

文章编号: 1674-7054(2019)04-0343-09

50 味中药及其复方与抗生素 对河流弧菌的体外抑菌作用

徐晓津^{1,2}, 李秀华³, 马一帆⁴, 何俊¹, 李慧耀¹, 祁欣¹,
张蕉南², 王云才², 赵玲敏¹, 鄢庆彬¹

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建天马科技股份集团有限公司, 福州 350308;
3. 厦门医学院附属第二医院 中医科, 福建 厦门 361021; 4. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 用牛津杯法选择大黄、黄柏、黄连等 50 种单味中药进行河流弧菌、金黄色葡萄球菌体外抑菌试验, 并以抗菌活性较好的药物组成二联、三联复方, 药物质量浓度分别为 60 和 240 mg · mL⁻¹, 进行中药复方抗菌活性研究, 同时用抗生素进行河流弧菌药敏试验。目的是筛选出对河流弧菌敏感的中草药、抗生素及其复方。结果表明, 黄连、诃子等单方对河流弧菌抑菌作用明显, 为极敏感; 在 60 mg · mL⁻¹ 低药物浓度时, 黄柏、黄连组成的复方对河流弧菌抑菌作用为极敏感; 在 240 mg · mL⁻¹ 药物浓度时, 黄柏、黄连等组成的 9 个复方中药对河流弧菌抑菌作用属极敏感, 黄连、板蓝根、黄柏等 4 个复方中药对河流弧菌的抑菌作用明显, 为极敏感。河流弧菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟苯尼考、土霉素及甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 5 种药物高度敏感。部分中药对河流弧菌抑制作用不明显, 黄连、板蓝根、黄柏等 4 个三联复方中药药效最强。可组成多种三联复方中药或中西药联用复方, 均有良好的抑制作用。

关键词: 中药; 抗生素; 河流弧菌; 抑菌作用

中图分类号: S 853

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.04.007

河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)是引起石斑鱼产生细菌性疾病的重要病原菌^[1],其广泛分布于沿岸海域,可致鱼类、虾蟹类和贝类产生细菌性疾病,引起败血症、腐皮病和脓疮病等症状,死亡严重^[1-3],能引起大黄鱼^[3]、文蛤、石斑鱼等产生疾病^[1],造成巨大经济损失。河流弧菌还能引起人类感染,产生腹泄等病症,表现为急性胃肠炎。目前,河流弧菌的防治已成为国内外研究的热点问题之一。随着抗生素在治疗细菌性疾病中的广泛应用,产生了细菌耐药性、导致药物残留等问题^[4],而中药可增强水产养殖动物免疫力,中药复方对细菌体外抑制效果较好^[5-6]。采用现代化制药技术制成的中药颗粒剂,既保持中药药性,使用安全性也较高。目前已有 200 多种中草药作为饲料添加剂,学者们已开展中草药对罗非鱼、虹鳟、鳊鱼等病害防治的研究^[7-9]。因此,中药与抗生素在防治鱼病方面各有优势,研究中西药联合治疗鱼病具有重要意义。目前尚未见石斑鱼等鱼类中药防治配方筛选的研究,也未见中药抑制河流弧菌、中药抑制菌筛选及复方中药与西药联用治疗鱼病系统的研究。笔者以石斑鱼致病菌河流弧菌为研究对象,用 50 种中药,进行中药体外抑菌试验,筛选出能有效抑制该菌的单方中药,并在此基础上筛选出药效较强的二联与三联复方中药配方,同时进行抗生素对河流弧菌的药敏实验,筛选出药效强的抗生素,减少抗生素的用量及药

收稿日期: 2018-09-30

修回日期: 2018-11-13

基金项目: 2018 年开放课题基金项目(LYC2018RS04, 闽海鸥[2018]31 号);福建省自然科学基金项目(2016J01167, 2018J01455);,国家自然科学基金(31702384,31502194);福建省科技重大专项(2016NZ0001-3);2017 年集美大学研究生教育教学改革研究项目(集大研 No. [2017]18 号);教育部鳊鱼工程研究中心开放基金项目(RE201704)

作者简介: 徐晓津(1969-),女,副教授,博士,研究生导师。研究方向:水产微生物学。E-mail: xiaojinxu@jmu.edu.cn

通信作者: 鄢庆彬(1971-),男,教授,博士生导师。研究方向:水产微生物学。E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

物残留问题,旨在为石斑鱼河流弧菌病的中西药联合治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌种 河流弧菌与实验菌种标准金黄色葡萄球菌菌液由集美大学水产学院实验室保存^[3]。河流弧菌为石斑鱼常见的致病弧菌,分离自患病石斑鱼,将保存的金黄色葡萄球菌与河流弧菌分别用 LB 液体培养基,28 ℃ 下恒温培养 8~12 h,取对数生长期的菌液。PBS 缓冲液调整菌液 OD 值 0.5 (含菌量约为 10^8 mL^{-1}),置于 4 ℃ 冰箱内保存,备用。

