

# 黄连汤对鸭疫里默氏菌的抑菌作用及对菌体形态的影响

张先福<sup>1</sup>, 韦强<sup>2</sup>, 鲍国连<sup>2\*</sup>, 季权安<sup>2</sup>, 庞安娜<sup>2</sup>

(1. 浙江林学院, 临安 311300; 2. 浙江省农业科学院, 杭州 310021)

**摘要:** 研究中药复方黄连汤水提醇沉浓缩物(Ethanol extracts of *Coptidis rhizoma* decoction, EeCrd)对鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)的体外抑菌规律及其对菌体形态的影响。黄连汤经水提醇沉后, 减压浓缩, 制成含生药  $176 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EeCrd 原液。用 PBS 将原液倍比稀释成  $88, 88 \times 2^{-1}, 88 \times 2^{-2}, \dots, 88 \times 2^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  等 11 个梯度浓度的药液。用纸片扩散法和液体倍比稀释法研究 EeCrd 完全抑菌时的最小抑菌浓度和不完全抑菌时的亚抑菌浓度; 取 88 和  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 浓度组药液分别作用 17 和 3、6、17 h 后的细菌, 用透射电镜观察菌体形态的变化。纸片扩散法和液体倍比稀释法测定的 EeCrd 完全抑制 RA 时的最小浓度均为  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 不完全抑菌时亚抑菌浓度为  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $88 \times 2^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以上稀释度 EeCrd 基本无抑菌活性;  $50 \mu\text{L}$  的  $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组的 EeCrd 作用 RA 17 h 后, RA 菌体浓缩, 变小, 最终死亡;  $50 \mu\text{L}$  的  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组的 EeCrd 作用 RA 3、6、17 h 后, RA 菌体长度变长, 细胞壁变薄, 菌内颜色变浅, 皱褶减少, 纹理不均匀, 菌体干瘪、折叠、弯曲, 最终死亡。EeCrd 可能通过破坏 RA 外膜结构来抑制细菌增殖。

**关键词:** 黄连; 鸭疫里默氏菌; 形态; 透射电镜

中图分类号: S852.61; S853.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0489-06

## Inhibition Activity of *Coptidis rhizoma* Dicoction against *Riemerella anatipestifer* and Its Effects on Morphology of Bacterial Body

ZHANG Xian-fu<sup>1</sup>, WEI Qiang<sup>2</sup>, BAO Guo-lian<sup>2\*</sup>, JI Quan-an<sup>2</sup>, PANG An-na<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, China;

2. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** To investigate inhibition activity of *Coptidis rhizoma* dicoction against *Riemerella anatipestifer* and its effects on morphology of bacterial body, *Coptidis rhizoma* dicoction were prepared with water extraction and alcohol sedimentation method. After vacuum distillation, Ethanol extracts of *Coptidis rhizoma* decoction (EeCrd) which contained crude drug  $176 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  was acquired. This extracts was bi-diluted to make graded concentrations which contained crude drugs  $88, 88 \times 2^{-1}, 88 \times 2^{-2}, \dots, 88 \times 2^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Minimum inhibitory concentration (MIC) and sub-inhibited concentration of EeCrd on *Riemerella anatipestifer* *in vitro* were determined by both disc diffusion test and tube broth assays. Morphology of RA were observed by transmission electron microscope in concentration groups of 88 and  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  of EeCrd in 17 and 3, 6, 17 h, respectively. MIC of EeCrd on RA is  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration group by both two methods, sub-inhibited concentration are  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Above  $88 \times 2^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  concentrations, EeCrd almost have no any antibacterial activities. Under  $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  concentrations of EeCrd with  $50 \mu\text{L}$  in 17 h, lengths of RA body concentrated and got shorter, ultimately died. In  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

收稿日期: 2009-10-28

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y3090613); 浙江林学院科研发展基金(2351000746); 浙江省科技厅重点项目(2005E60014)资助

作者简介: 张先福(1965-), 男, 山西大同人, 副教授, 博士, 主要从事中兽医学、中药药理学研究, Tel: 0571-63744008, E-mail: zhangxianfu@yahoo. cn

\* 通讯作者: 鲍国连, Tel: 0571-86404215, E-mail: Baoguo-lian@163. com

of EeCrd in 3, 6, 17 h, lengths of RA body became longer, cell wall got thinner, the fold inside the body reduced, the texture becomes uneven, finally withered, folded, bent and died. EeCrd achieve the purpose of inhibiting the proliferation of RA by destroying the structure of RA cell wall.

