

22 味中草药对创伤弧菌和灿烂弧菌体外抑菌作用筛选

闫茂仓¹, 陈少波¹, 单乐州¹, 马爱敏¹, 谢起浪¹, 戴 丝^{1,2}, 李尚鲁¹

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005;

2. 中国计量学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

摘要:研究了 22 味中草药对创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和灿烂弧菌(*V. splendidus*)的体外抑菌作用。结果显示, 22 味中草药对其均有不同程度的抑制作用;其中, 黄连和连翘对创伤弧菌的抑菌和杀菌效果最好, 最小抑菌浓度分别为 0.49 mg/mL 和 1.95 mg/mL, 最小杀菌浓度与最小抑菌浓度相同;黄连、黄芩、连翘和黄柏对灿烂弧菌的抑菌和杀菌效果较好, 最小抑菌浓度分别为 0.98、1.95、1.95 和 3.90 mg/mL, 最小杀菌浓度分别为 0.98、1.95、1.95 和 7.81 mg/mL。

关键词:中草药;创伤弧菌;灿烂弧菌;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度

中图分类号:S948 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2010)02-0095-04

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和灿烂弧菌(*V. splendidus*)是对海水养殖鱼类危害较大的弧菌。目前的报道主要是危害黄姑鱼(*Nibea albiflora*)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、石鲈(*Kareius bicoloratus*)、鳗鲡(*Anguilla anguilla*)和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)等, 每年给水产养殖业造成巨大的经济损失(沈志强等, 2001; 简纪常等, 2003; 许斌福等, 2005; 郑芳艳等, 2005; 赵典惠等, 2007; 马爱敏等, 2008; 于兰萍等, 2008)。

中草药是天然药物, 因其无抗药性、无残留、无副作用、不引发药源性疾病及抑菌杀菌效果明显而备受人们关注, 金珊等(1999)、郑天伦等(2005)和曹俊辉等(2008)分别报道了不同中草药对鳗弧菌(*V. anguillarum*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和温和气单胞菌(*A. sobria*)的抑菌效果。本实验测定了黄芩等 22 味中草药对创伤弧菌和灿烂弧菌的体外抑菌作用, 从中筛选出对其有较好体外抑制作用的中草药, 旨在为该菌引起的暴发性鱼病的防治和进行非特异性免疫试验提供参考。

收稿日期:2009-08-13

基金项目:浙江省科技厅科研院所专项公益技术攻关项目(2007F10009);浙江省科技厅科研院所青年人才计划项目(2006R20001);温州市科技兴海项目(S20070051)。

通讯作者:陈少波, 1965 年生, 男, 浙江温州人, 教授级高工, 博士。E-mail: chenshaobo@hotmail.com

作者简介:闫茂仓, 1981 年生, 男, 山东菏泽人, 助理研究员, 主要从事海水养殖及病害防治研究。E-mail: yanmaocang@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

创伤弧菌和灿烂弧菌由本实验室分离保存。

1.1.1 ZOBELL 2216E 培养基 酵母膏 1.0g, 蛋白胨 5.0 g, 磷酸铁 0.01 g, 琼脂 16.0 g, 陈海水 1 000 mL, 调 pH 7.4~7.6, 分装, 121℃, 高压灭菌 20 min。

1.1.2 TCBS 培养基 酵母粉 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 硫代硫酸钠 10.0 g, 柠檬酸钠 10.0 g, 牛胆盐 8.0 g, 蔗糖 20.0 g, 氯化钠 10.0 g, 柠檬酸铁 1.0 g, 溴麝香草酚蓝 0.04 g, 琼脂 14.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调 pH 值(8.6±0.2);购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.1.3 中草药 实验所用的 22 味中草药为黄芩、大黄、黄连、黄柏、连翘、牡丹皮、金银花、肉苁蓉、艾叶、大青叶、鱼腥草、板蓝根、贯众、甘草、白术、杜仲、柴胡、山豆根、黄芪、猪苓、茯苓和五灵脂;所有中草药均购自浙江省温州市中医院。