1.2 中药对河流弧菌体外抑制实验

1.2.1 单方中药的选取与药液制备 选择水产养殖生产上有报道的 50 种中药进行石斑鱼常见细菌病河流弧菌体外抑菌实验,筛选药效强的中药。中药配方颗粒包括:艾叶、鱼腥草、大黄、黄柏、黄连、黄芩、连翘、板蓝根、白茅根、苦参、金银花、栀子、蒲公英、地锦草、千里光、乌梅、槟榔、榧子、使君子、柴胡、青蒿、槐花、木香、贯众、炒川楝子、大蒜、螺旋藻、刺五加、黄芪、杜仲叶、穿心莲、白芍、醋五味子、党参、苦楝皮、枸杞子、石榴皮、甘草、马齿苋、白头翁、五倍子、地榆、诃子、茯苓、钩藤、虎杖、冬凌草、郁金、木贼草、野菊花均购自江阴天江药业有限公司。实验者将中药配方颗粒溶解于无菌蒸馏水中,置于玻璃小管中,再置于盛有沸水的烧杯,并隔水加热 0.5 h,让中药充分溶解。中药颗粒剂溶液相当于生药的质量浓度为 $240 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 复方二联中药的选取与药液制备 选择单方中药体外抑制圈较大的 22 种中药(诃子、黄连、乌梅、大黄、黄柏、白芍、醋五味子、槟榔、栀子、青蒿、黄芩、连翘、炒槐花、甘草、板蓝根、黄芪、木香、艾叶、炒川楝子、蒲公英、贯众、野菊花;下同)中药配方颗粒,根据药物的特性及养殖生产实践中复方中药治疗细菌病的研究结果^[6-8,11-17],制定复方二联中药。按 1.2.1 溶解中药配方颗粒方法配制成中药颗粒剂溶液,复方中药二联按 1:1 比例,中药最终浓度相当于生药的质量浓度为 $240,60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 复方三联中药的选取与药液制备 选择单方中药体外抑制圈较大的 22 种中药配方颗粒,根据药物的特性及养殖生产实践中复方中药治疗细菌病的研究结果^[6-8,11-17],制定复方三联中药。按 1.2.1 溶解中药配方颗粒方法配制成中药颗粒剂溶液,复方中药三联按 1:1:1 比例,中药最终浓度相当于生药的质量浓度为 $240,60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.4 体外抑菌活性的测定 分别进行河流弧菌与金黄色葡萄球菌体外抑制实验,包括 50 种单方中药、复方二联中药、复方三联中药。采用牛津杯法,在平板中倒入 10 mL 灭菌后的 LB 固体培养基,待凝固后,用镊子轻轻在每个培养皿中等距离放入 4 个牛津杯浸入培养基中,取 15 mL 的 LB 培养基混匀倒入平板上,待凝固后,用镊子轻轻取下牛津杯,将河流弧菌和金黄色葡萄球菌稀释至 $1.0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,用移液枪吸取 0.1 mL 菌悬液,滴入平板,用涂布器涂匀,用移液枪在 1 个孔中加入 200 μL 的无菌水为对照,在另 3 个孔中用移液枪加入含生药 $240 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 种不同药液的 200 μL 中,置于 28 ℃ 条件下,恒温培养 18~24 h,观察抑菌圈,并用 SupcreG1 菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪(杭州迅数科技有限公司)测量抑菌圈大小,每个实验 3 次重复。计算平均值,进行对比研究,根据抑菌圈直径大小判定其抑菌能力的强弱。结果判定标准:抑菌直径 $\geq 20 \text{ mm}$ 为极敏感,表示为“+ + +”; $15 \text{ mm} \leq$ 抑菌直径 $< 20 \text{ mm}$ 为高敏,表示为“+ +”; $10 \text{ mm} \leq$ 抑菌直径 $< 15 \text{ mm}$ 为中敏,表示为“+”;抑菌直径 $< 10 \text{ mm}$ 低敏或无效,表示为“-”。

1.3 抗生素对河流弧菌的药敏试验 用牛津杯法,参照 WHO 推荐的 K-B 纸片琼脂扩散法^[10]中恩诺沙星(兴化市恒威生物技术有限公司)、盐酸多西环素(河南海天生物科技有限公司)、土霉素(河南佰吉特生物科技有限公司)、磺胺嘧啶(山东亚康药业股份有限公司)、氟苯尼考(上海瑞博丘)生物工程有限公司、硫酸新霉素(宜兴市苏亚达生物有限公司)、硫酸庆大霉素(青岛富坤兽药原料有限公司)、磺胺甲噁唑(广州骏杰生物技术有限公司)药敏纸片的药物浓度,在每孔中加入 K-B 纸片琼脂扩散法推荐的抗生素浓度药物。将河流弧菌与金黄色葡萄球菌分别用 0.85% 生理盐水稀释至 $1.0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,分别取 200 μL 菌悬液均匀涂布于 LB 培养基平板上,每个平板放 4 个牛津杯,每个孔分别加入抗生素药液。28 ℃ 恒温培养 24 h 后,并用 SupcreG1 菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪(杭州迅数科技有限公司)测量抑菌圈大小,每个平板做 3 个重复。根据 CLSI M100 的最新标准(郭世富,2019)判定结果。测量抑菌圈直径,判定河流

弧菌与金黄色葡萄球菌的敏感性。

2 结果与分析

2.1 不同中药对河流弧菌的体外抑制效果

2.1.1 不同中药单方对河流弧菌的体外抑制效果 黄连、诃子对河流弧菌抑菌作用明显,为极敏感。乌梅、黄柏、板蓝根、黄芪、栀子对河流弧菌抑菌作用较明显,为高敏。青蒿、醋五味子、大黄抑菌效果为中敏。灭菌作用以黄连最强(表 1)。参照实验菌种标准金黄色葡萄球菌对河流弧菌抑菌直径数据,说明本实验结果可信度强。由于中药浓度为 $240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,在这较低的中药浓度下,包括白芍、槟榔、栀子、黄芩、连翘、炒槐花、甘草、木香、艾叶、炒川楝子、蒲公英、贯众、野菊花、鱼腥草、白茅根、苦参、金银花、地锦草、千里光、榧子、使君子、柴胡、五倍子、槐花、大蒜、螺旋藻、刺五加、杜仲叶、穿心连、党参、枸杞子、大蒜、白头翁、茯苓、钩藤、虎杖、郁金、炒槐花等共 40 种中药无抑菌效果。