**Key words:** *Coptidis rhizoma*; *Riemerella anatipestifer*; morphology; transmission electron microscope

鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种有荚膜、无芽孢、无鞭毛的革兰氏阴性兼性胞内菌,共有 21 个血清型,引起以纤维素性心包炎、气囊炎、肝周炎、输卵管炎、关节炎和脑膜炎等为主要病变的鸭疫里默氏杆菌病<sup>[1]</sup>。由于 RA 的各血清型之间缺乏交叉保护能力,因而免疫预防效果不佳<sup>[2]</sup>。另外,鸭 F<sub>C</sub> 部位有缺陷的 IgG 在体内占绝对优势,机体也不能通过调理途径和补体途径有效地消灭胞外 RA<sup>[2]</sup>。对兼性胞内菌 RA 而言,体液免疫产生的抗体不能进入细胞内,所以以激活体液免疫为主的各种灭活疫苗只对同株和同型细菌起有限的保护作用。机体清除兼性胞内菌主要依靠细胞免疫。RA 弱毒苗虽然能激发细胞免疫,但存在复壮变强的危险。目前,一旦发生 RA 病,鸭场首选抗菌素治疗,而 RA 对常用抗生素极易产生耐药性。抗生素的使用剂量越来越大,防治 RA 病的效果却越来越差,在很多地区已经难以找到对 RA 敏感的药物<sup>[3-4]</sup>。为此,我们经过反复试验,筛选出了对 RA 具有很强体外抑制作用、对人工复制 RA 病鸭具有显著治疗效果的,由黄连、黄柏、甘草 3 种药物组成的中药复方制剂黄连汤<sup>[5]</sup>。其制作方法已申请国家专利。为了进一步阐明黄连汤防治 RA 病的作用机理,并为研制黄连汤新兽药提供直接的理论依据,本试验研究了黄连汤水提醇沉浓缩物(Ethanol extracts of *Coptidis rhizoma* decoction, EeCrd)体外对 II 型 RA 的抑菌规律及对 RA 菌体形态的作用和影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

组成黄连汤的 3 味中药黄连、黄柏、甘草购自浙江中医药大学第二门诊部。II 型 RA 菌种由浙江省畜牧兽医研究所保存备用。胰蛋白胨大豆琼脂、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)和马丁肉汤培养基,由本实验室制备。

紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;振荡仪,江苏太仓医疗仪器厂;透射电镜,日本电子

(JEOL),型号,JEM-1200EX,加速电压 60 kV,最大放大倍数 10 万倍。

### 1.2 方法

1.2.1 EeCrd 的制备 取黄连 3 g、黄柏 3 g、甘草 6 g,加适量水煎提 2 次,每次分别为 30 min,纱布过滤,合并 2 次滤液,得滤液 120 mL,加 95%乙醇 360 mL,−4 ℃下静置 24 h。滤纸过滤除沉淀,减压蒸馏回收乙醇,继续蒸馏浓缩后得 68 mL 药液。所得药液含黄连汤生药为 176 g · L<sup>-1</sup>。用 PBS 倍比稀释,配成含生药 88、88 × 2<sup>-1</sup>、88 × 2<sup>-2</sup>……88 × 2<sup>-9</sup> g · L<sup>-1</sup> 等 11 个浓度的 EeCrd 药液。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后,−20 ℃保存备用。

