

4种中药三联用对鳗鲡致病菌的抑制作用

关瑞章^{1,2} 李忠琴^{1,2} 郭松林^{1,2} 刘宏伟^{1,2} 汪黎虹¹

1. 集美大学水产学院, 厦门 361021; 2. 教育部鳗鱼产业技术工程研究中心, 厦门 361021

摘要 应用超微粉碎法将虎杖、石榴皮、大黄以及五倍子4种中药进行加工处理至粒径为5~10 μm后,组成4个三联用的中药复方,针对近年来从福建各地养殖场病鳗中常检测到的9株致病菌,采用琼脂稀释法测定其抑菌最低浓度。试验结果表明:虎杖、石榴皮、大黄和五倍子组合的4个中药复方对9株养殖鳗鲡主要致病菌均有一定的协同抑制作用,其协同效应因子FIC范围在0.38~0.76。其中,联用效果最好的是复方1,所联用的3种中药对9株致病菌均具有显著协同抗菌效应,FIC≤0.5。每个复方的联用3种中药的最低抑菌浓度均比单用浓度降低了79%以上,不但可大大降低用药量,而且用药成本比单用节省47%以上。

关键词 鳗鲡; 致病菌; 中药; 抑菌协同效应

中图分类号 S 943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0764-04

我国是世界上最大的鳗鲡生产国^[1],养殖鳗鲡病害时有发生^[2]。目前中药在水产养殖病害的防治过程中,多数是以单种药形式使用。但在实际应用上,中药往往以多种药物配伍的复方形式使用,例如六种地黄汤,桂附八种丸等。试验结果显示,中药复方可以有效地降低单种中药的使用浓度^[3]。Punitha等^[4]发现在石斑鱼幼苗饲料中添加绊根草、萆拔等中药不但可以提高鱼苗的质量,还可以提高其对哈维氏弧菌的非特异性免疫作用。本试验在前期研究^[5]基础上选择4种具有较强抗菌活性的中药,采用超微药粉琼脂平板稀释法,针对9株养殖场常检测到的鳗鲡致病菌进行体外三联用中药复方的药物敏感试验,以筛选高效抗菌的复合药方。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

9株致病菌均为笔者所在实验室近年来利用鳗鲡病原菌血清试剂盒在福建省各地区养殖场病鳗中常检测到的病原菌,并经过人工感染试验证实为强致病菌^[6]。通过生理生化和基因鉴定分别为豚鼠气单胞菌(B15、B18、B20)、嗜水气单胞菌(B10)、威隆气单胞菌(B09)、腐败希瓦杆菌(B01、B02、B16)、肺炎克雷伯菌(B12)、肠杆菌科(B08)。同种致病菌的

不同菌株存在生理生化特性或血清型的差异。

1.2 试验药材

根据笔者所在实验室已有研究基础,筛选并确定了本试验所研究的4种抑菌中药:虎杖(*Rhizoma polygoni Cuspidati*),产地福建;石榴皮(*Punica granatum* Linn),产地甘肃;大黄(*Rheum palmatum* Linn),产地甘肃;五倍子(*Rhus chinensis* Mill),产地湖北。

1.3 中药预处理

将所选的中药用中药粉碎机(FW177,天津市泰斯特仪器有限公司)粉碎至0.15 mm左右,然后放入超微粉碎机(YSC-701,北京燕山正德机械设备有限公司)进一步粉碎,收集超微药粉备用。在扫描电子显微镜下观察,90%以上的药粉粒径为5~10 μm。

1.4 菌悬液制备

从保种斜面上挑取菌苔划线接种M-H琼脂(Mueller-Hinton Agar)平板,置于28℃恒温培养箱内培养20 h;挑取单个菌落划线至新鲜斜面上,28℃培养24 h后,用无菌生理盐水将菌体冲洗下来,采用酶标仪测定菌液浓度,测定波长为600 nm。采用菌落计数法^[7]确定细菌浊度与吸光度 D_{600} 的关系,不同菌株的菌液 D_{600} 值约为0.2~0.3时,对应

