

50 味中药与 8 种抗生素对变形假单胞菌 的体外抑菌作用

徐晓津^{1,2}, 李秀华³, 马一帆⁴, 李慧耀^{1,2}, 祁欣^{1,2}, 郑江^{1,2}, 鄢庆枇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建天马科技股份有限公司, 福建 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] 用牛津杯法选择诃子、大黄、黄连等 50 种单方中药对变形假单胞菌、金黄色葡萄球菌进行体外抑菌试验, 并选用抑菌作用较好的药物组成复方二联、三联中药, 药物质量浓度为 60, 240 mg/mL。结果表明: 单方中药中, 诃子对变形假单胞菌抑菌作用明显, 为极敏感; 复方二联中药中, 240 mg/mL 的诃子 + 白芍等 4 种对变形假单胞菌的抑菌作用明显, 为极敏感; 复方三联中药中, 60 mg/mL 的黄连 + 板蓝根 + 黄柏等 5 种对变形假单胞菌的抑菌效果为极敏感, 240 mg/mL 的黄连 + 连翘 + 黄芪等 6 种对变形假单胞菌的抑菌作用为极敏感; 变形假单胞菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、硫酸新霉素及硫酸庆大霉素 4 种药物高度敏感。由此认为黄连 + 板蓝根 + 黄柏等 11 个复方三联中药与恩诺沙星对变形假单胞菌抑菌作用最强, 同时筛选出多个抑菌作用效果良好的复方三联中药和抗生素, 可用于鱼病防治研究。

[关键词] 变形假单胞菌; 中药; 抗生素; 抑菌作用

[中图分类号] S 853

In vitro Bacteriostasis of 8 Kinds of Antibiotics , 50 Kinds of Chinese Herbs and Their Compound Prescriptions on *Pseudomonas plecoglossicida*

XU Xiaojin^{1,2}, LI Xiuhua³, MA Yifan⁴, LI Huiyao^{1,2}, QI Xin^{1,2}, ZHENG Jiang^{1,2}, YAN Qingpi^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Tianma Science and Technology Group Co. Ltd., Fuzhou 350308, China;

3. Department of Traditional Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361021, China; 4. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Fifty kinds of Chinese herbs, which included *Terminalia chebula*, *Rheum officinale*, and *Captis chinensis* etc, were employed to test their antibacterial effect on *Pseudomonas plecoglossicida* and *Staphylococcus aureus* by using oxford-cup tests *in vitro*. Then the herbs that had optimal effect were chosen to compose as combination compounds prescription to compare their antibacterial activity. The concentrations of Chinese medicines

[收稿日期] 2018-12-05

[基金项目] 福建省特种水产配合饲料重点实验室资助开放课题基金项目 (TMKJZ1907); 福建省自然科学基金项目 (2018J01455); 国家自然科学基金项目 (31702384); 福建省科技重大专项 (2016NZ0001-3); 集美大学研究生教育教学改革研究项目 (YJG1912); 教育部鳗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, 从事水产微生物学研究。通信作者: 鄢庆枇 (1971—), 教授。E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

were 60 mg/mL and 240 mg/mL respectively. 8 kinds of antibacterial drugs against *Pseudomonas plecoglossicida* were tested. Results showed that *Terminalia chebula* had obvious inhibitory effect. When the concentrations was 240 mg/mL, 4 kinds of couplet compound prescriptions, such as *Terminalia chebula* and *Paeoniaactilora pall*, had obvious inhibitory effect. When the concentrations was 60 mg/mL, 5 kinds of triple compound prescriptions, such as *Coptischinensis*, *Radix isatidis* and *Cortex phellodendri* had obvious inhibitory effect. When the concentrations was 240 mg/mL, 6 kinds of triple compound prescriptions, such as *Coptischinensis*, *Fructus forsthaie* and *Radix astragali* had obvious inhibitory effect. *Pseudomonas plecoglossicida* were susceptible to enrofloxacin, oxytetracycline, neomycin sulfate and gentamicin sulfate. A part of Chinese drugs had no obvious inhibitory effect, 11 kinds of triple compound prescriptions such as *Coptischinensis*, *Radix isatidis* and *Cortex phellodendri* had obvious inhibitory effects. The present study can provide traditional triple Chinese medicines formula and antibiotics for preventing the diseases of *Pseudomonas plecoglossicida*.