1.2 实验方法

1.2.1 药液的制备 称取黄芩等 22 味中草药各 50 g, 切细磨碎, 加 500 mL 蒸馏水, 煮沸 30 min, 过滤, 药渣再加水 500 mL, 煮沸 30 min, 过滤, 合并 2 次滤液, 加热蒸发浓缩至 50 mL, 使生药含量为 1g/mL。4℃冰箱保存备用。

1.2.2 菌液的制备 选择黄姑鱼、美国红鱼致病菌创伤弧菌和灿烂弧菌, 取一环试验菌种接种于 ZOBELL 2216E 液体培养基, 28℃培养 6 h, 调节菌液浓度约为 1×10^9 CFU/mL, 再用液体培养基作 1:1 000 倍稀释后备用。供试菌液浓度在 1×10^6 CFU/

mL左右。

1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定 首先配置 ZOBELL 2216E 液体培养基,然后每味中草药组取 180 mm × 15 mm 无菌试管 10 支,每只试管加入 10 mL 液体培养基。以无菌操作吸取已制备好的供试药液 10mL 加入第 1 管中,混匀后吸取 10 mL 加入第 2 管中,依次倍比稀释至第 10 管,弃去 10 mL。115℃ 灭菌 15 min。1 ~ 10 管均加入试验菌液 30 μ L,混匀,28℃ 培养 18 ~ 20 h 后观察结果。凡是药物最高稀释管中清澈透明、无细菌生长者,该管的浓度即为该种药物对该菌的最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)。

1.2.4 最小杀菌浓度(MBC)的测定 在 MIC 实验基础上,从无明显细菌生长的各管取材,分别涂布于相应的无菌 TCBS 平板培养基,于恒温培养箱培养 48 h,观察结果。琼脂平板上无细菌生长且含药液最少一管的药液浓度,即为该种药物对该菌的最低杀菌浓度(Minimal Bactericidal Concentration, MBC)。

2 结果

2.1 中草药对创伤弧菌的抑菌效果

22 味中草药对创伤弧菌的抑菌结果如表 1 所示。除茯苓外,各组中药提取液均具有一定的抑菌效果,以相同量的药物提取液进行抑菌试验,抑菌效果强弱不同;其中,黄连和连翘对创伤弧菌的抑菌和杀菌效果最好,最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.49 mg/mL 和 1.95 mg/mL;最小杀菌浓度(MBC)也以这 2 味中草药最低,与 MIC 相同。黄柏、黄芩、牡丹皮、艾叶、金银花、大黄、肉苁蓉等也表现出了较高的抑菌和杀菌能力,但浓度稍高于黄连和连翘,抑菌浓度为 3.91 ~ 7.81 mg/mL,杀菌浓度为 3.91 ~ 62.50 mg/mL。

2.2 中草药对灿烂弧菌的抑菌效果

22 味中草药对灿烂弧菌的抑菌结果如表 2 所示。各组中药提取液均具有一定的抑菌效果,但抑菌效果强弱不同;黄连、黄芩、连翘和黄柏对灿烂弧菌的抑菌效果较好,最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.98、1.95、1.95 和 3.91 mg/mL。这 4 味中草药的最小杀菌浓度(MBC)也最低,分别为 0.98、1.95、1.95 和 7.81 mg/mL,均值达 3.17 mg/mL。大黄、牡丹皮、艾叶、肉苁蓉、大青叶、鱼腥草、贯众和板蓝根等也表现出了一定的抑菌和杀菌能力,但浓度稍高。

表 1 22 味中草药对创伤弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度 mg/L

Tab.1 MIC and MBC of 22 kinds of Chinese herbal medicine to *V. vulnificus*

药物	MIC	MBC	药物	MIC	MBC
大黄	7.81	7.81	板蓝根	31.25	62.50
黄连	0.49	0.49	贯众	15.63	62.50
黄柏	3.91	7.81	甘草	62.50	62.50
黄芩	3.91	3.91	白术	62.50	62.50
连翘	1.95	1.95	杜仲	62.50	125.00
牡丹皮	3.91	15.63	柴胡	125.00	125.00
金银花	3.91	62.50	山豆根	125.00	125.00
肉苁蓉	7.81	62.50	黄芪	125.00	125.00
艾叶	3.91	7.81	猪苓	62.50	125.00
大青叶	15.63	62.50	茯苓	>1 000	>1 000
鱼腥草	31.25	125.00	五灵脂	62.50	125.00