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项经费(nyhyz07-043)、福建省科技计划重点项目(2009N0046)、福建省教育厅重点项目(JA09157)、福建省科技厅子课题(2009N2003-1)、厦门市科技局重点项目(3502Z20103023)、集美大学创新团队基金(2010A003)

关瑞章, 博士, 教授, 研究方向: 水产养殖与水产动物疾病学。E-mail: rzguan@jmu.edu.cn

活菌计数值约为 10^8 cfu/mL, 将菌液浓度稀释 10 倍调至 10^7 cfu/mL, 即可作为药敏试验接种的菌悬液。

1.5 体外药敏试验

4 种中药通过三联用配伍, 形成 4 个复方(复方 1 至复方 4)。根据复方中 3 种中药对 9 株病原菌的单用抑菌结果, 以 24 h 无菌落形成的最低浓度为中药对该菌株的最低抑菌浓度(MIC), 以 48 h 药板上无菌落形成的最低浓度为中药对该菌株的最低杀菌浓度(MBC)。分别以其 1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC 的药物浓度, 每种复方利用棋盘交叉法设计 27 个不同浓度配比; 将参与三联用的 3 种中药超微粉与 MHB 培养基混合, 采用琼脂稀释法配制药敏培养基, 经过高压灭菌后倒平板。以联用的 3 种中药单用抑菌的 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC、2MIC 浓度的药敏平板作为试验比较组。以不含药物平板作为空白对照组。

取已制备好的菌悬液 2 μ L 点种于经过 121 $^{\circ}$ C 20 min 灭菌后的琼脂培养基平板上, 每个药物浓度梯度做 2 组平行。放置 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 和 48 h, 观察平板上菌落的生长情况。若 2 个平行组的 MIC 值或 MBC 值不一致, 实验需重做。

1.6 试验结果处理

1) 三联用复方抑菌效果评价。本试验以 FIC

(fractional inhibitory concentration) 指标评价中药联用的抑菌效果。FIC 判读方法: $FIC \leq 0.5$ 为显著协同作用, FIC 值居于 0.5~1.0 之间为协同作用, $FIC = 1.0$ 为相加作用, FIC 值居于 1.0~3.0 之间为无关作用, $FIC \geq 3.0$ 为拮抗作用。FIC 的计算公式如下:

$$FIC \text{ 指数} = MIC_{\text{甲药联合}} / MIC_{\text{甲药单用}} + MIC_{\text{乙药联合}} / MIC_{\text{乙药单用}} + MIC_{\text{丙药联合}} / MIC_{\text{丙药单用}}$$

$$2) \text{ 中药成本计算。计算公式如下: } \sum(M \times P)n = M1 \times P1 + M2 \times P2 + \dots + Mn \times Pn$$

其中, M —复方中每种中药的最低抑菌浓度(kg/L); n —复方中的单种中药; P —单位药量的价格(元/kg)。

2 结果与分析

2.1 4 种中药对 9 株鳗鲡致病菌的抑制活性

4 种中药单用对养殖鳗鲡 9 株主要致病菌的体外抗菌活性见表 1。结果表明: 五倍子、大黄、石榴皮、虎杖对 9 株致病菌均有一定的抑杀效应, 但抑菌浓度高低差异明显, MIC 的范围跨度大, 从 0.063 mg/mL 至 6.000 mg/mL; 中药 I、中药 II、中药 III、中药 IV 的平均最低抑菌浓度分别为 0.167、1.000、0.792、1.875 mg/mL, 亦即 4 种中药的抗菌活性强弱顺序是中药 I > 中药 III > 中药 II > 中药 IV。

表 1 4 种中药对 9 株鳗鲡致病菌的体外抗菌效果

Table 1 MIC and MBC of four Chinese herbs(CH) on the nine pathogenic bacteria from eels mg/mL

