

绵马贯众不同萃取部位的抑菌活性

刘计权¹, 谢树莲^{2*}, 李洋洋¹, 阴宇¹

(1. 山西中医学院 中药学院, 太原 030619; 2. 山西大学 生命科学学院, 太原 030006)

[摘要] **目的:**研究绵马贯众不同萃取部位的抑菌活性。**方法:**以70%乙醇冷浸72 h制备绵马贯众粗提物,液-液分离法制备石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水5个部位萃取物,用K-B纸片扩散法对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、酵母菌、黄曲霉和黑根霉6种供试菌株的抑菌活性进行研究。**结果:**绵马贯众5个萃取部位均表现出一定的抑菌效果,且随着用药量的增加其抑菌活性总体上呈现出增强的趋势,其中以三氯甲烷萃取部位和乙酸乙酯萃取部位的抑菌活性较大,水萃取部位的抑菌活性最小。**结论:**不同部位对供试菌株的抑菌活性不同。

[关键词] 绵马贯众; 萃取部位; 细菌; 真菌; 抑菌活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0137-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030137

Antibacterial Activities of Different Extract Fractions from *Dryopteridis Crassirhizomatis* Rhizoma

LIU Ji-quan¹, XIE Shu-lian^{2*}, LI Yang-yang¹, YIN Yu¹

(1. School of Chinese Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China;
2. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antibacterial activities of different extract parts from *Dryopteridis Crassirhizomatis* Rhizoma. **Method:** The crude extracting of *Dryopteridis Crassirhizomatis* Rhizoma was extracted in 70% ethanol for 72 h, and the extracts of five fractions (petroleum, chloroform, EtoAc, n-BuoH and water) were prepared with liquid-liquid separation method. The antibacterial activities of different fractions on six strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus nigricans*) were studied by K-B paper dispersion. **Result:** All five parts had certain antibacterial effects on test strains, and the overall antibacterial activities were increase with the increase of the drug dose. The chloroform and EtoAc fractions had the stronger antibacterial activities, and the water fraction had the minimum antibacterial activities. **Conclusion:** Different fractions had different antibacterial activities on test strains.

[Key words] *Dryopteridis Crassirhizomatis* Rhizoma; extract fractions; bacteria; fungi; antibacterial activities

绵马贯众来源于鳞毛蕨科多年生药用植物粗茎鳞毛蕨的根状茎及叶柄残基,粗茎鳞毛蕨主要分布于黑龙江、吉林、辽宁及河北省的林下潮湿处,具有清热解毒、止血、杀虫作用,临床上用于时疫感冒、风热头痛、温毒发斑、疮疡肿毒、崩漏下血、虫积腹痛等

症^[1]。现代研究表明,间苯三酚类化合物是绵马贯众的主要活性成分,对多种病毒、菌类、肿瘤均表现出较强的抑制作用,而且能够杀灭血吸虫、猪蛔虫和蚊幼虫等寄生虫^[2-3]。胡昌江、陈红云等报道,绵马贯众提取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等人体

[收稿日期] 20150302(003)

[基金项目] 山西省自然科学基金项目(2011011036)

[第一作者] 刘计权,博士,副教授,从事中药资源开发、中药材质量控制的研究工作, Tel:0351-3179903, E-mail: Liujiqun2008@163.com

[通讯作者] * 谢树莲,博士,教授,从事药用植物资源开发利用的研究工作, Tel:0351-7018121, E-mail: xiesl@sxu.edu.cn

致病菌株表现出弱或中等的抑菌效果^[4-5]。刘钊研究发现,绵马贯众所含间苯三酚类化合物对革兰氏菌具有良好的抑制活性^[6]。由文献可知,前人关于绵马贯众的抑菌作用多集中于大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌等人体致病菌的研究,其中对枯草杆菌、酵母菌、黄曲霉和黑根霉的抑菌研究少有报道,本文在前人的基础上将绵马贯众萃取为 5 个部位,每个部位设置 6 个用药量,除大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌外,增加了枯草杆菌、酵母菌、黄曲霉和黑根霉 4 种供试菌株,以期对绵马贯众对供试菌株活性部位的确定和抑菌活性成分的进一步筛选提供依据。

