

## 20 种中草药对迟缓爱德华氏菌的体外抑菌试验

陈言峰, 邹记兴

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**用琼脂扩散法和二倍稀释法测定了 20 种中草药对迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) (GD080715-1、GD080715-2) 的体外抗菌活性。结果表明, 五倍子、乌梅、大青叶、石榴皮的抑菌作用明显, 最小抑菌浓度 (MIC) < 6.25 mg/mL, 最小杀菌浓度 (MBC) < 50 mg/mL; 吴茱萸和菖蒲有一定的抑菌作用, MBC 为 50 ~ 100 mg/mL; 而苦地丁、栀子的抑菌作用不明显, MBC > 200 mg/mL。

**关键词:**中草药; 迟缓爱德华氏菌; 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(2011)05-0110-04

迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 广泛存在于自然环境中, 是鱼类常见的致病菌。Hoshina (1962) 首次报道了迟缓爱德华氏菌对鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的感染, 目前该菌已引起了多种鱼类的病害 (Kusuda et al, 1976; Kusuda et al, 1977; Amandi et al, 1982; Nakatsugawa, 1983); 更为重要的是, 迟缓爱德华氏菌还是一种人畜共患病的病原菌, 能导致免疫功能低下宿主的肠道内外感染 (Spencer et al, 2008)。近年来, 各类抗生素药物常被用于控制由迟缓爱德华氏菌引起的疾病, 然而化学药物容易导致病原菌产生耐药性 (李爱华, 2001), 最终因药物积蓄而导致鱼类以及水环境被污染。中草药具有价廉、低毒、副作用小、不易产生抗药性等特点, 药中某些成分不仅具有抗菌作用, 而且还有免疫作用, 能改善机体的免疫状态, 提高自身抗病能力。本研究利用琼脂扩散法和二倍稀释法测定了 20 种中草药对迟缓爱德华氏菌的抑菌作用, 旨在为该菌引起的爆发性鱼病防治提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

20 种中草药为天南星 (*Rhizoma*)、桑叶 (*Folium*)、石榴皮 (*Pericarpium*)、乌梅 (*Fructus*)、五倍子 (*Galla*)、菖蒲 (*Acorus calamus*)、吴茱萸 (*Fructus*)、大青叶 (*Folium*)、山豆根 (*Radix Sophorae*)、苏木

(*Lignum*)、地锦草 (*Herba*)、射干 (*Rhizoma*)、苦地丁 (*bunge corydalis herb*)、栀子 (*Fructus*)、灯心草 (*Medulla*)、当归 (*Radix*)、十大功劳 (*Mahonia fortunei*)、贯众 (*cyrtomii rhizoma*)、牛蒡 (*Fructus*)、马鞭草 (*Herba*), 购于广州市万怡大药房。

#### 1.2 方法

1.2.1 药液制备 各取中草药 30 g, 加入 300 mL 蒸馏水浸泡 30 min, 然后加热至沸腾, 微沸煎煮 30 min, 共煎煮 3 次, 每次加水量为 300 mL。合并 3 次药液过滤, 将滤液用旋转蒸发器浓缩至 30 mL, 使药液浓度为 1 000 mg/mL, 滤膜过滤除菌后, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 细菌培养 迟缓爱德华氏菌菌株 GD080715-1 和 GD080715-2 由本实验室分离鉴定 (另文发表), 接种于营养肉汤液体培养基中, 置 37℃ 培养 24 h 后, 用平板计数法确定菌液浓度, 用无菌生理盐水稀释, 获得终浓度为  $6.0 \times 10^7$  cfu/mL 的菌液。

1.2.3 抑菌圈测定 营养琼脂培养基平板直径约 12.00 cm, 培养基厚度约 7.00 mm, 每个平板上加 200  $\mu$ L 菌液, 涂抹均匀; 然后用无菌打孔器 (直径为 6.00 mm) 在每个平板上打 4 个孔, 做好药物标记, 最后将 100  $\mu$ L 药液加入孔中。35℃ 培养 24 h, 测量抑菌圈直径 (Amandi et al, 1982)。