表 1 $240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下有效 10 味单方中药对河流弧菌的抑菌作用
Tab. 1 Results of *in vitro* bacteriostatic experiment of single prescription of traditional Chinese medicinal plants ($240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) on *Vibrio fluvialis*

中药名称 Traditional Chinese medicinal plants	河流弧菌 <i>Vibrio fluvialis</i>		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
	抑菌圈直径/mm	相对敏感度 Relative sensitivity	抑菌圈直径/mm	相对敏感度 Relative sensitivity
黄连	30.60 ± 1.07	+ + +	31.10 ± 0.62	+ + +
诃子	20.06 ± 1.13	+ + +	26.09 ± 0.22	+ + +
乌梅	19.24 ± 0.72	+ +	12.82 ± 1.36	+
黄柏	19.08 ± 1.01	+ +	21.27 ± 0.73	+ + +
板蓝根	18.31 ± 1.06	+ +	—	—
黄芪	17.76 ± 1.21	+ +	—	—
栀子	17.72 ± 1.46	+ +	—	—
青蒿	13.31 ± 0.39	+	—	—
醋五味子	12.18 ± 0.68	+	—	—
大黄	10.49 ± 0.38	+	17.52 ± 0.3	+ +

注: 结果判定标准: 抑菌直径 $\geq 20\text{ mm}$ 为极敏感“+ + +”; $15\text{ mm}\leq$ 抑菌直径 $< 20\text{ mm}$ 为高敏“+ +”; $10\text{ mm}\leq$ 抑菌直径 $< 15\text{ mm}$ 为中敏“+”; 抑菌直径 $< 10\text{ mm}$ 低敏或无效“—”。下同

Note: Sensibility of bacteriostatic activity according to the diameter of inhibition zone: Diameter of inhibition zone larger or equal to 20 mm means extreme sensitivity “+ + +”; diameter of inhibition zone from 15 mm to 20 mm means high sensitivity “+ +”; diameter of inhibition zone from 10 mm to 15 mm means moderate sensitivity “+”; diameter of inhibition zone less than 10 mm means low or no sensitivity “—”. Similarly hereinafter

2.1.2 不同复方二联中药对河流弧菌的体外抑制效果 在 $60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 低药物质量浓度时,黄柏、黄连组成复方对河流弧菌抑菌作用为极敏感,大黄、黄连复方对菌抑菌作用为高敏(表 2)。诃子 + 白芍、诃子 + 乌梅、黄连 + 醋五味子、诃子 + 醋五味子、黄连 + 诃子、黄柏 + 板蓝根、黄芩 + 黄连、黄柏 + 白芍、黄柏 + 醋五味子、黄芩 + 诃子、黄柏 + 诃子、板蓝根 + 诃子、大黄 + 黄柏、大黄 + 黄芩、黄柏 + 黄芩、黄柏 + 乌梅、板蓝根 + 乌梅、诃子 + 乌梅、黄芩 + 板蓝根、黄芩 + 乌梅、白芍 + 醋五味子、乌梅 + 白芍 22 种复方中药无药效。在 $240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药物浓度时,黄柏、黄连等组成 9 个复方中药对河流弧菌抑菌作用属极敏感,抑菌直径大于 20 mm (表 3),乌梅、醋五味子等组成 9 个复方中药对河流弧菌抑菌作用属高敏,槐花、大黄组成复方中药、蒲公英组成复方中药、五味子组成复方中药五味子、苦参组成复方中药抑菌效果为中敏,诃子 + 乌梅、黄柏 + 板蓝根、黄柏 + 醋五味子、黄柏 + 白芍、黄芩 + 诃子、黄芩 + 黄连、板蓝根 + 诃子、黄柏 + 诃子、贯众 + 白芍、黄芩 + 板蓝根、黄芪 + 白芍、黄芪 + 大黄、槐花 + 黄柏、大黄 + 黄柏、大黄 + 黄芩、黄柏 + 黄芩、白芍 + 醋五味子、栀子 + 大黄、栀子 + 黄芩、连翘 + 黄芩、栀子 + 连翘、连翘 + 黄柏、槐花 + 大黄、黄连 + 木香、艾叶 + 黄

连、蒲公英+野菊花、蒲公英+黄连、蒲公英+五味子、蒲公英+苦参、蒲公英+板蓝根、贯众+黄芪、贯众+连翘、野菊花+板蓝根、苦参+五味子组成复方中药等 34 个复方中药无药效(表 3)。参照实验菌种标准金黄色葡萄球菌对河流弧菌抑菌的直径数据,说明本实验结果可信度高(表 2,3)。相对于一联中药,二联中药的药效更强,选择性能功效相类似的药物配合应用,能增强疗效。

表 2 60 mg · mL⁻¹ 质量浓度下有效二联中药对河流弧菌的抑菌作用

Tab.2 Results of *in vitro* bacteriostatic experiment of combined prescriptions with two species of traditional Chinese medicinal plants(two in one, 60 mg · mL⁻¹) on *Vibro fluvialis*

中药组合 Combination of two species of traditional Chinese medicinal plants	河流弧菌 <i>Vibro fluvialis</i>		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
	抑菌圈测定/mm Bacteriostatic zone	相对敏感度 Relative sensitivity	抑菌圈测定/mm Bacteriostatic zone	相对敏感度 Relative sensitivity
黄柏+黄连	20.88 ± 0.63	+++	24.18 ± 0.57	+++
大黄+黄连	15.61 ± 1.1	++	21.37 ± 0.86	+++
黄连+板蓝根	14.64 ± 0.38	+	25.20 ± 0.76	+++
黄连+乌梅	14.35 ± 0.42	+	24.48 ± 0.58	+++
黄连+白芍	13.47 ± 0.48	+	22.34 ± 1.18	+++
乌梅+醋五味子	11.28 ± 0.41	+	—	—