表 2 22 味中草药对灿烂弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度 mg/L

Tab.2 MIC and MBC of 22 kinds of Chinese herbal medicine to *V. splendidus*

药物	MIC	MBC	药物	MIC	MBC
大黄	7.81	7.81	板蓝根	31.25	62.50
黄连	0.98	0.98	贯众	15.63	125.00
黄柏	3.91	7.81	甘草	125.00	125.00
黄芩	1.95	1.95	白术	62.50	62.50
连翘	1.95	1.95	杜仲	125.00	250.00
牡丹皮	7.81	15.63	柴胡	250.00	500.00
金银花	15.63	62.50	山豆根	250.00	250.00
肉苁蓉	7.81	62.50	黄芪	125.00	125.00
艾叶	7.81	7.81	猪苓	125.00	250.00
大青叶	15.63	62.50	茯苓	>1 000	>1 000
鱼腥草	31.25	250.00	五灵脂	62.50	125.00

3 讨论

3.1 中草药在水产养殖动物病害防治中的应用

使用抗菌药物治疗是控制鱼类弧菌病的主要手段之一(殷战和徐伯亥,1995)。在初期,抗生素在水产养殖动物病害的防治中起到了不可忽视的作用,但随着水产养殖业的发展,药物滥用和耐药性增强等问题,使得病害防治愈加困难。鉴于抗菌药物的种种不足,人们把目光投向了中草药等天然药物。Tong 等(1990)研究了 5 种野生植物提取液的抗鱼病菌和鱼病毒效应;许兵等(1993)研究了 27 味中草药对对虾病原菌的抑制作用;王雷等(1995)观察了 11 种天然药物对弧菌的体外抑制效果;金珊等(1999)研究了中草药对海水养殖鲈鱼病原菌的抑菌效果,都取得了良好的结果。苏振霞等(2008)和姜新发(2005)报道大黄和黄连的水提取物及醇提取物对鳗弧菌的最小抑菌浓度相同,与本实验得到的结果相同。本试验的结果表明,22 味中草药对创伤弧

菌和灿烂弧菌有不同程度的抑制作用,也同样证明了中草药具有良好的抗菌抑菌效果。

3.2 中草药防病治病的针对性

本实验结果显示,在实验条件相同的情况下,黄连、黄芩、连翘对创伤弧菌和灿烂弧菌表现出较强的抑菌效果,说明这些中草药中含有可以抑制甚至杀灭创伤弧菌和灿烂弧菌的有效成分。因此,采用中草药来防治由创伤弧菌和灿烂弧菌引起的鱼病,是确实可行的,治疗时应根据中草药的 MIC 和 MBC 测定结果,调节其用药量,使用药后鱼体内的药物浓度达到抑菌浓度以上。从抑菌效果可以看出,各组药物提取液对 2 种水产致病菌的抑菌效果差别较大,这与各组药物的成分组成和含量不同有关。因此,对于不同的致病菌,应采用具有针对性的中草药进行防治,在水产饲料添加不同的中草药提取物作为添加剂效果会更好。

中草药具有廉价、来源广、低毒、副作用小、不易产生抗药性等特点,且药中某些成分既有抗菌作用,又有免疫作用,能改善机体的免疫状态,提高自身抗菌能力。本研究也为进行中草药提升免疫力的研究提供了基础,筛选出了具有研究和实际应用价值的中草药。

参考文献:

曹俊辉,谢丽玲,杨素霞,等. 2008. 中草药提取物体外抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 36(23): 9 982 - 9 983.

简纪常,吴灶和,陈刚,等. 2003. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病原的分离及其特性[J]. 中国兽医学报, 23(4): 329 - 330.