1 材料

1.1 供试菌株 供试细菌:大肠埃希菌 *Escherichia coli*,金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*,枯草杆菌 *Bacillus subtilis*;供试真菌:酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*,黄曲霉 *Aspergillus flavus*,黑根霉 *Rhizopus nigricans*。以上供试菌株均由山西大学生命科学学院提供。

1.2 药材 绵马贯众药材购自北京同仁堂药店,经山西中医学院裴妙荣教授鉴定为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* 的干燥根茎及叶柄残基。

1.3 仪器 BS224S-L 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),YXQ-SG46-280S 型高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司),RE-5298A 型旋转蒸发器(上海雅荣生化设备仪器有限公司),SHB-HIA 型循环水多用真空泵(西安太康生物科技有限公司),DHP-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),PX-2508G 型净化工作台(上海博讯实业有限公司),THZ-D 型台式恒温振荡器(海门市林贝仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 绵马贯众不同部位萃取物制备 取绵马贯众适量,用 70% 乙醇室温冷浸 72 h 制得绵马贯众粗提物。采用液-液分离法,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇对绵马贯众粗提物进行萃取,经过浓缩后制得石油醚部、三氯甲烷部、乙酸乙酯部、正丁醇部和水部的萃取物。

2.2 培养基制备 参照文献[7]制备固体培养基和液体培养基。

2.3 药敏纸片制备 参照文献[7]制备药敏纸片,每个萃取部位分别做成含药量为 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg 6 种规格的药敏纸片,并用相应溶剂做空白对照无菌纸片,干燥后用于抑菌试验。

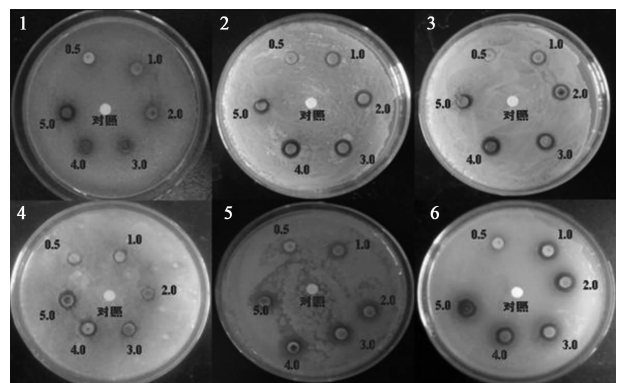
2.4 菌悬液的制备与稀释 参照文献[7]制备菌悬液,经预试确定适接种量为 200 μL 。

2.5 绵马贯众不同萃取部位抑菌活性的测定 采用 K-B 纸片扩散法。精密吸取制备好的菌悬液 200 μL ,滴加在装有平板培养基的 9 cm 无菌培养皿中央,均匀涂布,静置 5 min 待菌悬液被稍微吸收后,将药敏纸片紧贴在培养基表面,以溶剂纸片为对照。盖上盖子,倒置放入培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,用游标卡尺以十字交叉法测量不同用药量的抑菌圈直径。每个处理做 4 组平行试验。

2.6 数据分析 采用 SPSS 18.0 分析软件,根据邓肯的多重比较进行显著性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 绵马贯众石油醚萃取部位对不同菌株的抑制作用 由表 1 可知,石油醚萃取部位对 6 种供试菌株均有一定的抑制作用,抑菌圈的直径随着用药量的增加而加大。相同用药量条件下,对黄曲霉的抑制作用最大,高用药量(4.0, 5.0 mg),中用药量(2.0, 3.0 mg),低用药量(0.5, 1.0 mg)之间的抑菌效果具有显著差异性;对大肠埃希菌的抑制作用最小,最高用药量(5.0 mg),中用药量(2.0, 3.0 mg),低用药量(0.5, 1.0 mg)之间的抑菌效果同样具有显著差异性;对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、酵母菌、黑根霉的抑制作用大小介于对大肠埃希菌和黄曲霉的抑制作用之间。石油醚萃取部位对 6 种供试菌株的抑制效果见图 1。