Keywords: *Pseudomonas plecoglossicida*; Chinese herbs; antibiotic; antibacterial activity

0 引言

石斑鱼 (*Epinephelu* spp.) 养殖规模日益扩大, 但由于细菌疾病暴发, 带来了严重的经济损失。变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 是闽东地区大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 内脏白点病的病原菌^[1]。大黄鱼内脏白点病是一种典型的温度依赖性疾病, 仅在水温 16 ~ 20 °C 下暴发, 当水温超过 20 °C 时该病自然消退^[2]。斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 人工感染变形假单胞菌后出现了内脏白点病, 死亡率达到 100%^[3]。目前养殖场主要采用抗生素进行鱼类细菌性疾病防治, 这导致病原菌产生耐药性, 并造成鱼类的药物残留, 从而影响人类健康。中药具有价格低廉、副作用小、来源广、药用低毒、低残留和不易产生耐药性等优点, 有广阔的应用前景。一些学者发现多种中药对细菌体外抑制作用较强, 是治疗鱼类细菌性疾病的抗生素替代药物或辅助药物^[4]。同时, 随着无公害养殖规模的不断扩大, 筛选有较强灭菌作用的中药来进行水生动物的细菌性疾病防控已成为当前研究的热点和趋势^[4]。

本研究选用诃子、大黄、黄连等 50 种中药作为试验用药。先进行 50 种单方中药体外抑菌实验, 从中选出抑菌效果较好的单方中药配制成复方二联、三联中药, 再通过抑菌试验筛选出对鱼类主要病原菌体外抑菌效果强的复方, 同时还进行了变形假单胞菌对生产上常用抗生素的药敏研究。研究目的主要是筛选药效较强的复方中药配方与抗生素, 为生产实践的中药配伍治疗鱼类细菌性疾病提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 中药对变形假单胞菌体外抑菌实验

1.1.1 供试菌种

变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 1 株与实验标准菌株金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureu*) 1 株菌液的制备: 变形假单胞菌为石斑鱼常见的致病菌, 分离自患病石斑鱼。金黄色葡萄球菌为本实验室保存的。将两株菌分别用 LB 液体培养基于 28 °C 下恒温培养 8 ~ 12 h, 取对数生长期的菌液。PBS 缓冲液调整菌液浓度 OD 值为 0.5 (含菌量约为 10^8 cfu/mL), 置于 4 °C 冰箱内保存, 备用。

1.1.2 单方中药的选取与药液制备

选择水产养殖生产上报道过的 50 种中药进行石斑鱼常见细菌病原——变形假单胞菌的体外抑菌实验。中药颗粒包括: 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、五味子、党参、枸杞子、甘草、白

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

头翁、五倍子、诃子、茯苓、钩藤、虎杖、郁金、桂皮醛、香草醛、茵香醛、金线草、墨旱莲、炒槐花、野菊花,均购于江阴天江药业有限公司,将中药颗粒分别溶解于无菌蒸馏水中,再一一置于盛有沸水的烧杯内,隔水加热 0.5 h,待中药充分溶解,使中药颗粒剂溶液的质量浓度为 240 mg/mL。

1.1.3 复方中药的选取与药液制备

选择 1.1.2 单方中药体外抑菌圈较大的 22 种中药颗粒: 诃子、黄连、乌梅、大黄、黄柏、白芍、五味子、栀子、黄芩、连翘、槐花、甘草、板蓝根、黄芪、木香、艾叶、苦参、蒲公英、贯众、炒槐花、炒川楝子、野菊花,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经验,制定复方二联、三联中药。按 1.1.2 方法配制成为中药颗粒剂溶液,复方二联中药的两味药按 1:1 比例,三联的三味药按 1:1:1 比例,每方中药都配成 240 mg/mL 和 60 mg/mL 两种质量浓度备用。