1.2.4 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定 中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定参照日本化学疗法学会 (1981) 的标准法进行。先用灭菌生理盐水将药液稀释至 1 000 ~ 0.98 mg/mL 的 11 个倍比系列浓度, 然后在盛有 2.4 mL 无菌营养肉汤液体培养基的试管中加入 600  $\mu$ L 原药液, 使管内药液终浓度为

收稿日期: 2010-12-05

基金项目: 国家星火计划重点项目 (2008GA780002)。

通讯作者: 邹记兴, 教授, 博士生导师。E-mail: zoujixing@163.com

com

作者简介: 陈言峰, 1981 年生, 男, 博士研究生, 研究方向为水产动物病害防治。E-mail: chyfwf@126.com

200 mg/mL,并在盛有 2.7 mL 无菌营养肉汤液体培养基的试管中分别加入 300  $\mu$ L 稀释后的药液,使各管药液终浓度至 100 ~ 0.098 mg/mL。最后在不同浓度的药物培养基中分别加入 75  $\mu$ L 的菌液,同时每试验组设不含药物只含等量菌液的阳性对照管以及不含药物也不含菌液的阴性对照管各 1 支。30℃ 培养 48 h,肉眼观察证实无菌生长试管中的最低药物浓度即为最小抑菌浓度。

1.2.5 最小杀菌浓度(MBC)的测定 中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 最小杀菌浓度(MBC)的测定参考川上宏一和楠田理一(1989)的方法进行。从各种药物的 MIC 和高于 MIC 浓度的各试管中,分别吸取 75  $\mu$ L 培养物,

表 1 中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的抑菌结果

Tab.1 Bacteriostasis of herb abstracts to *Edwardsiella tarda* GD080715-1 and GD080715-2

| 中草药 | 抑菌圈直径/mm     |              | 中草药  | 抑菌圈直径/mm     |              |
|-----|--------------|--------------|------|--------------|--------------|
|     | GD080715-1   | GD080715-2   |      | GD080715-1   | GD080715-2   |
| 五倍子 | 44.06 ± 0.34 | 42.33 ± 0.73 | 射干   | 13.44 ± 0.55 | 13.01 ± 1.43 |
| 石榴皮 | 30.14 ± 0.55 | 31.60 ± 1.53 | 桑叶   | 9.96 ± 0.61  | 10.85 ± 0.73 |
| 乌梅  | 28.29 ± 0.81 | 29.27 ± 0.93 | 天南星  | 8.87 ± 1.33  | 9.01 ± 0.83  |
| 苏木  | 27.59 ± 1.37 | 25.59 ± 0.97 | 灯心草  | 8.75 ± 1.25  | 8.22 ± 0.69  |
| 锦草  | 23.72 ± 0.78 | 22.82 ± 0.58 | 十大功劳 | 7.43 ± 0.95  | 7.93 ± 0.82  |
| 吴茱萸 | 21.11 ± 0.47 | 21.98 ± 1.14 | 山豆根  | 7.33 ± 1.44  | 7.03 ± 0.74  |
| 大青叶 | 20.23 ± 0.66 | 19.02 ± 0.88 | 牛蒡   | 7.12 ± 0.89  | 6.97 ± 0.59  |
| 菖蒲  | 15.94 ± 1.19 | 13.99 ± 1.63 | 马鞭草  | 7.11 ± 0.64  | 7.64 ± 0.53  |
| 苦地丁 | 14.65 ± 0.41 | 14.36 ± 0.52 | 贯众   | 6.64 ± 0.57  | 6.82 ± 0.77  |
| 栀子  | 14.03 ± 0.84 | 14.66 ± 1.02 | 当归   | 6.53 ± 0.88  | 5.26 ± 1.48  |

2.2 最小抑菌浓度(MIC)

10 种中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的体外抑菌试验结果表明,石榴皮、五倍子、乌梅、大青叶的抑菌作用明显,在 6.25 mg/mL 浓度以下即可起到抑菌的效果(表 2)。

表 2 中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的最小抑菌浓度(MIC)