1. 大肠埃希菌;2. 金黄色葡萄球菌;3. 枯草杆菌;4. 酵母菌;5. 黄曲霉;6. 黑根霉(图 2~5 同);注:培养皿内标注数字为用药量,单位为 mg(图 2~5 同)。

图 1 石油醚萃取部位对不同菌株的抑制作用

Fig. 1 Bacteriostasis of petroleum ether extract on different strains

3.2 绵马贯众三氯甲烷萃取部位对不同菌株的抑制作用 由表 2 可知,三氯甲烷萃取部位对供试菌

表 1 石油醚萃取部位对不同菌株的抑菌圈直径 (n = 4)

提取部位	含药量/mg	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草杆菌	酵母菌	黄曲霉	黑根霉
石油醚	0.0	-	-	-	-	-	-
	0.5	6.44 ³⁾	7.02 ³⁾	7.02 ³⁾	7.25 ³⁾	8.04 ⁴⁾	7.02 ³⁾
	1.0	6.52 ³⁾	8.14 ^{2,3)}	7.52 ³⁾	7.26 ³⁾	9.54 ³⁾	9.54 ²⁾
	2.0	7.32 ²⁾	8.64 ²⁾	9.04 ^{1,2)}	7.30 ³⁾	11.59 ²⁾	10.22 ¹⁾
	3.0	7.43 ²⁾	8.69 ²⁾	9.06 ^{1,2)}	7.56 ³⁾	12.08 ²⁾	10.24 ¹⁾
	4.0	7.58 ^{1,2)}	9.33 ^{1,2)}	9.56 ¹⁾	8.58 ²⁾	13.16 ¹⁾	10.24 ¹⁾
	5.0	8.26 ¹⁾	9.93 ¹⁾	9.58 ¹⁾	10.17 ¹⁾	13.86 ¹⁾	10.27 ¹⁾

注：“-”表示无明显抑菌圈；根据邓肯的多重比较，同列数据后面带有相同的数字表示不具有显著差异性，不同数字表示具有显著差异， $P < 0.05$ (表 2 ~ 5 同)。

株的抑制圈直径随着用药量的增加而增加，相同用药量条件下，三氯甲烷萃取部位对黄曲霉具有最大的抑制作用，当用药量为 5.0 mg 时，抑菌圈直径最大为 14.12 mm，但用药量分别为 3.0, 4.0, 5.0 mg 的抑菌效果之间无显著差异；从抑菌圈的直径来看，在相同用药量条件下，三氯甲烷萃取部位对黑根霉、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌

和大肠埃希菌的抑制作用依次降低，而且用药量在 3.0, 4.0, 5.0 mg 每种供试菌株的抑菌效果无显著差异；当用药量最小为 2.0 mg 时对酵母菌才表现出抑制作用，随着用药量的增加，抑制效果在后 3 个不同用药量 (3.0, 4.0, 5.0 mg) 之间产生显著差异。三氯甲烷萃取部位对 6 种供试菌株的抑菌效果见图 2。

表 2 三氯甲烷萃取部位对不同菌株的抑菌圈直径 (n = 4)