1.2.2 药敏纸片制备及纸片扩散测定 将直径 5 mm 消毒滤纸浸入 1.2.1 制备的 11 个不同浓度的 EeCrd 药液里各 1 h,之后取出放 37 ℃温箱烘干备用。经测算,每张滤纸片含有 0.1 mL 的各个不同浓度的 EeCrd 药液。按浓度由大到小排序,每张滤纸片分别含有 8.800、4.400、2.200、1.100、0.550、0.275、0.138、0.069、0.035、0.018 mg 的黄连汤生药。吸取对数生长期(在 37 ℃下 TSB 肉汤振荡培养 12 h,含菌量为 3 × 10<sup>9</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>)的 RA 2 × 100 μL,用玻璃球均匀涂布于 2 块 TSB 琼脂平皿内。待菌液渗透进琼脂内,将烘干的药敏纸片放在平皿内适当位置,37 ℃下恒温培养 30 h。

1.2.3 液体倍比稀释抑菌及 OD 值测定 取试管 14 支,分别加入马丁肉汤各 2 mL。然后在其中 11 支试管里加入 1.2.1 制备的 11 个不同浓度的 EeCrd 药液各 50 μL,之后加入处于对数生长期(在 37 ℃下马丁肉汤振荡培养 10 h)的 RA 各 100 μL(含菌量约为 9 × 10<sup>9</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>),试管总液量达到 2.15 mL。按 EeCrd 药液浓度从大到小排序,各试管中的 EeCrd 绝对质量分别为 4.40、2.20、1.10、0.55、0.28、0.14 mg 等(后面各管质量省略),EeCrd 在试管肉汤中的终浓度为 2.05、1.02、0.51、0.26、0.13、0.07 mg · mL<sup>-1</sup>(后面各管浓度省略)。各试管的 RA 菌体浓度约为 4.18 × 10<sup>8</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>。

另 3 支试管分别设为纯肉汤调零试管、EeCrd 对照试管(肉汤里仅加  $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 EeCrd  $50 \mu\text{L}$ )、RA 对照试管(肉汤里仅加对数生长期 RA  $100 \mu\text{L}$ )。37 °C 振荡培养 17 h。待测定 OD 值时,再临时设 1 个加有对数生长期 RA  $100 \mu\text{L}$  的内含 2 mL 马丁肉汤的试管为“未培养 RA 对照”试管。以纯肉汤试管调零,用紫外可见分光光度计在波长 600 nm 处测定 OD 值。

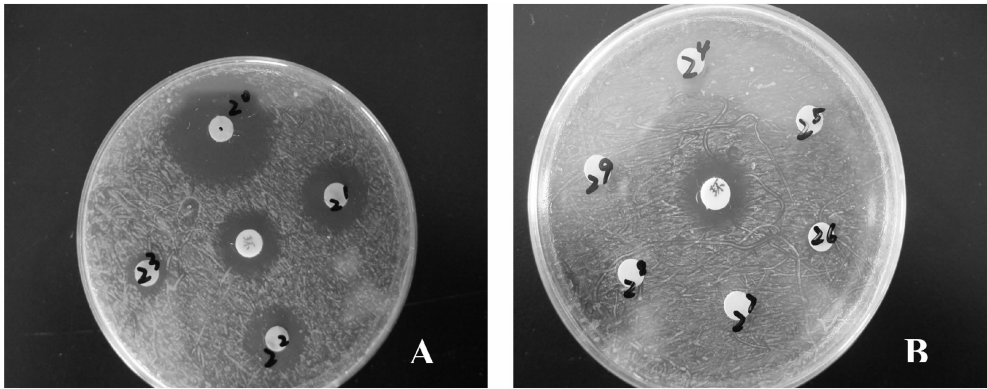
1.2.4 透射电镜观察 取 1.2.3 中的 RA 对照组、88 和  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 药液浓度组分别培养 17 h 和 3、6、17 h 的 RA。以 5 000 g 离心 10 min,吹打,再加适量双蒸水,用悬滴法把样品沾在铜网上,用 2% PTA(磷钨酸)负染,透射电镜下观

察结果。

## 2 结果

### 2.1 纸片扩散法抑菌结果

$88, 88 \times 2^{-1}, 88 \times 2^{-2}, 88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 药液浓度组的抑菌圈直径分别是 28、17、14、10 mm。 $88 \times 2^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以上稀释度浓度组均无抑菌圈。结果见图 1。 $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组抑菌圈直径最大。经计算,对于  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组药敏纸片而言,一张含有 EeCrd 1.100 mg 的纸片,实际大约抑制 RA 菌数为  $3.1 \times 10^6$  个。0.275 mg 以下纸片则基本无抑菌活性。对照环丙沙星药敏纸片抑菌环直径 14 mm。



