

## 常用中草药对 4 种病原弧菌体外抗菌效果的研究

梁利国<sup>1,2</sup> 阎斌伦<sup>1</sup> 张晓君<sup>1\*</sup> 秦国民<sup>1</sup> 杨家新<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 淮海工学院, 连云港 222005)

(<sup>2</sup>南京师范大学生命科学学院, 210046)

**摘要** 采用琼脂扩散法(打孔法)测定了五倍子等 18 种中草药对鳃弧菌、副溶血弧菌、河口弧菌及霍乱弧菌等 4 种病原弧菌的抑制作用。结果表明,五倍子、苏木、地锦草、石榴皮、黄芩、虎杖和山楂等 7 种中草药对病原弧菌具有较好的抑菌效果,而金银花等 11 种中草药抑菌作用较弱;同时采用试管连续稀释法,测定了五倍子等抑菌效果较强的 7 种中草药对 4 种病原弧菌的抑菌和杀菌浓度。结果表明,苏木、五倍子、地锦草和石榴皮 4 种中药具有较好的抑菌和杀菌作用,此 4 种中药对鳃弧菌、副溶血弧菌、河口弧菌及霍乱弧菌等 4 种病原弧菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.78~6.25 mg/ml,最小杀菌浓度(MBC)为 3.12~12.5 mg/ml。

**关键词** 中草药 弧菌 最小抑菌浓度 最小杀菌浓度

**中图分类号** S948

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-7075(2010)02-0114-06

### Study on the antibacterial effects of common Chinese herbs against four pathogenic *Vibrio* sp. *in vitro*

LIANG Li-guo<sup>1,2</sup> YAN Bin-lun<sup>1</sup> ZHANG Xiao-jun<sup>1\*</sup>

QIN Guo-min<sup>1</sup> YANG Jia-xin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

(<sup>2</sup>College of Life Sciences, Nanjing Normal University, 210046)

**ABSTRACT** The inhibitory effects of 18 Chinese herbs on *Vibrio anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. aestuarianus* and *V. cholerae* were tested by disc diffusion method (punch method). The results showed that 7 Chinese herbs including *Galla chinensis*, *Caesalpinia sappan*, *Herba euphorbiae*, *pomegranate bark*, *Radix scutellariae*, *Polygonum cuspidatum* and *Fructus Crataegi* can effectively inhibit the growth of 4 pathogenic *Vibrio* sp., and the other 11 Chinese herbs showed less inhibition. At the same time, the minimal inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of the 7 Chinese herbs which had significant inhibitory effects to *Vibrio* sp. were tested by the tube dilution. The results showed that *Caesalpinia sappan*, *Galla chinensis*, *Herba euphorbiae* and *Pomegranate bark* had significant inhibitory and bactericidal effects, and the minimal inhibitory concentrations of *Caesalpinia sappan*, *Galla chinensis*, *Herba euphorbiae* and *Pomegranate bark* for 4 pathogenic *Vibrio* sp. were among

江苏省自然科学基金项目(BK2009163)、“十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD09A01)和连云港市科技攻关项目(CN0826)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: zxj9307@163.com

收稿日期: 2009-09-03; 接受日期: 2009-10-18

作者简介: 梁利国(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物疾病学研究。E-mail: heplic@sina.com, Tel: 15961309684

0.78~6.25 mg/ml, the minimal bactericidal concentrations were 3.12~12.5 mg/ml.

**KEY WORDS** Chinese herbs *Vibrio* sp. Minimal inhibitory concentration  
Minimum bactericidal concentration

由弧菌属 *Vibrio* 细菌引起的弧菌病 (Vibriosis) 是在世界各地养殖鱼、虾、蟹及贝类等水产动物中普遍流行且危害最大的细菌性疾病, 给水产养殖业造成了严重的经济损失(杨少丽等 2005; 李亚晨等 2004)。据报道, 弧菌属中的鳃弧菌 *V. anguillarum*、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* 等在弧菌种群中占优势, 广泛存在于自然海水中, 导致弧菌病在全世界发生, 且具有流行广、发病率高、危害大、死亡率高等特点, 给鱼、虾、蟹及贝类等海水动物的养殖造成了巨大的影响。河口弧菌 *V. aestuarianus* 是由 Tison 等(1983)首次报道, 该菌分离自 Oregon 和华盛顿海岸的海水、牡蛎和蟹等(Tison *et al.* 1983), 是引起牡蛎夏季大量死亡的病原菌(La-breuche *et al.* 2006); 霍乱弧菌 *V. cholerae* 为弧菌属的模式种 (Type species), 该菌是引起人类霍乱 (Cholera) 的病原菌, 其中的非 O1 群霍乱弧菌广泛分布于水环境, 已知有不少血清型株能引起水产动物感染发病 (Reddacliff *et al.* 1993; 翟子玉等 1993; 王立平等 2006; 杨鸢劼等 2006)。此外, 非 O1 群霍乱弧菌有时可引起人类散发胃肠炎, 在特殊条件下也可引起败血症、脑膜炎和伤口感染等肠道外感染, 为人和水产养殖动物共染的病原菌。