提取部位	含药量/mg	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草杆菌	酵母菌	黄曲霉	黑根霉
三氯甲烷	0.0	-	-	-	-	-	-
	0.5	7.16 ²⁾	7.03 ³⁾	7.50 ³⁾	-	9.51 ⁴⁾	7.54 ⁴⁾
	1.0	7.19 ²⁾	8.07 ²⁾	8.51 ^{1,2)}	-	10.58 ³⁾	8.53 ^{2,3)}
	2.0	7.53 ^{1,2)}	8.54 ^{1,2)}	8.55 ^{1,2)}	7.02 ³⁾	12.22 ²⁾	9.09 ²⁾
	3.0	7.58 ^{1,2)}	9.09 ¹⁾	9.05 ¹⁾	7.02 ³⁾	13.10 ^{1,2)}	10.21 ¹⁾
	4.0	8.09 ¹⁾	9.11 ¹⁾	9.13 ¹⁾	8.06 ²⁾	13.53 ^{1,2)}	10.53 ¹⁾
	5.0	8.55 ¹⁾	9.58 ¹⁾	9.59 ¹⁾	9.31 ¹⁾	14.12 ¹⁾	10.58 ¹⁾

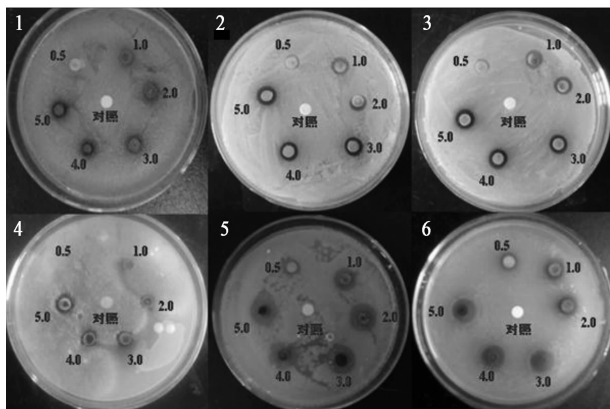


图 2 三氯甲烷萃取部位对不同菌株的抑制作用

Fig. 2 Bacteriostasis of chloroform extract on different strains

3.3 绵马贯众乙酸乙酯萃取部位对不同菌株的抑制作用 从表 3 实验结果得知，与对照组相比，乙酸乙酯萃取部位对黄曲霉的抑制效果最好，当药敏纸片的含药量达到 3.0 mg 时，抑制效果最佳，抑菌圈的直径达到 14.50 mm，此后随着药敏纸片含药量的加大，抑菌效果又出现下降的趋势；对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、酵母菌和黑根霉的抑制效果次于对黄曲霉的抑制效果，随着药敏纸片含药量的加大，绵马贯众乙酸乙酯萃取部位对 5 种供试菌株的抑制作用逐渐增大；当药敏纸片的含药量为 0.5 mg 时，对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和黑根霉表现出轻微的抑制作用，但对酵母菌没有抑制作用；随着药敏纸片含药量的增加，对黑根霉

表现出较好的抑制效果,当药敏纸片的含药量为 5.0 mg 时,抑菌圈的直径达到 10.56 mm,但用量在 3.0,4.0,5.0 mg 的抑菌效果没有显著差异;对酵母菌的抑制作用最小,当药敏纸片的含药量从 2.0

mg 增加到 5.0 mg 时,抑菌作用缓慢增加,不同用量之间的抑菌效果没有显著差异。乙酸乙酯萃取部位的抑菌效果见图 3。

3.4 绵马贯众正丁醇萃取部位对不同菌株的抑制

表 3 乙酸乙酯萃取部位对不同菌株的抑菌圈直径 (n=4)