1.1.4 中药体外抑菌活性的测定

在 LB 液体培养基中添加 20 g/L 琼脂配制成固体培养基。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 个牛津杯并浸入培养基中,再取 15 mL LB 培养基混匀倒入平板,待凝固后,取下牛津杯,将变形假单胞菌和金黄色葡萄球菌稀释至 10^8 cfu/mL,用移液枪吸取 0.1 mL 菌悬液,滴入平板,用涂布棒涂匀,再用移液枪加入 200 μ L/孔的无菌水作为阴性对照,在另三个孔中用移液枪加入含生药 240 mg/mL 的三种不同药液 (200 μ L/孔),28 $^{\circ}$ C 恒温培养 18~24 h,利用 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,每个实验重复 3 次。计算抑菌圈直径平均值,根据抑菌圈直径大小判定其抑菌能力的强弱。参照文献 [5] 的判定标准,本文判定标准为: 抑菌直径 ≥ 20 mm 为极敏感“+ + +”,15 mm \leq 抑菌直径 < 20 mm 为高敏“+ +”,10 mm \leq 抑菌直径 < 15 mm 为中敏“+”,抑菌直径 < 10 mm 为低敏或无效“-”。

1.2 抗生素体外抑菌活性的测定

参照 WHO 推荐的 K-B 纸片琼脂扩散法^[6]中关于恩诺沙星、盐酸多西环素、土霉素、磺胺嘧啶、氟苯尼考、硫酸新霉素、硫酸庆大霉素、磺胺甲噁唑 8 种药敏纸片的药物浓度,用牛津杯法,在每孔中加入以上药物。恩诺沙星购自兴化市恒威生物技术有限公司,盐酸多西环素购自河南海天生物科技有限公司,土霉素购自河南佰吉特生物科技有限公司,磺胺嘧啶购自山东亚康药业股份有限公司,氟苯尼考购自上海瑞博丘生物工程有限公司,硫酸新霉素购自宜兴市苏亚达生物有限公司,硫酸庆大霉素购自青岛富坤兽药原料有限公司,磺胺甲噁唑购自广州骏杰生物技术有限公司。

将变形假单胞菌与金黄色葡萄球菌分别用 0.85% (体积分数) 生理盐水稀释至 1×10^8 cfu/mL,分别取 200 μ L 菌悬液均匀涂布于 LB 固体培养基平板上,每个平板放 4 个牛津杯,每个孔分别加入以上 8 种抗生素药液。28 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 后,用 SupcreG1 菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪测量抑菌圈大小,每个实验重复 3 次,根据 CLSI M100 的最新标准判定结果判定变形假单胞菌与金黄色葡萄球菌的敏感性。

2 结果

2.1 不同中药对变形假单胞菌的体外抑制效果

2.1.1 不同单方中药对变形假单胞菌的体外抑菌效果

不同单方草药对变形假单胞菌的体外抑菌效果见表 1。在中药质量浓度为 240 mg/mL 时,诃子对变形假单胞菌抑菌作用明显,为极敏感;乌梅对变形假单胞菌的抑菌作用较明显,为高敏;黄连、白芍、大黄的抑菌效果为中敏。由此认为,灭菌作用以诃子为最强。参照不同单方中药对标准实验菌株金黄色葡萄球菌的抑菌直径数据,说明本实验结果可信度强。艾叶、鱼腥草、黄柏、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、槟榔、榧子、使君子、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、五味子、党参、枸杞

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

子、甘草、白头翁、五倍子、茯苓、钩藤、虎杖、柴胡、郁金、桂皮醛、香草醛、茵香醛、金线草、墨旱莲、炒槐花、野菊花等 45 种中草药无抑菌效果。

表 1 240 mg/mL 单方中药对变形假单胞菌的抑菌作用

Tab. 1 *In vitro* bacteriostatic effect of single Chinese herbs (240 mg/mL) on *P. plecoglossicida*