A.  $88 \sim 88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 浓度组; B.  $88 \times 2^{-4} \sim 88 \times 2^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 浓度组; 中心为环丙沙星对照

A.  $88 \sim 88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd groups; B.  $88 \times 2^{-4} \sim 88 \times 2^{-9} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd groups; The core of two plates are Ciprofloxacin controls

图 1 纸片扩散法抑菌效果

Fig. 1 Inhibition zone by disc diffusion test

### 2.2 液体倍比稀释法抑菌结果

肉眼观察发现, EeCrd 稀释度越大, 肉汤越浑浊, 说明细菌生长越多。见图 2 ( $88 \times 2^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以上稀释度浓度组和 EeCrd 对照试管、未培养 RA 对照试管的图片未附)。稀释度最小的前 3 个浓度组 OD 值均小于未培养 RA 对照组 OD 值 0.131,  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组 OD 值最低, 为 0.103, 表明 EeCrd 在  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑菌效力超过 88 和  $88 \times 2^{-1} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组。随着 EeCrd 稀释度的增加, EeCrd 浓度越来越小,  $88 \times 2^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组 OD 值达到 1.150, 与 RA 对照组的 1.210 差异不显著。 $88 \times 2^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  组 OD 值和 RA 对照组的 OD 值完全一样。说明 EeCrd 在稀释至  $2^{-6}$  倍时, 已没有任何抑菌

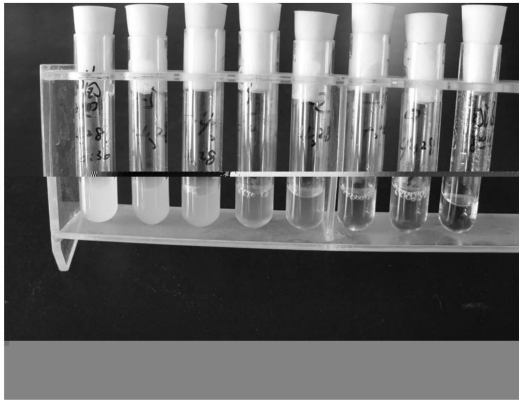
力。 $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  系最高药液浓度, 由该浓度组的 EeCrd 充当 EeCrd 对照组, 其 OD 值只有 0.004, 占未培养 RA 对照组 OD 值的 3%, 仅占 RA 对照组 OD 值的 0.33%, 表明 EeCrd OD 值在所有试验组 OD 值中的所占比例甚微, 不影响与对照组 OD 值的比较结果。总体来讲, 除  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以上 3 个最小稀释度浓度组外, EeCrd 抑制 RA 的能力和其浓度呈正相关。OD 值测定结果见表 1。

### 2.3 透射电镜观察结果

正常里默氏菌 II 型菌外观呈椭圆形, 形似花生, 长约为  $1.5 \mu\text{m}$ , 宽约为  $0.4 \mu\text{m}$ , 细胞壁较厚, 菌体内可见染色深浅不一、比较均匀的皱褶纹理, 见图 3A、3B。有些菌体侧面可见“赘生物”<sup>[6]</sup>, 见图 3A。

表 1 不同浓度 EeCrd 50  $\mu\text{L}$  下 100  $\mu\text{L}$  RA(约  $9 \times 10^8$  cfu)振荡培养 17 h(OD<sub>600 nm</sub> 值)Table 1 100  $\mu\text{L}$  RA (about  $9 \times 10^8$  cfu) cultured with 50  $\mu\text{L}$  EeCrd of different concentrations for 17 h(OD<sub>600 nm</sub> values)