Tab.2 MIC of herb abstracts to *Edwardsiella tarda* GD080715-1 and GD080715-2

| 中草药 | MIC/mg · mL <sup>-1</sup> |              |
|-----|---------------------------|--------------|
|     | GD080715 - 1              | GD080715 - 2 |
| 石榴皮 | 0.78                      | 0.78         |
| 五倍子 | 1.5625                    | 1.5625       |
| 乌梅  | 3.125                     | 3.125        |
| 大青叶 | 6.25                      | 6.25         |
| 苏木  | 12.5                      | 25           |
| 地锦草 | 12.5                      | 25           |
| 吴茱萸 | 50                        | 50           |
| 菖蒲  | 100                       | >100         |
| 苦地丁 | >100                      | >100         |
| 栀子  | >100                      | >100         |

接种于营养琼脂培养基,30℃ 培养 48 h,肉眼观察证实无菌落出现的相应试管中的最低药物浓度即为最小杀菌浓度。

2 结果

2.1 中草药提取物对 2 株迟缓爱德华氏菌的抑菌作用

五倍子、石榴皮、乌梅、苏木、地锦草、吴茱萸、大青叶对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的抑菌作用最明显;菖蒲、苦地丁、栀子、射干仅具有微弱的抑菌作用;而桑叶、天南星、灯心草、十大功劳、山豆根、牛蒡、马鞭草、贯众、当归的抑菌作用不明显(表 1)。

表 1 中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的抑菌结果

| 中草药  | 抑菌圈直径/mm     |              |
|------|--------------|--------------|
|      | GD080715-1   | GD080715-2   |
| 射干   | 13.44 ± 0.55 | 13.01 ± 1.43 |
| 桑叶   | 9.96 ± 0.61  | 10.85 ± 0.73 |
| 天南星  | 8.87 ± 1.33  | 9.01 ± 0.83  |
| 灯心草  | 8.75 ± 1.25  | 8.22 ± 0.69  |
| 十大功劳 | 7.43 ± 0.95  | 7.93 ± 0.82  |
| 山豆根  | 7.33 ± 1.44  | 7.03 ± 0.74  |
| 牛蒡   | 7.12 ± 0.89  | 6.97 ± 0.59  |
| 马鞭草  | 7.11 ± 0.64  | 7.64 ± 0.53  |
| 贯众   | 6.64 ± 0.57  | 6.82 ± 0.77  |
| 当归   | 6.53 ± 0.88  | 5.26 ± 1.48  |

2.3 最小杀菌浓度(MBC)

10 种中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的体外杀菌试验结果表明,五倍子具有极强的杀菌能力,其次是乌梅、大青叶、石榴皮;菖蒲、苦地丁和栀子的杀菌效果不明显(表 3)。

表 3 中草药提取物对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的最小杀菌浓度(MBC)

Tab.3 MBC of herb abstracts to *Edwardsiella tarda* GD080715-1 and GD080715-2

| 中草药 | MBC/mg · mL <sup>-1</sup> |            |
|-----|---------------------------|------------|
|     | GD080715-1                | GD080715-2 |
| 五倍子 | 1.5625                    | 1.5625     |
| 乌梅  | 12.5                      | 12.5       |
| 大青叶 | 25                        | 50         |
| 石榴皮 | 25                        | 25         |
| 苏木  | 25                        | 50         |
| 地锦草 | 50                        | 50         |
| 吴茱萸 | 100                       | 100        |
| 菖蒲  | 200                       | 200        |
| 苦地丁 | >200                      | >200       |
| 栀子  | >200                      | >200       |

### 3 讨论

#### 3.1 抑菌圈直径与 MIC 和 MBC 的关系

本次研究中,利用琼脂扩散法和二倍稀释法测定的 20 种中草药对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的抑菌结果,可为今后筛选出预防鱼类爱德华氏菌病的有效药物提供可靠的参考资料;同时,抑菌圈直径的大小与对应的 MIC 和 MBC 之间,基本体现了由强到弱、再到无抑菌活性的趋势;但不同中草药对迟缓爱德华氏菌的抑菌圈直径大小与测定的 MIC 和 MBC 差异并不存在严格的相关性。以石榴皮为例,其抑菌圈直径与五倍子相比相差较大,而比较其 MIC,却具有比五倍子更强的抑菌能力。因此,笔者认为仅通过琼脂扩散法判定中草药的抑菌能力有一定的局限性,应结合 MIC 和 MBC 进行确定。