表 3 240 mg · mL⁻¹ 质量浓度下有效二联中药对河流弧菌的抑菌作用

Tab.3 Results of *in vitro* bacteriostatic experiment of combined prescriptions with two species of traditional Chinese medicinal plants (240 mg · mL⁻¹) on *Vibro fluvialis*

中药组合 Combination of two species of traditional Chinese medicinal plants	河流弧菌 <i>Vibro fluvialis</i>		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
	抑菌圈测定/mm Bacteriostatic zone	相对敏感度 Relative sensitivity	抑菌圈测定/mm Bacteriostatic zone	相对敏感度 Relative sensitivity
黄柏+黄连	27.12 ± 0.308	+++	28.94 ± 0.71	+++
连翘+黄连	25.691 ± 0.508	+++	—	—
黄芪+黄连	23.88 ± 1.24	+++	—	—
黄连+乌梅	23.04 ± 0.61	+++	20.55 ± 4.83	+++
槐花+黄连	22.179 ± 1.683	+++	—	—
黄连+板蓝根	21.15 ± 0.52	+++	31.27 ± 1.95	+++
黄连+白芍	20.97 ± 1.53	+++	25.4 ± 0.85	+++
黄连+醋五味子	20.84 ± 2.32	+++	24.84 ± 0.2	+++
蒲公英+木香	20.501 ± 0.426	+++	—	—
乌梅+醋五味子	19.74 ± 0.48	++	11.98 ± 1.09	+
诃子+白芍	19.44 ± 0.52	++	32.27 ± 0.94	+++
大黄+黄连	17.99 ± 0.6	++	24.55 ± 1.58	+++
诃子+醋五味子	17.61 ± 1.03	++	30.07 ± 1.39	+++
诃子+乌梅	17.45 ± 0.39	++	18.67 ± 0.21	++
黄连+诃子	16.06	++	21.44 ± 2.15	+++
黄柏+乌梅	15.7 ± 0.46	++	11.16 ± 0.39	+
板蓝根+乌梅	15.63 ± 0.21	++	—	—
乌梅+白芍	15.1 ± 0.6	++	—	—
黄芩+乌梅	14.45 ± 0.65	+	19.77 ± 0.04	++
艾叶+野菊花	12.47 ± 2.178	+	—	—

2.1.3 不同复方三联中药对河流弧菌的体外抑制效果 在 $60\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低浓度药物时, 黄连、诃子、黄柏组成复方中药、黄连、乌梅、黄柏组成复方中药抑菌效果为中敏(表 4)。蒲公英 + 五味子 + 诃子、诃子 + 白芍 + 蒲公英、诃子 + 醋五味子 + 板蓝根、诃子 + 醋五味子 + 蒲公英、蒲公英 + 野菊花 + 诃子、诃子 + 乌梅 + 板蓝根、乌梅 + 黄柏 + 诃子、乌梅 + 黄芩 + 诃子、黄连 + 板蓝根 + 黄柏、黄连 + 醋五味子 + 黄芪、黄连 + 白芍 + 黄柏、诃子 + 醋五味子 + 甘草、乌梅 + 白芍 + 诃子、诃子 + 白芍 + 板蓝根、乌梅 + 醋五味子 + 诃子、黄连 + 醋五味子 + 黄柏、黄连 + 黄芪 + 黄柏、黄连 + 白芍 + 黄芪、黄连 + 板蓝根 + 黄芪、黄连 + 大黄 + 黄芪、黄连 + 连翘 + 黄芪、诃子 + 乌梅 + 甘草、诃子 + 乌梅 + 蒲公英、黄连 + 连翘 + 黄柏、板蓝根 + 诃子 + 甘草、蒲公英 + 苦参 + 诃子、大黄 + 栀子 + 白芍、诃子 + 白芍 + 甘草、黄连 + 大黄 + 黄柏、黄连 + 乌梅 + 黄芪、乌梅 + 醋五味子 + 黄连、乌梅 + 黄柏 + 黄连、乌梅 + 白芍 + 黄连、乌梅 + 板蓝根 + 黄连、乌梅 + 黄芩 + 黄连、乌梅 + 板蓝根 + 诃子、白芍 + 醋五味子 + 大黄、大黄 + 槐花 + 白芍、大黄 + 黄芪 + 白芍、白芍 + 贯众 + 大黄、黄柏 + 诃子 + 黄芪、黄连 + 诃子 + 黄芪、苦参 + 五味子 + 白芍、黄芩 + 诃子 + 黄芪、蒲公英 + 木香 + 诃子、黄芩 + 连翘 + 黄芪、黄芩 + 板蓝根 + 黄芪、黄柏 + 醋五味子 + 黄芪 48 种复方中药均无抑菌效果。在 $240\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药物浓度时, 黄连、板蓝根、黄柏组成复方中药、黄连、乌梅、黄柏组成复方中药、黄连、白芍、黄柏组成复方中药、黄连、黄芪、黄柏组成复方中药、黄连、乌梅、黄芪组成复方中药对河流弧菌的抑菌作用明显, 抑菌直径大于 20 mm , 为高敏。黄连、醋五味子、黄柏组成复方中药, 黄连、大黄、黄芪组成复方中药, 黄连、醋五味子、黄芪组成复方中药, 黄连、连翘、黄柏组成复方中药, 黄连、白芍、黄芪组成复方中药, 黄连、连翘、黄芪组成复方中药, 黄连、诃子、黄柏组成复方中药, 黄连、板蓝根、黄芪组成复方中药, 乌梅、醋五味子、黄连组成复方中药, 乌梅、黄柏、黄连组成复方中药, 乌梅、白芍、黄连组成复方中药, 乌梅、板蓝根、黄连组成复方中药, 对河流弧菌的抑菌作用较明显, 为高敏。黄连、大黄、黄柏组成复方中药, 乌梅、黄芩、诃子组成复方中药, 乌梅、黄芩、黄连组成复方中药, 对河流弧菌的抑菌效果为中敏(表 5)。蒲公英 + 五味子 + 诃子、诃子 + 白芍 + 蒲公英、诃子 + 醋五味子 + 板蓝根、诃子 + 醋五味子 + 蒲公英、蒲公英 + 野菊花 + 诃子、诃子 + 乌梅 + 板蓝根、乌梅 + 黄柏 + 诃子、诃子 + 醋五味子 + 甘草、乌梅 + 白芍 + 诃子、诃子 + 白芍 + 板蓝根、乌梅 + 醋五味子 + 诃子、诃子 + 乌梅 + 甘草、诃子 + 乌梅 + 蒲公英、板蓝根 + 诃子 + 甘草、蒲公英 + 苦参 + 诃子、诃子 + 白芍 + 甘草、大黄 + 栀子 + 白芍、乌梅 + 板蓝根 + 诃子、白芍 + 醋五味子 + 大黄、大黄 + 槐花 + 白芍、大黄 + 黄芪 + 白芍、白芍 + 贯众 + 大黄、黄柏 + 诃子 + 黄芪、黄连 + 诃子 + 黄芪、苦参 + 五味子 + 白芍、黄芩 + 诃子 + 黄芪、蒲公英 + 木香 + 诃子、黄芩 + 连翘 + 黄芪、黄芩 + 板蓝根 + 黄芪、黄柏 + 醋五味子 + 黄芪 30 种复方无抑菌效果。参照实验菌种标准金黄色葡萄球菌对河流弧菌抑菌直径数据, 说明本实验结果可信度强(表 4, 5)。相对于一联中药, 二联中药的药效, 三联的中药抑菌作用强的中药复方总数增加较多, 说明选择性能功效相类似的药物配合应用, 中药数增加能较大增强疗效。