EeCrd 浓度/(g · L <sup>-1</sup> ) EeCrd concentration	OD 值 OD value	EeCrd 浓度/(g · L <sup>-1</sup> ) EeCrd concentration	OD 值 OD value	EeCrd 浓度/(g · L <sup>-1</sup> ) EeCrd concentration	OD 值 OD value	对照 Control	OD 值 OD value
88	0.120	$88 \times 2^{-3}$	0.151	$88 \times 2^{-7}$	1.234	肉汤调零 Broth zero	0.000
$88 \times 2^{-1}$	0.106	$88 \times 2^{-4}$	0.777	$88 \times 2^{-8}$	1.309	EeCrd 对照 EeCrd control	0.004
$88 \times 2^{-2}$	0.103	$88 \times 2^{-5}$	1.150	$88 \times 2^{-9}$	1.195	未培养 RA 对照 Unculture RA control	0.131
		$88 \times 2^{-6}$	1.210	$88 \times 2^{-10}$	1.270	RA 对照 RA control	1.210

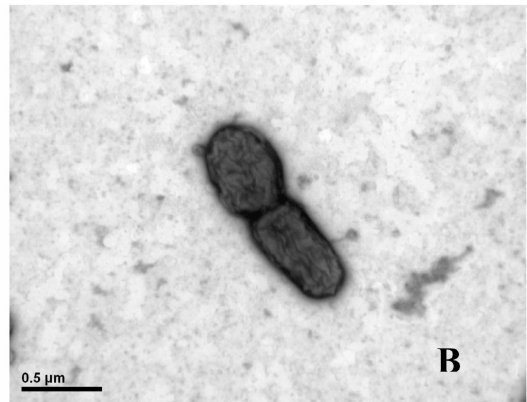
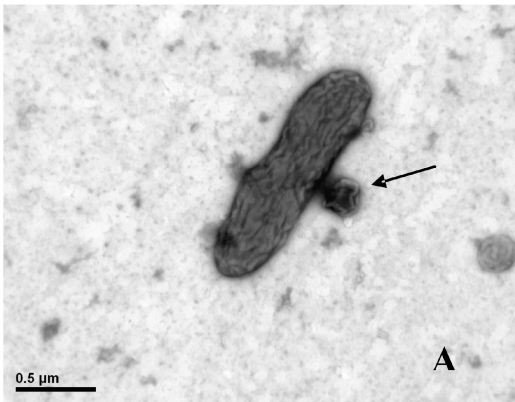


最右管为肉汤调零对照,最左管为 RA 对照。从右向左依次为  $88 \sim 88 \times 2^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 药液浓度组。随着 EeCrd 稀释度增加,肉汤逐步由清亮转向浑浊

The most right tube is broth zero control, the most left tube is RA control. From the right to left are  $88 \sim 88 \times 2^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd groups. With the increase of EeCrd dilution, the broth color shift from the brighter to turbidity gradually

图 2 试管液体倍比稀释法体外抑菌效果

Fig. 2 Inhibition results by tube broth assays



培养 17 h 的正常 RA。菌体像一颗花生,内部有染色较深的皱褶,纹理分布均匀。A. 菌体边有赘生物(箭头所示);B. 菌体边缘无赘生物

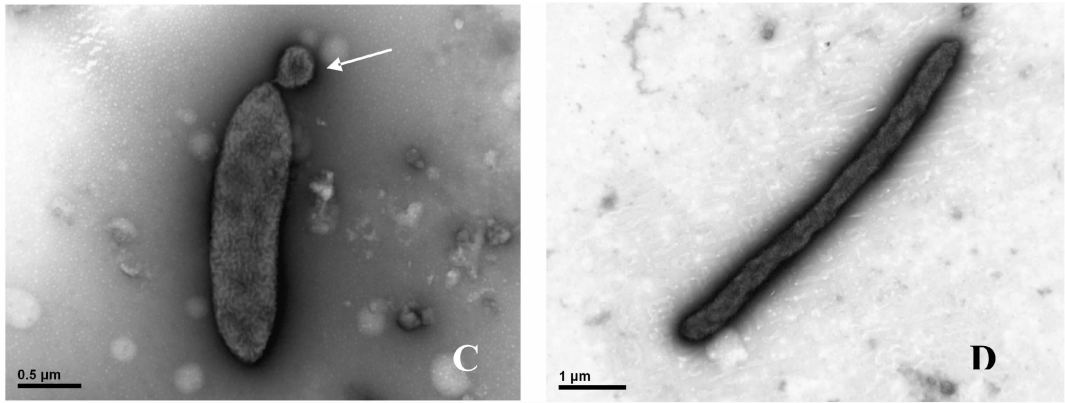
Normal RA cultured in 17 h, like a peanut. The folds are dying deeply, veins inside the bacteria body are well-distributed. A. "vegetation" can be seen on the side of bacteria, arrow showed; B. There is no "vegetation" on the side or top of bacteria