在海水养殖动物细菌性疾病防控方面, 目前在养殖生产中仍然依赖于化学合成药物或抗生素类药物来控制这些细菌性疾病的发生与流行, 但在长期的药物使用中, 人们逐步认识到此类药物治疗存在很多不足: 一是病因复杂, 大量用药存在盲目性, 很多疾病尚无针对性的有效药物; 二是一些化学药物菌谱范围窄, 预防作用弱, 而且病鱼往往因厌食难以摄取到有效的药物剂量; 三是药物在动物体中残留, 危害到人类的健康, 且长期用药带来环境污染, 破坏了水体微生态的平衡和物质循环, 并导致耐药性微生物大量出现; 此外, 长期在药物“保护作用”下使大量本应被淘汰的抗病力弱的个体存活下来且在种群中所占比例逐渐增大而导致整个群体的抗病能力下降, 严重影响了养殖业的发展。中草药是天然药物, 具有无抗药性、无残留、无副作用、无环境污染、不引发药源性疾病, 且抑菌杀菌效果明显, 同时还能改善机体自身免疫力, 提高抗病能力, 备受人们关注(李明锋 2003)。因此, 本试验选用 18 种中草药对 4 种常见水产致病性弧菌进行了药物敏感性测定, 同时进行了体外抑菌和杀菌试验, 以期为由弧菌引起的常见细菌性疾病防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 中草药及来源

用于试验的 18 种中草药: 五倍子 *Galla chinensis*、大黄 *Rheum officinale*、虎杖 *Polygonum cuspidatum*、菊花 *Dendranthema morifolium*、金银花 *Flos lonicerae*、苦参 *Sophorae flavescens*、板蓝根 *Radix isatidis*、黄芩 *Radix scutellariae*、石菖蒲 *Acorus tatarinowii*、黄芪 *Astragalus membranaceus*、地锦草 *Herba euphorbiae*、石韦 *Folium pyrrosiae*、石榴皮 *Pomegranate bark*、苏木 *Caesalpinia sappan*、槟榔 *Areca catechu*、陈皮 *Pericarpium citri*、土茯苓 *Rhizoma smilacis* 和山楂 *Fructus crataegi*, 均购自连云港市康济大药房。

### 1.2 供试菌株及其来源

供试鳃弧菌及河口弧菌分离自连云港市某水产养殖场发病死亡半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther, 且人工感染试验证明两种细菌均为引起半滑舌鲷发病死亡的病原细菌; 副溶血弧菌分离自连云港市赣榆某养殖场发生毁灭性死亡的凡纳滨对虾; 霍乱弧菌分离自连云港市东海县病死泥鳅; 4 种病原弧菌均已通过表型及分子生物学鉴定, 于 4℃ 冰箱保存供试验用。

### 1.3 中草药药液的制备

18 种中草药各取 25 g, 用 250 ml 蒸馏水浸泡 30 min 后煎煮, 沸后用文火煎煮 30 min, 4 层纱布过滤, 再微

沸煎煮两次,合并所得药液,浓缩至25 ml,使其终浓度相当于原药1 g/ml,浓缩后的水煎液分别装入100 ml三角瓶,煮沸30 min灭菌,4℃冰箱内保存待用。

#### 1.4 菌液的制备

将供试4种弧菌纯培养物移接于普通营养肉汤管中,置28℃培养18 h后供试验用,菌液浓度为 $3 \times 10^8$  CFU/ml。

#### 1.5 抑菌作用的测定

以灭菌棉拭子蘸取供试弧菌的菌悬液分别均匀涂布接种于直径9 cm普通营养琼脂平板,待自然稍干后,再用直径0.7 cm的灭菌打孔器在每个涂菌的固体培养基平板上均匀打4个孔,并排列成正方形,保持相邻两孔的距离大于2 cm,以免相邻的抑菌圈重叠影响测量的准确性。向孔中滴加供试中草药液,每孔15  $\mu$ l,置28℃培养,培养24 h后观察并测量抑菌圈直径的大小,每孔取不同方向测量4次,最终求4次测量的平均值。判定方法参照叶应妩等(1997)编写的《全国临床检验操作规程》,以抑菌圈直径在20 mm及其以上判定为高度敏感(HS)、在10~19 mm判定为敏感(S)、无抑菌圈(记作0)形成或小于10 mm的判定为耐药(R)。