表 4 $60\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下有效三联中药对河流弧菌的抑菌作用

Tab. 4 Results of *in vitro* bacteriostatic experiment of combined prescriptions with 3 species of traditional Chinese medicinal plants ($60\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) on *Vibrio fluvialis*

三联中药 Combination of species of traditional Chinese medicinal plants	河流弧菌 <i>Vibrio fluvialis</i>		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
	抑菌圈测定/mm	相对敏感度	抑菌圈测定/mm	相对敏感度
	Bacteriostatic zone	Relative sensitivity	Bacteriostatic zone	Relative sensitivity
黄连 + 诃子 + 黄柏	14.574 ± 0.864	+	20.500 ± 3.421	+ + +
黄连 + 乌梅 + 黄柏	14.300 ± 0.458	+	21.420 ± 2.783	+ + +

2.2 8 种抗生素药物敏感试验 河流弧菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟苯尼考、土霉素及磺胺嘧啶 5 种药物高度敏感, 对硫酸新霉素中度敏感, 对硫酸庆大霉素及甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 2 种药物耐药, 具体见表 6。

表 5 240 mg · mL⁻¹质量浓度下有效三联中药对河流弧菌的抑菌作用Tab. 5 Results of in vitro bacteriostatic experiment of combined prescriptions (three in one, 240 mg · mL⁻¹) on *Vibro fluvialis*

三联中药 Combination of 3 species of traditional Chinese medicinal plants	河流弧菌 <i>Vibro fluvialis</i>		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
	抑菌圈测定/mm	相对敏感度	抑菌圈测定/mm	相对敏感度
	Bacteriostatic zone	Relative sensitivity	Bacteriostatic zone	Relative sensitivity
黄连 + 板蓝根 + 黄柏	22.764 ± 3.256	+	17.879 ± 1.027	+
黄连 + 乌梅 + 黄柏	22.012 ± 1.346	+	18.769 ± 1.426	+
黄连 + 白芍 + 黄柏	20.971 ± 1.764	+	18.444 ± 1.024	+
黄连 + 黄芪 + 黄柏	20.223 ± 1.472	+	17.222 ± 2.013	+
黄连 + 醋五味子 + 黄柏	19.246 ± 0.845	+	19.594 ± 2.742	+
黄连 + 大黄 + 黄芪	18.426 ± 1.349	+	16.012 ± 1.203	+
黄连 + 醋五味子 + 黄芪	17.980 ± 1.557	+	18.699 ± 0.476	+
黄连 + 连翘 + 黄柏	17.879 ± 1.246	+	16.564 ± 1.031	+
黄连 + 白芍 + 黄芪	17.845 ± 1.752	+	21.055 ± 1.824	+
黄连 + 连翘 + 黄芪	17.622 ± 0.942	+	21.096 ± 1.426	+
黄连 + 诃子 + 黄柏	16.806 ± 1.045	+	17.049 ± 0.942	+
黄连 + 板蓝根 + 黄芪	15.914 ± 1.024	+	16.820 ± 1.342	+
黄连 + 大黄 + 黄柏	13.778 ± 0.432	+	17.112 ± 3.426	+
乌梅 + 黄芩 + 诃子	12.891 ± 0.881	+	16.066 ± 1.459	+
黄连 + 乌梅 + 黄芪	23.867 ± 1.472	+	—	—
乌梅 + 醋五味子 + 黄连	19.590 ± 2.468	+	—	—
乌梅 + 黄柏 + 黄连	17.622 ± 2.314	+	—	—
乌梅 + 白芍 + 黄连	16.996 ± 1.261	+	—	—
乌梅 + 板蓝根 + 黄连	15.953 ± 2.334	+	—	—
乌梅 + 黄芩 + 黄连	13.018 ± 0.835	+	—	—