病原菌 Pathogens	中药 I CH I		中药 II CH II		中药 III CH III		中药 IV CH IV	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B01	0.063	0.063	0.750	1.500	0.375	0.750	0.375	0.750
B02	0.250	0.500	0.750	0.750	0.750	1.500	0.375	0.375
B08	0.250	0.250	0.750	0.750	1.500	1.500	0.375	0.375
B09	0.250	0.250	1.500	3.000	0.375	0.750	3.000	3.000
B10	0.250	0.500	0.750	0.750	1.500	1.500	0.375	0.375
B15	0.125	0.125	0.750	1.500	0.750	0.750	3.000	6.000
B16	0.063	0.063	0.750	1.500	0.375	0.750	0.375	0.750
B18	0.125	0.125	1.500	3.000	0.750	0.750	3.000	3.000
B20	0.125	0.125	1.500	3.000	0.750	0.750	6.000	6.000
平均值 Average	0.167	0.222	1.000	1.750	0.792	1.000	1.875	2.292

2.2 三联用中药复方对 9 株致病菌的抑制作用

本试验研究了 4 个三联用中药复方对 9 株鳗鲡主要病原菌的抑制作用, 试验结果显示, 4 个复方(复方 1、复方 2、复方 3、复方 4)平均 FIC 分别为 0.45、0.45、0.49、0.53, 表明此 4 个中药复方均具有不同程度的协同抑菌效应, 针对每株致病菌的协同效应指数 FIC 范围位于 0.38~0.76 之间。抑菌效果最佳的复方是复方 1, 其 3 种中药的协同效应均为 $FIC \leq 0.5$, 对 9 株致病菌都呈现显著协同效应。

复方 2 的抑菌效果次之, 其 3 种中药仅对致病菌 B15 菌株的协同效果相对较弱, FIC 为 0.56; 而对其余致病菌株均表现显著协同作用。复方 4 对 9 株致病菌的抑制作用差于复方 2, 对 B01 和 B16 的 FIC 指数值为 0.76 ($FIC > 0.5$), 说明复方 4 药方中的 3 种药对 B01 和 B16 的抑制作用没有显著协同效应。复方 3 对 9 株致病菌的抑制协同作用亦略低于复方 2, 且对不同致病菌株的协同效应差异较大; 对 B01、B02、B16 的 $FIC > 0.5$, 说明复方 3 药方中 3

种药对这 3 株菌的抑制协同作用不明显;而对方中 3 种药对此 3 株菌具有非常显著的协同抗菌 B10、B18、B20 的 FIC 均为最小值 0.38,表明其药效果。

表 2 三联用中药复方对 9 株致病菌的抑制效果¹⁾

Table 2 The inhibitory effect of Chinese herbs triple compound(CHTC) on 9 strains of pathogenic bacteria

菌株 Pathogens	中药复方 1 CHTC I			中药复方 2 CHTC II			中药复方 3 CHTC III			中药复方 4 CHTC IV		
	FIC	评价 Evaluation		FIC	评价 Evaluation		FIC	评价 Evaluation		FIC	评价 Evaluation	
B01	0.50	SS		0.50	SS		0.62	S		0.76	S	
B02	0.38	SS		0.38	SS		0.62	S		0.50	SS	
B08	0.38	SS		0.50	SS		0.44	SS		0.50	SS	
B09	0.44	SS		0.38	SS		0.50	SS		0.44	SS	
B10	0.50	SS		0.38	SS		0.38	SS		0.50	SS	
B15	0.44	SS		0.56	S		0.50	SS		0.44	SS	
B16	0.50	SS		0.50	SS		0.62	S		0.76	S	
B18	0.44	SS		0.44	SS		0.38	SS		0.44	SS	
B20	0.44	SS		0.44	SS		0.38	SS		0.41	SS	

1)SS:显著协同 Significant synergies; S:协同 Synergy.