姜新发. 2005. 中草药提取物对水生动物常见病原菌的体外

抑菌试验[J]. 饲料工业, 26(22): 28 - 29.

金珊,王国良,赵青松,等. 1999. 中草药对海水养殖鲈鱼病原菌的抑菌效果研究[J]. 海洋科学, (5): 8 - 10.

马爱敏,闫茂仓,常维山,等. 2008. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 24(10): 960 - 964.

沈志强,吉山,李锋,等. 2001. 石鲈鱼创伤弧菌病的病原分离鉴定与防治[J]. 中国兽医科技, 31(10): 22 - 23.

苏振霞,肖辉,单娟娟,等. 2008. 十六种中草药提取物对鳗弧菌体外抑菌作用的研究[J]. 淡水渔业, 38(6): 73 - 75.

王雷,李光友,毛远兴. 1995. 11 种天然药物对弧菌的体外抑制效果的观察[J]. 海洋与湖沼, 26(3): 338 - 340.

许斌福,林天龙,董传甫,等. 2005. 鳗鲡创伤弧菌的分子鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 21(11): 995 - 997, 980.

许兵,纪伟尚,张鹏,等. 1993. 对虾病原菌抑菌药物的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 23(2): 43 - 51.

殷战,徐伯亥. 1995. 鱼类细菌性疾病的研究[J]. 水生生物学报, 19(1): 76 - 83.

于兰萍,王斌,李艳,等. 2008. 大菱鲆出血性败血症病原菌的分离与鉴定[J]. 大连水产学院学报, 23(5): 335 - 339.

赵典惠,刘丽波,孙际佳,等. 2007. 用美人鱼弧菌与创伤弧菌人工感染卵形鲳鲹的组织病理学研究[J]. 大连水产学院学报, 22(6): 455 - 459.

郑芳艳,石存斌,潘厚军,等. 2005. 鳗鲡溃烂病病原的分离与鉴定[J]. 上海水产大学学报, 14(3): 242 - 247.

郑天伦,王国良,金珊. 2005. 网箱养殖大黄鱼弧菌病的中草药防治[J]. 水产科学, 24(2): 24 - 25.

Tong S L, Hetrick F M, Robertson B S, et al. 1990. The antibacterial and antiviral activity of hed - alextmets for fish pathogens[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 20(2): 53 - 60.

(责任编辑 万月华)

Selection of 22 kinds of Chinese Herbal Medicines on Bacteriostasis in Vitro on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio splendidus*

YAN Mao-cang¹, CHEN Shao-bo¹, SHAN Le-zhou¹, MA Ai-min¹, XIE Qi-lang¹, DAI Si^{1,2}, LI Shang-lu¹

(Zhejiang Mariculture Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China;

2 College of Life Sciences China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Bacteriostasis in vitro of 22 kinds of Chinese herbal medicine was studied in this paper. The results showed that 22 kinds of Chinese herbal medicine had the inhibitory effect of varying degree on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio splendidus* except for *Wolfiporia cocos*. *Rhizoma Coptidis* and *Fructus Forsythiae* had better inhibitory and killed effects on *Vibrio vulnificus*, the minimal inhibitory concentration were 0.49 mg/mL and 1.95 mg/mL, respectively. the minimal bactericidal concentration was the same with the minimal inhibitory concentration; *Rhizoma Coptidis*, *Fructus Forsythiae*, *Radix Scutellariae* and *Phellodendron amurense* had lower minimal inhibitory concentration on *Vibrio splendidus*, which were 0.98 mg/mL, 1.95 mg/mL, 1.95 mg/mL and 3.90 mg/mL respectively. This four medicine herbs also had better killed effects on *Vibrio splendidus*, the minimal bactericidal concentration were 0.98 mg/mL, 1.95 mg/mL, 1.95 mg/mL and 7.81 mg/mL, respectively.

Key words: Chinese herbal medicine; *Vibrio vulnificus*; *Vibrio splendidus*; Minimal inhibitory concentration (MIC); Minimal bactericidal concentration (MBC)