#### 1.6 最小抑菌浓度的测定

根据抑菌作用的测定结果,结合实际生产中中草药的来源是否方便、价格是否合理等因素,选取五倍子等7种中草药的浓缩液,采用两倍稀释法对供试弧菌进行最小抑菌浓度测定。即用灭菌生理盐水将药液稀释至(1 000~2.0) mg/ml的10个倍比系列浓度。在盛有2.7 ml灭菌的营养肉汤液体培养基的试管中分别加入0.3 ml稀释后的药液,使各管药液终浓度至(100~0.2) mg/ml。最后在不同浓度的药物培养基中分别加入0.1 ml的菌液,第11管为不加药液的阳性对照,置28℃培养36 h,肉眼观察,无菌生长试管中的最低药物浓度即为最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。

#### 1.7 最小杀菌浓度的测定

吸取各种药物的MIC和高于MIC 1个梯度的试管中的培养物0.1 ml,转接于普通营养琼脂培养基平板,28℃培养2 d后观察有无菌落形成,无菌落形成的相应试管中的药物浓度即为该种药物对供试弧菌的最小杀菌浓度(Minimal Bactericidal Concentration, MBC)。

## 2 结果

### 2.1 药物敏感性测定结果

4种病原弧菌对18种中草药的敏感程度见表1。结果表明,鳃弧菌对苏木高度敏感,对五倍子、大黄、石榴皮、黄芩、虎杖、山楂、地锦草和菊花等8种中草药敏感,对其他9种中草药为耐药;副溶血弧菌对五倍子、石榴皮、黄芩、苏木、地锦草和菊花等6种中草药敏感,对其他12种中草药均耐药;河口弧菌对五倍子、石榴皮、苏木和地锦草等4种中草药高度敏感,对大黄等其他14种中草药均敏感;霍乱弧菌对苏木高度敏感,对大黄、石榴皮、黄芩、山楂、地锦草和菊花等6种中草药敏感,对其他11种均耐药。综合4种病原弧菌对18种中草药的敏感程度,可见苏木、五倍子、地锦草、黄芩、虎杖、石榴皮和山楂等7种中药对鳃弧菌、副溶血弧菌、河口弧菌及霍乱弧菌等4种病原弧菌均具有较好的抑菌效果。

### 2.2 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

对上述抑菌效果较好的7种中草药进行对4种病原弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度测定,结果见表2。由表2可见,苏木对4种病原弧菌的最小抑菌浓度为(0.78~3.12) mg/ml,最小杀菌浓度为(1.56~6.25) mg/ml;五倍子对4种病原弧菌的最小抑菌浓度为(1.56~3.12) mg/ml,最小杀菌浓度为(3.12~6.25) mg/ml;

表 1 18 种中草药对 4 种病原弧菌的抑菌效果

Table 1 Inhibitory effects of 18 Chinese herbs on 4 pathogenic *Vibrio* sp.

中草药 Chinese herb	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>		副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>		霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>		河口弧菌 <i>V. aestuarianus</i>	
	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(mm)	敏感性 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(mm)	敏感性 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(mm)	敏感性 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(mm)	敏感性 Sensitivity
五倍子 <i>Galla chinensis</i>	17.2	S	18.4	S	19.1	S	25.2	HS
大黄 <i>Rheum officinale</i>	10.2	S	8	R	11.3	S	10.2	S
石榴皮 <i>Pomegranate bark</i>	15.1	S	15.4	S	14.1	S	22.4	HS
石菖蒲 <i>Acorus tatarinowii</i>	0	R	0	R	0	R	9	R
黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	0	R	0	R	0	R	9	R
黄芩 <i>Radix scutellariae</i>	15.3	S	10.3	S	11.4	S	10.1	S
虎杖 <i>Polygonum cuspidatum</i>	10.4	S	8.2	R	9.5	R	15.3	S
山楂 <i>Fructus crataegi</i>	10.2	S	9.4	R	15.3	S	17.2	S
土茯苓 <i>Rhizoma smilacis</i>	0	R	8	R	9.1	R	10.1	S
苏木 <i>Caesalpinia sappan</i>	21.3	HS	18.6	S	22.5	HS	30.6	HS
地锦草 <i>Herba euphorbiae</i>	15.2	S	13.5	S	12.4	S	24.4	HS
金银花 <i>Flos lonicerae</i>	0	R	0	R	0	R	16.2	S
槟榔 <i>Areca catechu</i>	0	R	0	R	0	R	12.1	S
苦参 <i>Sophorae flavescens</i>	0	R	0	R	0	R	12.2	S
菊花 <i>Dendranthema morifolium</i>	10.1	S	10	S	10	S	12.4	S
陈皮 <i>Pericarpium citri</i>	0	R	0	R	9	R	15.2	S
石韦 <i>Folium pyrrosiae</i>	9	R	0	R	0	R	14.3	S
板蓝根 <i>Radix isatidis</i>	0	R	0	R	7	R	10.2	S