2.3 三联用中药复方体外抑菌试验的成本核算

4 种中药单用对养殖场常检测到的 9 株鳃霉主要病原菌抑制成本分别为:石榴皮 5.94 元/m³、五倍子 8.67 元/m³、大黄 11.00 元/m³、虎杖 13.13 元/m³。通过试验比较可知,复方 4 的平均抑菌成本最低,其次是复方 3、复方 1,抑菌成本最高的是复方 2。所有复方的抑菌成本都远低于各单方的抑菌成本:

复方 4、复方 3、复方 1、复方 2 对 9 株菌的平均抑制成本分别为 3.14、3.34、3.43、3.87 元/m³。复方 4、复方 1、复方 2 分别较虎杖单用节约成本 81.19%、78.83%、76.24%,复方 4、复方 3、复方 2 分别较五倍子单用节约成本 72.15%、66.51%、64.01%,复方 4、复方 1、复方 3 分别较石榴皮单用节约成本 58.42%、53.20%、51.20%;复方 1、复方 3、复方 2 分别较大黄单用节约成本 74.73%、73.64%、47.47%。

3 讨论

3.1 中药三联用对 9 株养殖鳃霉致病菌的抑制效果

本试验采用三联用的方式研究了 4 种中药复方对 9 株鳃霉养殖场常检测到的病鳃主要病原菌的抑制作用。试验结果表明,4 个中药复方对 9 株致病菌均存在协同抑制作用,且联用效果最好的是中药复方 1,药方中的 3 种中药对 9 株致病菌的抑制均具有显著协同作用,3 种中药的最低抑菌浓度分别降低了 87%、80%、89%;其余 3 个复方中的 3 种中药联用对不同致病菌株的协同效应存在差异,但联用的 3 种中药均比中药单用的最低抑菌浓度降低比率超过 79%。由此说明,中药联用可以大大降低复

方中各种药的抗菌使用浓度。彭金菊等^[3]研究了五倍子、黄芩、石榴皮等中药及复方对嗜水气单胞菌的体外抑制效果。单方抑菌试验结果显示,五倍子对嗜水气单胞菌抑制作用较明显,其 MIC 为 6.25 mg/mL,紫草的 MIC 为 50 mg/mL;复方抑菌试验结果显示,五倍子与牡丹皮、栀子、苦参组成复方的 MIC 值均为 0.391 mg/mL,紫草、生地黄、蒲公英、蛇床子组成复方的 MIC 值均为 0.781 mg/mL,表明中药联用复方可以有效降低单种中药的使用浓度,与本试验的结果相符。

3.2 中药联用在实际生产中的运用

本试验研究了 4 种中药三联用组成的 4 个复方对鳃霉主要病原菌的抑制作用以及通过药物使用成本核算,结果显示 4 种中药复方在有效地降低单种中药使用量的同时,还可以大大降低药物的使用成本,与中药单用比较,节约成本均达 47% 以上。多种中药的联用,不仅在体外可以较好地抑制病原菌的生长;而且若以拌饵形式给药,还可以发挥中药内抗菌以外的有效成分的作用,达到提高鱼体免疫力的作用。王广军等^[8]以含有大黄、甘草、黄芪等组分的中药复方为饲料添加剂,喂养日本鳃霉,研究了中药复方对其生长以及非特异性免疫的影响,试验结果显示,中药免疫添加剂具有显著促生长和增强机体免疫能力的作用。本文体外药敏试验获得的高效抗菌复方 1,对鱼体促生长和增强免疫的作用还有待进一步活体给药研究。