图 3 正常 RA 菌体形态电镜照片 50 000 $\times$ Fig. 3 Morphologic observation of normal bacteria by transmission electron microscope 50 000 $\times$ 

在  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组下,EeCrd 作用 3 h 后,RA 菌体开始变长,细胞壁变薄,菌内颜色变浅,皱褶纹理近乎消失,“赘生物”颜色也变浅,见图 4C;EeCrd 作用 6 h 后,菌体长度达到 5  $\mu\text{m}$ ,细胞壁变薄,是正常 RA 菌长度的 3 倍以上,并且菌体内颜色变得更浅,皱褶纹理几乎消失,见图 4D。EeCrd 作用 17 h 后,细胞壁几乎消失,菌体干瘪和折叠,见图 5E;或细胞壁几乎消失,菌体柔软弯曲,较深染部分高度浓缩于菌体中间一线,“赘生物”膨胀变长,见图 5F。而在  $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 药液浓度下,RA 有的菌体固缩,深染部分集中于中心或边缘几大点,其余浅染,大小为  $0.7 \times 0.4$ ,见图 6G;有的内部断裂,深染部分变少,浅染部分变多,皱褶纹理变得不均匀,见图 6H。

### 3 讨论

3.1 本试验采用水提醇沉方法制作 EeCrd,能最大程度地排除黄连汤中鞣酸、树脂、蛋白质等一般认为没有药效的物质的干扰<sup>[7]</sup>。在 EeCrd 制作过程中,

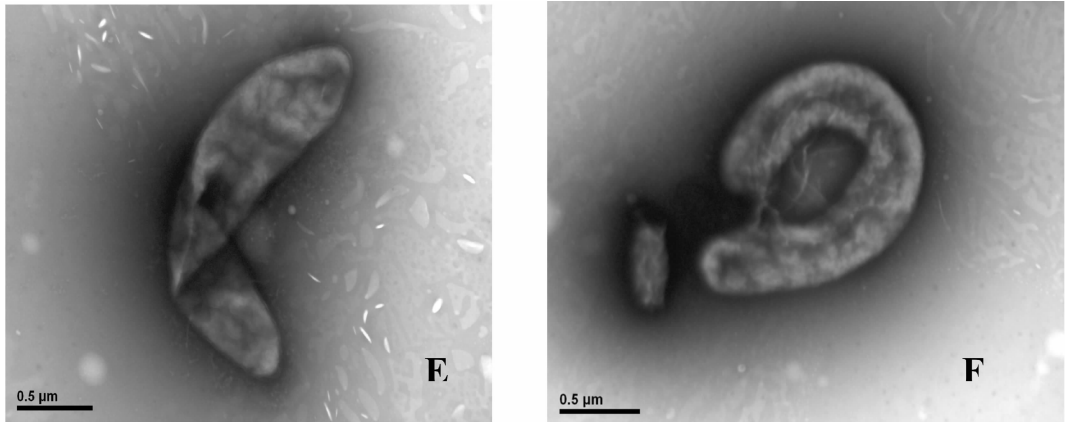


C. 培养 3 h RA, 菌体略变长, 菌体顶端有赘生物(箭头所示, 40 000×); D. 培养 6 h RA, 菌体变得很长(20 000×)

C. RA cultured in 3 h, length of RA body became a little longer. There is a "vegetation" on the top of bacteria, arrow showed (40 000×); D. RA cultured in 6 h, length of RA body became much longer (20 000×)

图 4  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度 EeCrd 作用下的 RA 菌体形态电镜照片