注:抑菌圈直径包括孔径 0.7 cm

地锦草对 4 种病原弧菌的最小抑菌浓度为(1.56~6.25)mg/ml,最小杀菌浓度为(3.12~12.5)mg/ml;黄芩对 4 种病原弧菌的最小抑菌浓度为(3.12~12.5)mg/ml 之间,最小杀菌浓度为(6.25~25)mg/ml;虎杖对 4 种病原弧菌的最小抑菌浓度为(6.25~25)mg/ml,最小杀菌浓度为(25~100)mg/ml 之间;石榴皮对 4 种病原弧菌的最小抑菌浓度为(1.56~3.12)mg/ml,最小杀菌浓度为(3.12~6.25)mg/ml;山楂对 4 种病原弧菌的最小抑菌浓度为(3.12~12.5)mg/ml,最小杀菌浓度为(6.25~25)mg/ml。综合上述结果,苏木、五倍子、地锦草和石榴皮 4 种中药具有较好的抑菌和杀菌作用,其次为黄芩和山楂,虎杖的抑菌和杀菌作用较差。

表 2 7 种中草药的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度(单位:mg/ml)

Table 2 The minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration of 7 Chinese herbs to 4 pathogenic *Vibrio* sp. (unit:mg/ml)

中草药 Chinese herb	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>		副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>		霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>		河口弧菌 <i>V. aestuarianus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
苏木 <i>Caesalpinia sappan</i>	1.56	3.12	3.12	6.25	1.56	3.12	0.78	1.56
五倍子 <i>Galla chinensis</i>	3.12	6.25	3.12	6.25	1.56	3.12	1.56	3.12
地锦草 <i>Herba euphorbiae</i>	3.12	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5	1.56	3.12
黄芩 <i>Radix scutellariae</i>	3.12	6.25	12.5	25	12.5	25	12.5	25
虎杖 <i>Polygonum cuspidatum</i>	6.25	50	25	100	12.5	50	6.25	25
石榴皮 <i>Pomegranate bark</i>	3.12	6.25	3.12	6.25	3.12	6.25	1.56	3.12
山楂 <i>Fructus crataegi</i>	6.25	12.5	12.5	25	3.12	6.25	3.12	6.25

### 3 讨论

在选择防治鱼病的药物时,既要考虑低浓度就能杀死病原菌,或者抑制其繁殖,又要保证低残留无污染,同时还希望所选用的药物能够增进养殖动物的机体免疫力,增强其抗病能力,如果运用得好,中草药则能满足这些要求。中草药成分复杂,包括生物碱、多糖、皂甙、萜类、有机酸等,其抑菌作用主要机理为干扰细胞壁合成,伤胞浆膜,影响细胞蛋白合成,影响核酸合成,干扰遗传密码复制等(宋学宏等 2001)。中草药还可以诱导鲈鱼摄食(张琳琳等 2008)。并且中草药还具有免疫调节作用,主要是通过激活网状内皮系统和补体、激活巨噬细胞和 T、B 淋巴细胞以及诱生多种细胞因子等途径来增强机体免疫能力(温周瑞等 2004)。