Table 3 Bacteriostasis of ethyl acetate extract on different strains (n=4) mm

提取部位	含药量/mg	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草杆菌	酵母菌	黄曲霉	黑根霉
乙酸乙酯	0.0	-	-	-	-	-	-
	0.5	6.53 ^{2,3)}	6.56 ²⁾	6.51 ³⁾	-	11.07 ³⁾	6.50 ⁴⁾
	1.0	6.58 ^{2,3)}	6.59 ²⁾	7.07 ³⁾	6.52 ²⁾	12.56 ²⁾	8.55 ^{2,3)}
	2.0	7.02 ²⁾	7.55 ^{1,2)}	7.56 ^{2,3)}	7.09 ^{1,2)}	14.03 ¹⁾	9.07 ²⁾
	3.0	7.10 ²⁾	8.04 ¹⁾	8.02 ²⁾	7.52 ¹⁾	14.50 ¹⁾	10.21 ¹⁾
	4.0	7.53 ²⁾	8.04 ¹⁾	9.05 ¹⁾	7.57 ¹⁾	12.08 ²⁾	10.56 ¹⁾
	5.0	8.58 ¹⁾	8.15 ¹⁾	9.57 ¹⁾	7.59 ¹⁾	12.12 ²⁾	10.56 ¹⁾

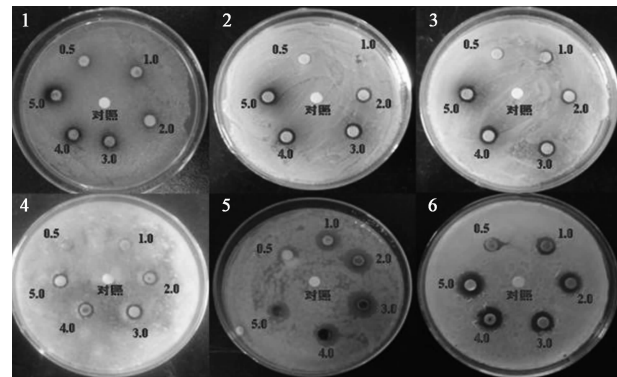


图 3 乙酸乙酯萃取部位对不同菌株的抑制作用
Fig. 3 Bacteriostasis of ethyl acetate extract on different strains

作用 表 4 显示,与对照组相比,正丁醇萃取部位对 6 种供试菌株均表现出一定的抑制效果。其中对黄

曲霉的抑制效果最好,相同用量条件下抑菌圈直径最大,且随着药敏纸片含药量的增加,抑菌效果也显著增加,当药敏纸片的含药量达到 5.0 mg 时,抑菌圈的直径达到 13.12 mm;对黑根霉的抑制效果次于对黄曲霉的抑制效果;对枯草杆菌、大肠埃希菌的抑制效果较弱,在药敏纸片含药量较小的情况下(0.5,1.0,2.0 mg),抑菌圈直径都维持在 6.5 mm 左右,当药敏纸片含药量增加到 3.0 mg 以上时,抑菌效果又表现出增强的趋势;对酵母菌、金黄色葡萄球菌的抑制效果最弱,当药敏纸片的含药量为 0.5,1.0 mg 时没有抑制效果,当药敏纸片的含药量为 2.0,3.0 mg 时表现出微弱的抑制效果,当药敏纸片的含药量大于 3.0 mg 时抑制效果有所增强。正丁醇萃取部位抑菌效果见图 4。

表 4 正丁醇萃取部位对不同菌株的抑菌圈直径 (n=4)

Table 4 Bacteriostasis of n-butyl alcohol extract on different strains (n=4) mm

提取部位	含药量/mg	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草杆菌	酵母菌	黄曲霉	黑根霉
正丁醇	0.0	-	-	-	-	-	-
	0.5	6.50 ^{1,2)}	-	6.55 ^{2,3)}	-	9.04 ⁴⁾	7.09 ⁴⁾
	1.0	6.51 ^{1,2)}	-	6.56 ^{2,3)}	-	9.09 ⁴⁾	7.53 ^{3,4)}
	2.0	6.55 ^{1,2)}	6.55 ^{1,2)}	6.56 ^{2,3)}	6.52 ²⁾	11.03 ³⁾	8.56 ^{2,3)}
	3.0	6.54 ^{1,2)}	6.56 ^{1,2)}	7.06 ^{1,2)}	6.55 ²⁾	12.05 ²⁾	9.01 ²⁾
	4.0	7.09 ¹⁾	7.07 ¹⁾	7.57 ^{1,2)}	7.05 ^{1,2)}	12.09 ²⁾	10.09 ¹⁾
	5.0	7.11 ¹⁾	7.15 ¹⁾	8.08 ¹⁾	7.54 ¹⁾	13.12 ¹⁾	10.15 ¹⁾