Fig. 4 Morphologic observation of RA in  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration of EeCrd by transmission electron microscope



培养 17 h RA. E. 菌体呈折叠趋势, 内部皱褶浓缩, 纹理消失; F. 菌体呈弯曲状态, 纹理消失

RA cultured in 17 h. E. Bacteria body present a trend of folding up, veins disappear; F. Bacteria body rolled, veins disappear

图 5  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度 EeCrd 作用下的 RA 菌体形态电镜照片 50 000×

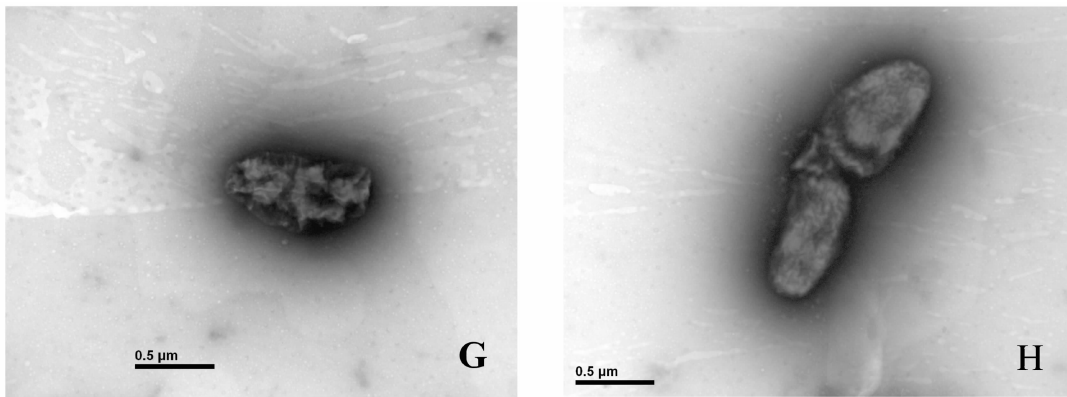
Fig. 5 Morphologic observation of RA in  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration of EeCrd by transmission electron microscope 50 000×

其所含的有效成分历经 2~3 h 的 85~100 °C 高温, 而其抗菌效果不变, 证明其主要有效物质的结构和功效不受高温影响。经 HPLC 测定, EeCrd 含小檗碱  $0.29973 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 药根碱  $0.10866 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 甘草酸  $0.009 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 盐酸小檗碱  $5.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 盐酸巴马汀  $0.254 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  等主要有效成分(《中草药》已录用)。黄连汤生药共含有以上 5 种有效成分的量是  $6.3719 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

**3.2 液体倍比稀释试验中**, 在 2 mL 肉汤中加入 100 μL 对数培养期 RA 和 50 μL 的 EeCrd, 对于  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 EeCrd 而言, 仅相当于加入 1.10 mg 左右的黄连汤生药量。如果就上述 5 种有效成分而言, 仅含有有效部位绝对量 7.00 μg, 药物有效部位浓度仅为  $3.25 \text{ μg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。100 μL 浓度

为  $9 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  对数生长期的 RA, 菌量大约为 9 亿。这就是说在肉汤培养基中, 药物仅仅以 7.00 μg EeCrd 的药量, 即可抑制 9 亿个 RA 的增殖; 纸片扩散法试验中, 1.100 mg 的药敏纸片, 内含 EeCrd 有效成分也为 7.00 μg, 抑制 RA 菌数大约仅为 300 万个。两者抑菌数量不同, 可能是因为纸片扩散法与液体倍比稀释法相比, 药物和 RA 接触不充分。对照组环丙沙星药敏纸片每片含药量为 5 μg, 其抑菌环直径为 14 mm, 和  $88 \times 2^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组抑菌效果大致相同。可见 EeCrd 体外抑菌效果可媲美环丙沙星。此外, EeCrd 的 MIC 比单味药苦参、天南星的最小抗菌浓度也小得多<sup>[8-9]</sup>。说明中药复方比单用具有较好的抑菌效果。