3.3 中药复方研究展望

中药的运用在我国已有几千年的历史^[7],积累了大量的临床经验。多种中药的合理联用,不仅可以通过主要化学成分间的增溶、助溶等物理作用,提

高有效成分的溶出率,增强药效^[9];更可以在宏观上调节各药物的药性,提高机体的免疫力^[10-11]。因此,在渔药的开发过程中可以在研究单一药物抗病效果的基础上,系统研究复方中药在防治水产养殖动物疾病中的疗效;而且在实际应用中还可在药方中添加某些维生素以及其他微量元素,使之与中药复方形成合理搭配,从而增强动物机体的免疫能力和抗病能力。本试验研究涉及筛选高效抗鳗鲡病原菌的广谱性的中药复方,为进一步开发安全、高效、环境友好型的鱼病防治药物提供科学的参考数据。

参 考 文 献

- [1] 樊海平. 我国鳗鲡养殖业的现状与发展对策[J]. 科学养鱼, 2006(3):1-2.
- [2] 陈爱萍. 鳗鲡养殖病害、用药情况及对策[J]. 科学养鱼, 2003(8):38.
- [3] 彭金菊, 马骏, 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]. 中兽医医药杂志, 2009, 28(6):5-7.
- [4] PUNITHA S M J, BABU M M. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection [J]. *Aquaculture International*, 2008, 16:511-523.
- [5] 刘宏伟, 关瑞章, 黄文树. 不同加工处理中草药对鳗鲡主要致病菌抑制作用的比较[J]. 集美大学学报:自然科学版, 2009, 14(3):229-233.
- [6] 郭松林, 关瑞章, 冯建军. 嗜水气单胞菌感染对美洲鳗鲡不同血细胞免疫功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4):463-466.
- [7] 梁用本. 中草药在防治鱼病中的应用[J]. 渔业致富指南, 2004(18):53.
- [8] 王广军, 谢骏, 胡隐昌, 等. 中草药添加剂对日本鳗鲡生长和非特异性免疫效应的研究[J]. 水利渔业, 2008, 38(6):38-41.
- [9] 曾惠芳, 苏子仁, 史俏蓉, 等. 虎杖单煎, 复方共煎过程中的物理化学变化初探[J]. 中国药房, 1999, 10(3):112-113.
- [10] 胡先勤, 侯永清. 中草药提取物对鲫鱼生长及体成分的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2005(5):40-41.
- [11] 王吉桥, 孙永新, 张剑诚. 金银花等复方草药对牙鲆生长、消化和免疫能力的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(1):90-96.

Inhibitory effect of four kinds of Chinese herbs and triple compounds against main pathogenic bacteria from cultivated eels

GUAN Rui-zhang^{1,2} LI Zhong-qin^{1,2} GUO Song-lin^{1,2} LIU Hong-wei^{1,2} WANG Li-hong¹

1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Ministry of Education, Engineering Research Center of Eel Modern Industrial Technology, Xiamen 361021, China

Abstract *Rhus chinensis* Mill (RCM), *Rheum palmatum* Linn (RPL), *Rhizoma polygoni* Cuspidati (RPC), and *Punica granatum* Linn (PGL), were first ground into 5-10 μm superfine powder with ultra-pulverization. Then they were mixed one by one based on chessboard experimental method to get four kinds of compounds of Chinese herbs. To study inhibition activity of the compounds, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of single drug and the triple compounds against nine strains of pathogenic bacteria from eels were measured with agar dilution method. The results showed that four kinds of Chinese herbs had certain antibacterial effects on nine bacteria. RCM had the best antibacterial effect, followed by PGL and RPL, and RPC had little antibacterial effect. Four triple combinations had synergism antibacterial effects on pathogenic bacteria, and the value of FIC was from 0.38 to 0.76. Antibacterial synergistic effect of prescription No. 1 was the best, whose value of FIC is less than or equal to 0.5 against nine strains of pathogenic bacteria. The inhibitory concentration of each triple compounds reduced at least 79%, and the cost calculated in aquaculture production was lower than single Chinese herbs at least 45%.

Key words eel; pathogenic bacteria; Chinese herbs; antibacterial synergistic effect

(责任编辑:边书京)