关于中草药在水产动物疾病防治中的应用已多有记载和报道。高汉娇等(1996)用 21 种中草药对嗜水气单胞菌进行了试管内抑菌试验,结果表明,五倍子、大黄和黄芩等对嗜水气单胞菌的抑菌作用最强;喻运珍等(1999)选用五倍子、青蒿、秦皮等中草药对从中华鳖上分离的嗜水气单胞菌进行抑菌试验,结果表明,嗜水气单胞菌对五倍子、鱼腥草、乌梅等高度敏感;王玉娥等(2008)选用 34 种中草药对 5 种海洋致病性弧菌进行敏感性测定,结果表明,溶藻弧菌、哈氏弧菌、副溶血弧菌、河流弧菌和麦氏弧菌对乌梅、黄连、木瓜和五倍子等具有较高的敏感性;朱壮春等(2007)用倍比稀释法测定了 30 种中草药对牙鲆迟钝爱德华氏菌的体外抗菌活性,结果表明,五倍子、诃子、黄芩、秦皮和红藤的抑菌作用明显;毛芝娟等(2001)研究了穿心莲、石榴皮、大黄、五倍子和五味子的抑菌活性,发现五倍子煎煮液对溶藻弧菌和副溶血弧菌均有很强的抑菌活性,而大黄对副溶血弧菌显示出强抗菌性,对溶藻弧菌作用较弱;金珊等(2000)研究引起海水养殖鲈鱼皮肤溃疡病原-哈氏弧菌对地榆、石榴皮和五倍子等 3 种中草药高度敏感。张晓君等(2009)选用 20 种中草药对从长鳍真鲨上分离出的哈氏弧菌进行了药物敏感性测定,结果表明,哈氏弧菌对地锦草、石韦、虎杖、苏木、五倍子和黄芩等高度敏感,其中,苏木、五倍子和地锦草具有极强的抑菌作用。张明等(2005)证实,黄芩、白头翁、鱼腥草、五倍子和石榴皮等 5 种中药对鳗弧菌的抑菌作用效果显著。钟全福等(2002)选取具有清热、解毒和抑菌等功能的中草药 20 种对欧洲鳗病原菌进行了单独抑菌、联合抑菌及中药、抗菌制剂联合抑菌试验。结果显示,黄连、大黄、地锦草、黄芩和乌梅对所用病原菌具有明显抑制作用,黄芪、板蓝根、公丁香、白花蛇草和重楼对非 O1 群霍乱弧菌具较强的抑制作用。

本试验以 18 种中草药对 4 种常见水产致病性弧菌进行了抑菌作用测定,结果表明,苏木、五倍子、地锦草和石榴皮 4 种中药对供试 4 种病原弧菌均具有较好的抑菌和杀菌作用,说明使用中草药防治由病原弧菌引起的水产动物疾病是较为可行的。本试验是在体外进行的中草药对水产致病性弧菌的抑菌作用研究,其结果可供参考,实际用药时还要考虑水产养殖动物对该药物的耐受能力,在疾病防治上要合理恰当的选择药量,正确的用药浓度是既能有效抑制病菌生长,又不致于损害水产动物。

中草药以其兼有的药物性和营养性及资源丰富、天然绿色、高效低毒以及抗药性不显著、性能多样化等特点,被广泛用于防治各类水生经济动物病害,取得了一定成效,积累了丰富的经验。但目前中草药防治鱼病的知识和经验尚不能满足生产上的需要,国内外关于此方面的研究较少。因此,今后我们既要借鉴中医理论逐步弄清楚渔用中草药的主要成分和功效,又要广泛开展应用研究,筛选出具有较好的防治效果的中草药和中西药结合的配方,从而达到标本兼治的目的。

### 参 考 文 献

- 王立平,张晓华,刘 镁,段爱梅,宋晓玲,徐怀恕. 1997. 中国对虾糠虾幼体病原菌(非 O1 群霍乱弧菌)的研究. 中国水产科学,4(1):45~51
- 王玉娥,邢晨光,王国良. 2008. 5 种海洋致病性弧菌对 34 种中草药敏感性的测定. 水产科学,27(5):221~225
- 毛芝娟,卓华龙,杨季芳,吴雄飞. 2001. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡,20(2):187~192
- 叶应妩,王毓三. 1997. 全国临床检验操作规程(第 2 版). 南京:东南大学出版社,553~562
- 李亚晨,包永明,吕建发,安利佳. 2004. 海洋水产动物弧菌病的生物防治. 水产科学,23(2):35~38
- 李明锋. 2003. 中草药(Chinese herb medicine)防治水产动物疾病的研究进展. 现代渔业信息,18(8):10~14
- 朱壮春,史相国,张淑杰,姜广健,邢朝斌,赵亚龙,李占军,吴 鹏. 2007. 中草药对牙鲆病原迟钝爱德华氏菌的体外抑制作用研究. 水产科学,26