表 6 河流弧菌药物敏感性实验

Tab. 6 Antibiotic sensitivity test of *Vibro fluvialis*

药物 Antibiotics	抑制圈直径判断标准/mm			含量/(μg · 孔) Dose	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	敏感度 Sensitivity
	The standard of inhibition zone diameter					
	R	S	I			
恩诺沙星 Enrofloxacin	≤15	15 – 21	≥21	5	33.039 ± 1.476	S
盐酸多西环素 Oxytet racycline	≤12	12 – 16	≥16	30	29.586 ± 2.018	S
氟苯尼考 Florfenico	≤12	12 – 18	≥18	30	20.192 ± 0.942	S
土霉素 Oxytetracycline	≤14	14 – 19	≥19	25	26.964 ± 1.994	S
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	≤12	12 – 17	≥17	30	22.683 ± 1.201	S
硫酸新霉素 Neomycinsulfate	≤12	12 – 17	≥17	30	12.788 ± 1.009	I
硫酸庆大霉素 Gentamicinsulfat	≤12	12 – 15	≥15	10	—	R
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 Trimethoprim	≤10	10 – 16	≥16	25	—	R

注: S, 高度敏感; I, 中度敏感; R, 耐药

Note: S, Highly sensitive; I, Moderately sensitive; R, Resistant

3 讨 论

河流弧菌是一种可常见于海水养殖动物(如青石斑 *Epinephelus awoara*) 中的嗜盐性致病菌,具有较强的致病性,能引起多种养殖动物包括石斑鱼的疾病^[3],发病,病理变化主要表现为腹部膨大,死亡率高等,易造成较大损失。

3.1 单方中药的抗菌作用 中药具有显著的抗菌作用,具有显著而广谱的抗菌活性。中药抑制细菌主要通过破坏其酶活性与繁殖,使菌蛋白质变性、失活。中药已广泛用于多种鱼类疾病治疗,为水产养殖业健康发展做出重要贡献^[11],多位学者进行中药细菌体外抑制研究,黄连、黄柏、黄芩等清热燥湿药抑菌效果最好^[12],鸡源多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella Multocida*)对五味子、黄连、乌梅、黄柏、艾叶4种药物极敏^[13]。在32味中药中,五倍子、栀子、五味子、乌梅、黄芩、黄连、对嗜水气单胞菌具有较强抑菌活性^[14]。黄芩、连翘、黄连、金银花对鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)有不同程度的体外抑菌作用,黄连的抑菌作用最强^[15]。五倍子、大黄、虎杖和黄芩单用对养殖病鳗中的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)均有较好的抑菌作用^[16]。采用平板牛津杯法研究中药对温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)的抑菌结果,在30种中药中,五倍子、白芍、对温和气单胞菌具有较强抑菌活性^[8],黄芩优于金银花,鸡源多杀性巴氏杆菌对五味子、黄连、乌梅药物极敏感。黄连、黄柏、艾叶对禽多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)敏感^[17]。鳗鲡致病性气单胞菌抑菌强弱依次为五倍子>石榴皮>大黄>黄芩>虎杖>黄连^[7]。由此表明,因不同致病菌对不同中药所含有效抗菌成分的敏感度不同。以上学者研究得出较强抑菌活性的中药与本研究结果相似。本研究50种中药对河流弧菌抑菌结果表明,单味中药质量浓度为 $240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,黄连、诃子、乌梅、黄柏、板蓝根、黄芪、栀子对河流弧菌抑菌效果较强。与彭金菊研究结果相似,诃子、黄连也对嗜水气单胞菌具有较强抑菌活性^[14]。实验菌种标准金黄色葡萄球菌及河流弧菌抑菌直径数据与本研究结果相近,说明本实验结果可信度高。目前,国内学者仅对少数几种单药的细菌体外抑制进行研究,而本研究首次进行50种药物对细菌体外抑制比较研究,并筛选出抑菌有效药物。

3.2 复方中药的抗菌作用 中药复方是按君臣佐使的原则配伍而成。单味药组成复方后可呈现协同抑菌作用,通过合理配制组方筛选,协同增效,取得更好的抑制细菌效果。复方药物体外抑菌效果主要取决于药物配比及各成分的浓度。本研究不同复方二联中药对河流弧菌的体外抑制效果,在 $240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药物浓度时,黄柏与黄连、黄连与乌梅等组成复方中药对河流弧菌的抑菌作用明显,为极敏感;诃子、白芍等3个复方中药对河流弧菌抑菌作用为高敏;槐花与大黄组、五味子与苦参组成复方中药抑菌效果为中敏,板蓝根、诃子等30个复方中药无药效。参照实验菌种标准金黄色葡萄球菌对河流弧菌抑菌直径数据,说明本实验结果可信度高。相对于一联中药,二联中药的药效更强,选择性能功效相类似的药物配合应用,能增强疗效。