中药名称 Chinese herb	变形假单胞菌 <i>P. plecoglossicida</i>		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	
	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	相对敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	相对敏感度 Sensitivity
诃子 <i>Terminalia chebula</i>	28.88 ± 0.96	+ + +	26.09 ± 0.22	+ + +
乌梅 <i>Fructus mume</i>	15.36 ± 0.26	+ +	12.82 ± 1.36	+
黄连 <i>Coptis chinensis</i>	12.84 ± 0.76	+	31.10 ± 0.62	+ + +
白芍 <i>Paeonia lactiflora</i> Pall	11.77 ± 0.64	+	11.70 ± 0.49	+
大黄 <i>Rheum officinale</i>	10.60 ± 0.47	+	17.52 ± 0.30	+ +

说明 “+ + +” 为极敏感, “+ +” 为高敏, “+” 为中敏, “-” 为低敏或无效。

Notes “+ + +” indicates the sensibility is extreme sensitivity, “+ +” indicates the sensibility is high sensitivity, “+” indicates the sensibility is slight sensitivity, “-” indicates the sensibility is insensitivity.

2. 1. 2 不同复方二联中药对变形假单胞菌的体外抑制效果

当复方二联药物质量浓度为 60 mg/mL 时, 黄芩 + 诃子组成的复方中药的抑菌效果为中敏; 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 + 五味子、乌梅 + 五味子、乌梅 + 白芍、炒槐花 + 炒川楝子等 22 个复方中药无药效。

如表 2 所示, 当药物质量浓度为 240 mg/mL 时, 诃子 + 白芍、黄芩 + 诃子、诃子 + 五味子、连翘 + 黄连这 4 种复方中药对变形假单胞菌的抑菌作用明显, 为极敏感, 抑菌直径大于 20 mm; 诃子 + 乌梅、黄芪 + 大黄、连翘 + 黄柏、板蓝根 + 诃子、槐花 + 黄柏、黄芪 + 黄连、槐花 + 黄连、槐花 + 大黄、黄连 + 木香、乌梅 + 白芍、黄柏 + 诃子这 11 种复方中药对变形假单胞菌的抑菌作用较明显, 为高敏; 艾叶 + 黄连、黄芪 + 白芍、栀子 + 大黄、连翘 + 黄芩、乌梅 + 五味子、贯众 + 白芍、栀子 + 黄芩、蒲公英 + 黄连、蒲公英 + 苦参、艾叶 + 野菊花、蒲公英 + 五味子、蒲公英 + 板蓝根、苦参 + 五味子、野菊花 + 板蓝根、蒲公英 + 野菊花这 15 种复方中药的抑菌效果为中敏; 蒲公英 + 木香、黄连 + 板蓝根、黄柏 + 黄连、黄连 + 白芍、黄连 + 五味子、大黄 + 黄连、黄连 + 诃子、黄柏 + 板蓝根、黄连 + 乌梅、黄柏 + 五味子、黄芩 + 乌梅、黄柏 + 白芍、黄芩 + 黄连、黄芩 + 板蓝根、黄柏 + 乌梅、大黄 + 黄柏、大黄 + 黄芩、黄柏 + 黄芩、板蓝根 + 乌梅、白芍 + 五味子、栀子 + 连翘、贯众 + 连翘这 22 个复方中药组合有拮抗作用, 无药效。参照复方二联中药对标准菌种金黄色葡萄球菌的抑菌直径数据, 说明本实验结果可信度强。相对于单方中药, 复方二联中药的药效更强, 选择协同增效的药物组合能增强疗效。