**3.3 研究药物对细菌形态结构的变化影响**, 是研究



培养 17 h 的 RA。G. 菌体浓缩成 1 个圆形；H. 菌体从中间断裂

RA cultured in 17 h. G. Bacteria body concentrated into a circular; H. Bacteria fractured from middle part of the bacteria body

图 6 88 g · L<sup>-1</sup> 浓度 EeCrd 作用下的 RA 菌体形态电镜照片 50 000×

Fig. 6 Morphologic observation of RA in 88 g · L<sup>-1</sup> concentration of EeCrd under transmission electron microscope 50 000×

药物杀菌机理不可缺少的直接前提。有关中药抗菌效果的研究很多,但对中药特别是复方中药有效部位作用下细菌形态的变化研究则较少。用透射电镜观察发现,在低浓度  $88 \times 2^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 下,可能由于 EeCrd 引起细胞壁外层溶解,导致细菌细胞壁变薄,通透性增大。EeCrd 从变薄的通透性增大的细胞壁中进一步进入菌体内,破坏菌内物质,使菌体着色变浅,这和 RA 在室外放置 24 h 死亡后的菌体也有细胞壁变薄、菌体轮廓变大、内容物稀少这一变化具有相似的形态特征<sup>[10]</sup>。其 OD 值比未培养 RA 对照组稍微大一点,说明在开始阶段由于 EeCrd 浓度较低,EeCrd 和 RA 互相作用时,部分 RA 能稍微做一些抵抗,只是在后期才不敌药物作用而受到抑制,进而死亡。由于细胞壁的黏多糖有一定的韧性,随着药物作用时间延长,促使菌体拉长,而拉长的菌体又导致细菌外膜通透性增大,引起细菌胞质内容物大量泄漏,导致菌体折叠、弯曲。在高浓度  $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EeCrd 下,EeCrd 可能直接引起细胞壁破坏,引起细菌断裂、菌体内物质大量泄漏而缩小。总之,EeCrd 可能是通过破坏 RA 外膜结构,引起菌内物质丢失和泄漏,而抑制 RA 增殖的。这与苦参粗提物<sup>[8]</sup>和蜂毒肽<sup>[6]</sup>促使细胞质固缩、质壁分离,进而杀菌的机制相似,但与天南星的醇浸剂通过裂解大肠杆菌成为碎片而达到杀菌作用的机制不同<sup>[9]</sup>。

青霉素发明后,通过电镜发现青霉素作用下的大肠杆菌细胞膜出现了一个隆起,隆起继而膨胀、破裂,细菌死亡。后来发现青霉素是通过抑制细菌细胞壁黏肽的合成而抗菌的。至于 EeCrd 抑制 RA 的详细分子机制,则需继续研究。

#### 参考文献:

- [1] SANDHU T S, LEISTER M L. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from poultry in different countries[J]. *Avian Pathology*, 1991, 20: 233-239.
- [2] HIGGINS D A, HENRY R R, KOUNEV Z V. Duck immune responses to *Riemerella anatipestifer* vaccines[J]. *Development and Comparative Immunology*, 2000, 24: 153-167.
- [3] 鲍国连, 韦 强, 佟承刚, 等. 鸭传染性浆膜炎疫苗的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6): 414-416.
- [4] CHANG C F, LIN W H, YEH T M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and the efficacy of ceftiofur treatment[J]. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15: 26-29.
- [5] 张先福. 中药防治鸭疫里氏杆菌病的组方筛选及其抗菌机制的初步研究[R]. 浙江省农业科学院博士后研究报告, 2006.
- [6] 王关林, 那 杰, 潘凌子, 等. 蜂毒肽抑杀病原菌的超微结构观察[J]. 中国科学 C 辑(生命科学), 2009, 39(5): 512-517.
- [7] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 296, 440-441, 652-653, 753-754.
- [8] 王关林, 唐金花, 蒋 丹, 等. 苦参对鸡大肠杆菌的抑菌作用及其机理研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 1018-1024.
- [9] 王关林, 蒋 丹, 方宏筠. 天南星的抑菌作用及其机理研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3): 280-285.
- [10] 韦 强, 鲍国连, 季权安, 等. 鸭疫里氏杆菌形态特征的电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3): 314-317.