三联复方中药比双联复方中起更显著协同增效的体外抑菌效果^[22-24],较大增强复方中单味中药的抑菌作用。彭金菊等测得五倍子分别与黄连、诃子,大黄、同时五倍子与其他多种中药组成的复方抗菌作用增强^[14],与本研究结果相似。按一定比例组成的复方的抑菌及杀菌活性都强过组成复方的各单味药,并且抑菌及杀菌活性都强过大黄、芩蓝散、黄连解毒散和青莲散^[14]。国内学者进行少数药物的复方研究,尚未见将22种有效单味药进行不同组合的抑菌研究,本研究不同复方三联中药对河流弧菌的体外抑制效果,在药物 $60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 低质量浓度时,黄连、诃子、黄柏组成复方中药,黄连、乌梅、黄柏组成复方中药,抑菌效果为中敏,其他如蒲公英、五味子、诃子组成的复方中药等48种复方中药均无抑菌效果;在药物 $240\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度时,黄连、板蓝根、黄柏三联中药及黄连、醋五味子、黄柏组成复方中药对河流弧菌的抑菌作用较明显,为高敏。另黄柏、诃子、黄芪组成的复方中药,黄连、诃子、黄芪组成的复方中药等30种复方无抑菌效果。参照实验菌种标准金黄色葡萄球菌对河流弧菌抑菌直径数据,说明本实验结果可信度高。相对于一联中药,二联中药的药效,三联的中药抑菌作用强的中药复方增加较多。本研究结果对于河流弧菌感染性石斑鱼疾病的中药治疗有一定的意义。

3.3 抗生素药物的抑菌作用 抗生素在养殖业中广泛且不合理应用,使细菌的耐药性日趋严重,给治疗带来了困难^[18]。病原菌对抗生素的药敏试验具有重要意义,秦蕾等^[19]研究发现腐败希瓦氏菌(*Shewanella*-

la putrefaciens) 对恩诺沙星较敏感,长吻鲩(*Leiocassis longirostris*) 鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*) 对恩诺沙星、盐酸多西环素、敏感^[20],虹鳉鱼源气单胞菌(*Aeromonas spp.*) 对盐酸多西环素和氟喹诺酮类药物较为敏感,耐药率均低于 10%。其中盐酸多西环素为最敏感的药物,敏感率为 100%^[9]。磺胺嘧啶常作为一种饲料添加剂用于预防动物疾病,单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) 对其的耐药率非常高,达到了 46.15%^[21],氟苯尼考容易使病原菌短时间产生较高的耐药性,并且耐药性消失较慢^[20]。以上学者研究结果与本研究结果相似,河流弧菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、氟苯尼考、土霉素及磺胺嘧啶 5 种药物高度敏感。国内尚无学者进行多种养殖生产常用抗生素的细菌药敏比较研究,本研究中河流弧菌对硫酸庆大霉素及甲氧苄啶/磺胺甲噁唑产生了耐药。为减少耐药性产生,在防治河流弧菌引起的疾病过程中,应注意轮换使用不同抗生素。

河流弧菌耐药机制多样,尤其是抗生素被广泛应用以来,细菌耐药性迅速增加,耐药机制也变得越来越复杂,养殖户和生产人员在养殖过程中,要在国家允许的药物使用范围内,选取敏感药物用于病害防治。合理使用抗生素类药物,对防治日益严重的感染、减少耐药菌的产生以及控制耐药菌的传播均具有十分重要的意义。中药疗效好,同时能增强鱼体的免疫力,对于抗生素有抗药性的细菌,中药有良好抑菌作用。而抗生素具有治疗效果快,用药量少,是养殖中病害防治常用药。使用中药复方药物,或中西药联用药物,可降低抗生素用量,可减少鱼类抗生素残留,有利于出口创汇,同时可治疗多种生产上长期使用抗生素已无法治愈的鱼病,达到较好的治疗鱼病效果,促进我国水产养殖业健康可持续发展。

参考文献:

- [1] 王晓露,邹文政,鄢庆枇,等. 病原性河流弧菌对青石斑鱼体表黏液黏附特性的研究[J]. 水产学报, 2008,32(3): 441-448.
- [2] 戚莉芳,刘雪芹,张婷婷,等. 水产品中河流弧菌分离株 *OmpU* 基因的克隆测序与生物信息学分析[J]. 中国微生态学杂志, 2013,25(6): 630-635.
- [3] 朱苏琴,纪荣兴,苏永全,等. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*) 对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 鳃粘液粘附特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2012,43(2): 389-393.
- [4] 秦垂新,曹子丰,谭丽容,等. 中药口服液中性、酸性多糖的检测方法[J]. 热带生物学报, 2014,5(2): 170-173.
- [5] 李琴,孙成波,陈美领,等. 湛江东海岛对虾育苗场水体细菌的抗生素耐药性[J]. 热带生物学报, 2014,5(1): 8-14.
- [6] 智晓艳,崔恩慧,范云鹏,等. 14 种中药及其复方的体外抗菌活性[J]. 西北农业学报, 2014,23(7): 114-119.
- [7] 李忠琴,关瑞章,汪黎虹,等. 六种中药及其复方对鳗鲡致病性气单胞菌的体外抑制作用[J]. 水生生物学报, 2012,36(1): 85-92.
- [8] 彭金菊,马驿,梁景新,等. 中药复方防治罗非鱼温和气单胞菌病疗效观察[J]. 中兽医医药杂志, 2010,29(6): 44-46.
- [9] 王小亮,徐立蒲,王静波,等. 虹鳉鱼源气单胞菌的药物感受性及变化[J]. 中国水产, 2016(10): 116-118.
- [10] 桂炳东,徐建民,胡龙华,等. 96 株肺炎链球菌耐药性的检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001(s1): 87-88.
- [11] 张丁华,王艳丰,许兰菊,等. 不同中药复方对 3 种鸡细菌性腹泻病原菌的体外抑菌试验[J]. 中国畜牧兽医, 2010,37(10): 174-177.
- [12] 何永明,郑秋婵,王敏儒,等. 30 味中药及其复方对鸭疫里默氏杆菌的体外抑菌作用[J]. 安徽农业科学, 2008,36(6): 2351-2352.
- [13] 常超越,张召兴,李蕴玉,等. 20 种单味中草药对鸡源多杀性巴氏杆菌的体外抑菌试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(14): 156-157.
- [14] 彭金菊,马驿,罗伟英,等. 32 种中药及其复方对嗜水气单胞菌体外抑菌效果[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2010,28(1): 5-7.
- [15] 吴贤丽,庞载元,敖茂程,等. 五味子、乌梅对 60 株广泛耐药鲍曼不动杆菌的抑菌作用[J]. 中国合理用药探索, 2015(12): 14-17.
- [16] 靳恒,李忠琴,罗鸣钟,等. 5 种中草药和 9 种抗生素对养殖鳗鲡主要致病菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2012,40(32): 15737-15740.
- [17] 曲径,殷中琼,贾仁勇,等. 艾叶等 20 种中药对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌活性[J]. 华中农业大学学报, 2015(2): 91-94.
- [18] 王虹,杨德鸿,汤芳,等. 13 种兽用抗菌药对大肠杆菌及沙门菌的体外抑菌效果[J]. 畜牧与兽医, 2018(6): 110-113.

