoids from *Barringtonia racemosa*[J]. Journal of Natural Products, 2000, 63: 410-411.
- [8] Thomas T J, Panikkar B, Subramonia M A. Antitumor property and toxicity of *Barringtonia racemosa* Roxb seed extract in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 82: 223-227.
- [9] Udom K, Vallapa C. Chemical constituents of the roots of *Acanthus ilicifolius*[J]. Journal of Natural Products, 1986, 49(2): 355.
- [10] 霍长虹, 梁鸿, 赵玉英, 等. 老鼠簕属植物化学成分及其活性研究进展[J]. 中国海洋药物, 2004, 3: 39-44.
- [11] Lakshmana R V. Seco diterpenoids from *Excoecaria agallocha* L.[J]. Phytochemistry, 2003, 62(4): 585.
- [12] Deng Y C, Yang Z, Yu Y Z, et al. Inhibitory activity against plant pathogenic fungi of extracts from *Myoporum bontioides* A. Gray and identification of active ingredients[J]. Pest Management Science, 2008, 64: 203-207.
- [13] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 76-82.
- [14] 阳振, 邓业成, 陈新华. 红树植物甲醇提取物的抑菌活性研究[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(1): 78-80.

Inhibitory activity of fourteen mangrove plants against animal pathogens

DENG Ye-cheng, LUO Hai-yu, ZHANG Li-zhen, QIN Hui, LIAO Yong-mei, LI Rui-yu
(College of Life Science, Guangxi Normal University, Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection(Guangxi Normal University), Ministry of Education, Guilin 541004, China)

Received: Apr.,21, 2011

Key words: mangrove plants; animal pathogens; inhibitory activity

Abstract: The inhibitory activity of methanol extracts from fourteen mangrove plants and two isolated compounds against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus* and *Bacillus cereus* was determined using plate culture medium coating method. The results showed that the extracts of *Clerodendrum inerme*, *Excoecaria agallocha*, *Avicennia marina*, *Myoporum bontioides*, *Heritiera littoralis* and *Lumnitzera racemosa* exhibited broad-spectrum antibacteria activity. The inhibitory activity of *M. bontioides* and *E. agallocha* was relatively high and the MIC value was 1-4 and 2-6 g/L, respectively. The KLS-46 purified from *C. inerme* had the MIC values of 0.1, 0.05, 0.1 and 0.05 g/L against *S. typhi*, *S. aureus*, *M. lysodeikticus* and *B. cereus*, respectively, but showed almost inactive against the other five pathogens with MIC value more than 0.4 g/L. The *M. luteus* and *B. cereus* were more sensitive to the extracts from mangrove plants.

(本文编辑:谭雪静)