#### 3.2 抑菌效果的差异分析

不同研究者报道的同一种药物对同一种病原菌的抑菌作用,其结果也不尽一致。朱壮春等(2007)报道五倍子对迟缓爱德华氏 2 菌株的 MIC 分别为 0.3902 mg/mL 和 0.7812 mg/mL;而李瑞等(2008)报道五倍子对迟缓爱德华氏菌的 MIC 为 12.5 mg/mL;本研究中,五倍子对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 的 MIC 均为 1.5625 mg/mL。朱壮春等报道的大青叶对迟缓爱德华氏菌的抑菌效果不明显, MIC > 100 mg/mL。本研究中,大青叶对迟缓爱德华氏菌 GD080715-1 和 GD080715-2 抑菌效果较好, MIC 均为 6.25 mg/mL;此外,苏木、地锦草、菖蒲的 MIC 和大青叶、苏木的 MBC 有菌株差异。出现上述结果可能是由于试验手段与条件不一致的结果,也可能与所试菌株毒力的强弱、药物的采集和贮藏炮制方法有关。因此,在进行抑菌中草药的筛选时,应根据对不同分离菌株的敏感性选择使用中草药。关于 20 种中草药的醇

提物对迟缓爱德华氏菌是否有相同的抑菌效果,尚需进一步探讨。

#### 参考文献

- 川上宏一,楠田理一. 1989. ブリのマエバクテリア症原因菌に対する各種化学療法剤の試験管内抗菌作用[J]. 日本水産学会誌, 55 (12): 2111-2114.
- 李爱华. 2001. 我国鱼类病原—嗜水气单胞菌的耐药性研究[J]. 微生物通报, 28 (1): 58-63.
- 李瑞,白东清,郭永军,等. 2008. 9 种中草药及 17 种组方对迟钝爱德华氏菌的体外抑菌试验[J]. 水利渔业, 28 (4): 114-116.
- 日本化学療法学会. 1981. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法について[J]. 化学療法, 29: 76-79.
- 朱壮春,史相国,张淑杰,等. 2007. 中草药对牙鲈病原迟钝爱德华氏菌的体外抑制作用研究[J]. 水产科学, 26 (5): 278-281.
- Amandi A, Hiu S F, Rohovec J L, et al. 1982. Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. App Environ Microbiol, 43: 1380-1384.
- Hoshina T. 1962. On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* [J]. Bulletin of the Society of Scientific Fisheries (Japan), 28: 162-164.
- Kusuda R, Itami T, Munekiyo M, et al. 1977. Characteristics of *Edwardsiella* sp. from an epizootic of cultured crimson sea bream [J]. Bull Japan Soc Sci Fish, 43 (2): 129-134.
- Kusuda R, Toyoshima T, Iwamura Y, et al. 1976. *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mlets (*Mugil cephalus*) in Okit-su Bay [J]. Bull Japan Soc Sci Fish, 42 (3): 271-275.
- Nakatsugawa T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder [J]. Fish Pathol, 18 (2): 99-101.
- Spencer J D, Hastings M C, Rye A K, et al. 2008. Gastroenteritis caused by *Edwardsiella tarda* in a pediatric renal transplant recipient [J]. Pediatric Transplantation, 12 (2): 238-241.

(责任编辑 万月华)

**In Vitro Antibacterial Activity of 20 Chinese Herbs to Pathogenic *Edwardsiella tarda***

CHEN Yan-feng, ZOU Ji-xing

( College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642,China)

**Abstract:** The antibacterial activity of 20 Chinese herbs to pathogenic *Edwardsiella tarda* ( GD080715-1, GD080715-2) were determined in vitro by agar diffusion method and two fold dilution method. The results showed that *Galla*, *Fructus*, *Folium* and *Pericarpium* were found to have significant inhibition to the bacterium with minimal inhibitory concentration ( MIC ) less than 6.25 mg/mL and minimal bactericidal concentration ( MBC ) less than 50 mg/mL; *Fructus* and *Acorus calamus* showed some extent inhibition to the bacterium with MBC of 50 – 100 mg/mL, but bunge corydalis herb and *Fructus* had no inhibition to the bacterium with MBC of more than 200 mg/mL.

**Key words:** Chinese herbs; *Edwardsiella tarda*; MIC; MBC