- [19] 秦蕾, 张晓君, 毕可然. 一种新的异育银鲫病原——腐败希瓦氏菌[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 558–565.
- [20] 肖洋, 雷燕, 唐绍林, 等. 养殖长吻鮠 *Leiocassis longirostris* 鮠爱德华氏菌 *Edwardsiella ictaluri* 的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产学杂志, 2015, 28(1): 39–44.
- [21] 吕均, 方友林, 刘兰芳. 十堰市 26 株单增李斯特菌同源性与耐药特征分析[J]. 现代预防医学, 2016, 43(6): 1105–1107.
- [22] QIU W H, ZHENG M, SUN J, et al. Photolysis of enrofloxacin, pefloxacin and sulfaquinoxaline in aqueous solution by UV/H₂O₂, UV/Fe(II), and UV/H₂O₂/Fe(II) and the toxicity of the final reaction solutions on zebrafish embryos[J]. Science of The Total Environment, 2019, 651: 1457–1468.
- [23] METI M, XU Y, XIE J F, et al. Multi-spectroscopic studies on the interaction between traditional Chinese herb, helicid with pepsin[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 45(6): 1637–1646.
- [24] WANG Q, JIAO L J, WANG S F, et al. Maintenance Chemotherapy with Chinese Herb Medicine Formulas vs. With Placebo in Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer After First-Line Chemotherapy: A Multicenter, Randomized, Double-Blind Trial[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018(9): 1–12.

In Vitro* Bacteriostasis of 50 species of Traditional Chinese Medicinal Plants and Their Combined Prescriptions and Antibiotics Against *Vibrio fluvialis

XU Xiaojin^{1,2}, LI Xiuhua³, MA Yifan⁴, HE Jun^{1,2}, LI Huiyao^{1,2}, QI Xin^{1,2},
ZHANG Jiaonan², WANG Yuncai², ZHAO Linming¹, YAN Qingpi¹

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 2. Fujian Tianma Science and Technology Group Co. Ltd., Fuzhou, Fujian 350308, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicines, Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361021, China; 4. College of Marine and Earth, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Fifty species of traditional Chinese medicinal plants, such as *Rheum officinale*, *Cortex Phellodendri* and *Coptis chinensis*, etc, were employed to test their antibacterial effect on *Vibrio fluvialis* and *Staphylococcus aureus* by using *Oxford-cup* tests *in vitro*. The traditional Chinese medicinal plants that had optimal effect in single prescription were chosen, based on which combined prescriptions with two or three species of the traditional Chinese medicinal plants were prepared and compared in their antibacterial activity. The concentrations of the prescriptions of the traditional Chinese medicinal plants used for test were 60 and 240 mg • mL⁻¹, respectively. The antibacterial test was made with 3 replicates each treatment. Meanwhile 8 antibiotics were tested against *Vibrio fluvialis*. This experiment was conducted to screen single and combined prescriptions of traditional Chinese medicinal plants and antibiotics that are sensitive to *Vibrio fluvialis*. Results showed that single prescriptions of the traditional Chinese medicinal plants such as *Coptis chinensis*, *Terminalia chebula*, etc had obvious inhibitory effect against *V. fluvialis* (highly sensitive). The combined prescriptions of the traditional Chinese medicinal plants with *Cortex Phellodendri* and *Coptis chinensis* as a component in the combinations had obvious inhibitory effect when their treatment concentrations were 60 mg • mL⁻¹. When the concentration was set at 240 mg • mL⁻¹, 9 combined prescriptions with *Cortex phellodendri* and *Coptis chinensis* as the component in the combinations of two species of traditional Chinese medicinal plants were very highly sensitive to *Vibrio fluvialis*. At the concentration of 240 mg • mL⁻¹ 4 combined prescriptions with combination of three species of the traditional Chinese medicinal plants such as *Coptis chinensis*, *Radix Isatidis* and *Cortex Phellodendri* had obvious inhibitory effect. *Vibrio fluvialis* was susceptible to enrofloxacin, oxytetracycline, Florfenicol, oxytetracycline and trimethoprim. Some prescriptions of traditional Chinese medicinal plants had no obvious inhibitory effect. Four combined prescriptions with combination of three species of traditional Chinese medicinal plants such as *Coptis chinensis*, *Radix isatidis* and *Cortex phellodendri* had the highest inhibitory effects. Combined prescriptions with 3 species of traditional Chinese medicinal plants in a combination, or a combination of prescriptions of traditional Chinese medicinal plants and antibiotics might have good inhibition against *Vibrio fluvialis*.

Keywords: Traditional Chinese medicinal plants; antibiotics; *Vibrio fluvialis*; antibacterial activity

(责任编辑: 钟云芳)