2. 1. 3 不同复方三联中药对变形假单胞菌的体外抑制效果

当复方三联药物质量浓度在 60 mg/mL 时, 黄连 + 板蓝根 + 黄柏、黄连 + 黄芪 + 黄柏、黄连 + 白芍 + 黄芪、乌梅 + 板蓝根 + 黄连、黄柏 + 五味子 + 黄芪等 5 种复方三联中药的抑菌效果为极敏感; 黄连 + 诃子 + 黄柏、黄连 + 乌梅 + 黄柏、黄连 + 五味子 + 黄柏、黄连 + 连翘 + 黄柏、乌梅 + 黄芩 + 诃子、黄连 + 大黄 + 黄柏、乌梅 + 五味子 + 黄连等 7 种复方中药的抑菌效果为高敏; 诃子 + 乌梅 + 甘草、乌梅 + 五味子 + 诃子、诃子 + 白芍 + 甘草、黄连 + 白芍 + 黄柏、乌梅 + 黄柏 + 黄连、黄连 + 大黄 + 黄芪、乌梅 + 白芍 + 黄连、乌梅 + 黄芩 + 黄连等 8 种复方中药的抑菌效果为中敏; 蒲公英 + 五味子 + 诃子、诃子 + 白芍 + 蒲公英、诃子 + 五味子 + 板蓝根、蒲公英 + 野菊花 + 诃子、诃子 + 乌梅 + 板蓝根、乌梅 + 黄柏 + 诃子、黄连 + 五味子 + 黄芪、诃子 + 五味子 + 甘草、乌梅 + 白芍 + 诃子、诃子 + 白芍 + 板蓝根、黄连 + 连翘 + 黄芪、黄连 + 板蓝根 + 黄芪、诃子 + 乌梅 + 蒲公英、板蓝根 + 诃子 + 甘草、

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

表2 240 mg/mL 复方二联中药对变形假单胞菌的抑菌作用
 Tab.2 *In vitro* bacteriostatic effect of couplet compound prescriptions(240 mg/mL)
 on *Pseudomonas plecoglossicida*

中药组方 Compound prescription	变形假单胞菌 <i>P. plecoglossicida</i>		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	
	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对敏感度 Sensitivity
B + G	24.25 ± 0.18	+++	32.27 ± 0.94	+++
A + B	21.30 ± 0.74	+++	18.60 ± 0.44	++
B + H	21.08 ± 1.51	+++	30.07 ± 1.39	+++
J + C	21.02 ± 2.23	+++	-	-
B + E	18.89 ± 1.63	++	28.91 ± 1.45	+++
K + I	18.47 ± 1.07	++	9.89 ± 0.91	-
J + F	18.19 ± 2.86	++	-	-
V + B	17.77 ± 0.72	++	16.35 ± 0.49	++
M + F	17.76 ± 0.62	++	9.12 ± 0.42	-
K + C	17.25 ± 0.29	++	-	-
M + C	16.90 ± 1.06	++	-	-
M + I	16.44 ± 2.67	++	-	-
C + N	16.39 ± 1.50	++	-	-
E + G	16.12 ± 0.05	++	-	-
F + B	15.40 ± 1.24	++	12.94 ± 0.74	+
O + C	14.99 ± 0.79	+	-	-
K + G	14.95 ± 0.88	+	10.36 ± 0.42	+
D + I	14.85 ± 3.06	+	-	-
J + A	14.81 ± 1.75	+	-	-
E + H	13.00 ± 2.90	+	11.98 ± 1.09	+
Q + G	12.96 ± 1.70	+	12.43 ± 1.66	+
D + A	12.28 ± 0.90	+	-	-
R + C	11.78 ± 1.55	+	-	-
R + S	11.66 ± 3.69	+	-	-
O + T	11.58 ± 0.52	+	-	-
R + H	11.29 ± 2.73	+	-	-
R + V	10.74 ± 1.07	+	-	-
S + H	10.31 ± 0.48	+	-	-
T + V	10.23 ± 0.15	+	-	-
R + T	10.04 ± 0.94	+	-	-
R + N	9.65 ± 0.16	-	-	-

说明: 1) “+++”为极敏感, “++”为高敏, “+”为中敏, “-”为低敏或无效; 2) A - 黄芩, B - 诃子, C - 黄连, D - 栀子, E - 乌梅, F - 黄柏, G - 白芍, H - 五味子, I - 大黄, J - 连翘, K - 黄芪, M - 槐花, N - 木香, O - 艾叶, Q - 贯众, R - 蒲公英, S - 苦参, T - 野菊花, V - 板蓝根。