3.5 绵马贯众水萃取部位对不同菌株的抑制作用 由表 5 可以看出,水萃取部位对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和酵母菌 4 种供试菌株均没

有抑制效果;在药敏纸片的含药量分别为 0.5,1.0,2.0 mg 时,绵马贯众水萃取部位对黄曲霉和黑根霉 2 种供试菌株同样没有抑制效果,当药敏纸片的含

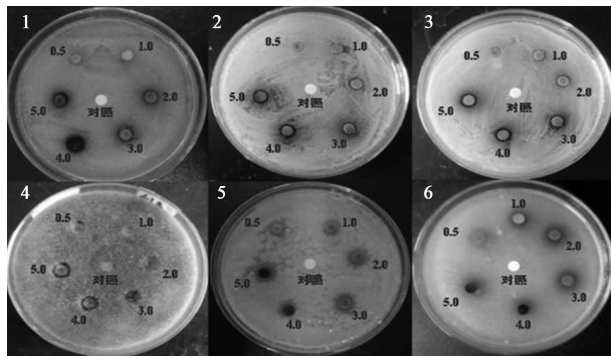


图 4 正丁醇萃取部位对不同菌株的抑制作用
Fig. 4 Bacteriostasis of n-butyl alcohol extract on different strains

药量达到 3.0 mg 时,对黄曲霉和黑根霉 2 种供试菌株表现出轻微的抑制效果,且随着含药量的增加,抑

制效果亦表现出增强的趋势,但不同用量之间的抑菌效果没有显著差异。水萃取部位的抑菌效果见图 5。

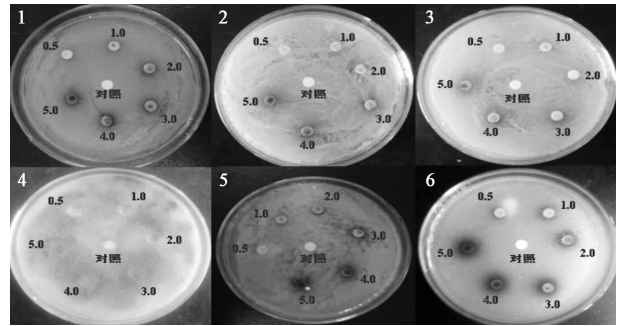


图 5 水萃取部位对不同菌株的抑制作用
Fig. 5 Bacteriostasis of water extract on different strains

表 5 水萃取部位对不同菌株的抑菌圈直径 (n = 4)

Table 5 Bacteriostasis of water extract on different strains (n = 4)

提取部位	含药量/mg	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	枯草杆菌	酵母菌	黄曲霉	黑根霉	mm
水	0.0	-	-	-	-	-	-	
	0.5	-	-	-	-	-	-	
	1.0	-	-	-	-	-	-	
	2.0	-	-	-	-	-	-	
	3.0	-	-	-	-	6.11 ¹⁾	6.20 ^{1,2)}	
	4.0	-	-	-	-	6.24 ¹⁾	6.56 ^{1,2)}	
	5.0	-	-	-	-	6.29 ¹⁾	7.06 ¹⁾	

4 讨论

自然界中有相当多的药用植物能够产生间苯三酚类次生代谢化合物,而且多数间苯三酚类化合物被证实具有良好的抑菌效果,鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物富含多种间苯三酚类化合物,这是其具有良好抑菌效果的物质基础^[8]。香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* 不同产地植株以及植株不同部位中总间苯三酚类化合物的含量不同,总间苯三酚类化合物的含量与抑菌效果成明显的正相关^[9]。香鳞毛蕨中 4 种间苯三酚类成分对变形杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌等菌株的杀菌效果极为显著^[10]。

绵马贯众富含的间苯三酚类化合物是其发挥生物活性的内在基础。绵马贯众石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取部位中总间苯三酚类化合物的含量分别为 7.97%, 64.36%, 54.33%, 9.45%, 0,三氯甲烷萃取部位中的间苯三酚类化合物含量最高,水萃取部位没有测得总间苯三酚类化合物,不同萃取部位中总间苯三酚类化合物含量与其杀线活性存在一定的正相关^[11-12]。本文研究证

实,石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇 4 个部位对 6 种供试菌株均具有中等或较强的抑制活性,水萃取部位对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、酵母菌 4 种供试菌株没有抑菌作用,对黄曲霉和黑根霉只在高浓度条件下才会产生轻微的抑制作用。对每一种供试菌株而言,石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇 4 个萃取部位对每种供试菌种的抑制效果也并不完全与供试部位中总间苯三酚类化合物的含量成正相关,这可能由于不同萃取部位中间苯三酚类化合物的结构和浓度不同,不同供试菌株对间苯三酚类化合物不同结构和浓度的敏感性不同所致。

大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和黄曲霉是常见的人体致病微生物,为此国内外食品、医药等相关行业都将其定为限量微生物^[13]。酵母菌、枯草杆菌和黑根霉都可作为有益微生物用于食品工业,但在特定的条件下也会给人类带来不利的影响,如果酵母菌和枯草杆菌在食品贮存期间大量繁殖,会引起食品腐败变质,缩短贮存周期,降低其商品价值;黑根

霉能污染食品而引起食品霉变,感染蔬菜、粮食作物而出现软腐病^[14]。绵马贯众为我国常用的一味中药,对人体相对安全,绵马贯众中良好的抑菌成分除用于抑制人体致病微生物外,亦可用于开发天然食品防腐剂 and 用于中药材规范化栽培中的植物源杀菌剂。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会,中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:310.
[2] 高学敏.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2009:114.
[3] 高增平.绵马贯众有效成分的研究[D].北京:北京中医药大学,2003,6:11.
[4] 胡昌江,叶茂,邓世蓉,等.绵马贯众、紫萁和单芽狗脊贯众饮片抗菌及凝血试验对比研究[J].中国药物应用与监测,2004,1(4):52-54.
[5] 陈红云,蒋金元,王超芬,等.绵马贯众的抗菌活性研究[J].大理学院学报,2005,4(3):22-23.
[6] 刘钊.绵马贯众抗感染活性成分研究[D].北京:北京协和医学院,2010.
[7] 马文兵,马雪梅,赵平,等.青翘石油醚提取物的抑菌活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):180-182.

[8] Ito H, Muranaka T, Mori K, et al. Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* and their anti-tumor promoting activity[J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(8):1190-1195.
[9] 樊锐锋,黄庆阳,常纓.香鳞毛蕨抑菌特性比较研究[J].东北农业大学学报,2012,43(3):81-84.
[10] 李晓娟.香鳞毛蕨精油和间苯三酚类成分提取分离及其抑菌活性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2012,5:69-79.
[11] Liu J Q, Xie S L, Feng J, et al. Effects of Chloroform Extract of *Dryopteris crassirhizoma* on the ultramicroscopic structures of *Meloidogyne incognita* [J]. Sci World J, 2014, 20(13):31-36.
[12] Liu J Q, Xie S L, Feng J, et al. Protective effect of *Dryopteris crassirhizoma* extracts in the control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. J Plant Dis Protect, 2013, 120 (1):34-40.
[13] 广东出入境检验检疫局编译.国内外技术法规和标准中食品微生物限量[M].北京:中国标准出版社,2002:40.
[14] James M J.现代食品微生物学.徐岩译[M].北京:中国轻工业出版社,2001:21.

[责任编辑 周冰冰]