Notes: 1) “+++” indicates the sensibility is extreme sensitivity, “++” indicates the sensibility is high sensitivity, “+” indicates the sensibility is slight sensitivity, “-” indicates the sensibility is insensitivity; 2) A - *Scutellaria baicalensis*, B - *Terminalia chebula*, C - *Coptis chinensis*, D - *Fructus gardeniae*, E - *Fructus mume*, F - *Golden cypress*, G - *Paeonia lactiflora* Pall, H - *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, I - *Rheum officinale*, J - *Forsythia suspensa* Vahl, K - *Astragalus mongholicus*, M - *Sophora japonica* L., N - *Radices saussureae*, O - *Artemisia argy*, Q - *Cyrtomium fortunei*, R - *Dandelion*, S - *Sophora flavescens*, T - *Flos chrysanthemi indic*, V - *Radix isatidis*.

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

蒲公英 + 苦参 + 诃子、大黄 + 栀子 + 白芍、白芍 + 五味子 + 大黄、黄连 + 乌梅 + 黄芪、大黄 + 槐花 + 白芍、大黄 + 黄芪 + 白芍、白芍 + 贯众 + 大黄、苦参 + 五味子 + 白芍、黄芩 + 诃子 + 黄芪、蒲公英 + 木香 + 诃子、黄柏 + 诃子 + 黄芪、黄芩 + 连翘 + 黄芪、黄芩 + 板蓝根 + 黄芪等 27 种复方中药无抑菌效果 (见表 3)。

表 3 60 mg/mL 复方三联中药对变形假单胞菌的抑菌作用

Tab.3 *In vitro* bacteriostatic effect of triple compound prescriptions of Chinese herbs triple-linked(60 mg/mL) on *Pseudomonas plecoglossicida*

中药复方 Compound prescriptions	变形假单胞菌 <i>P. plecoglossicida</i>		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	
	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对敏感度 Sensitivity
C + V + F	24.34 ± 2.48	+ + +	21.43 ± 3.37	+ + +
E + V + C	22.53 ± 3.76	+ + +	-	-
F + H + K	21.11 ± 2.15	+ + +	-	-
C + K + F	21.95 ± 1.48	+ + +	19.49 ± 1.29	+ +
C + G + K	21.94 ± 2.49	+ + +	18.66 ± 2.62	+ +
C + B + F	19.64 ± 1.54	+ +	20.50 ± 3.42	+ + +
C + E + F	18.47 ± 0.77	+ +	21.42 ± 2.78	+ + +
C + I + F	18.15 ± 2.50	+ +	-	-
E + H + C	17.05 ± 2.08	+ +	-	-
C + H + F	16.72 ± 2.04	+ +	19.64 ± 1.47	+ +
C + J + F	16.58 ± 0.65	+ +	15.84 ± 2.34	+ +
E + A + B	15.76 ± 0.79	+ +	21.73 ± 2.45	+ + +
B + E + W	14.76 ± 3.15	+	17.33 ± 1.55	+ +
E + H + B	14.70 ± 1.56	+	20.30 ± 2.15	+ + +
B + G + W	14.02 ± 0.94	+	11.32 ± 0.78	+
C + I + K	13.45 ± 0.84	+	18.07 ± 2.43	+ +
C + G + F	12.75 ± 1.68	+	20.58 ± 2.05	+ + +
E + F + C	13.49 ± 0.53	+	-	-
E + G + C	13.80 ± 1.03	+	-	-
E + A + C	11.25 ± 2.41	+	-	-

说明: 1) “+ + +” 为极敏感, “+ +” 为高敏, “+” 为中敏, “-” 为低敏或无效; 2) C - 黄连, V - 板蓝根, F - 黄柏, E - 乌梅, H - 五味子, K - 黄芪, G - 白芍, B - 诃子, I - 大黄, J - 连翘, A - 黄芩, W - 甘草。

Notes: 1) “+ + +” indicates the sensibility is extreme sensitivity, “+ +” indicates the sensibility is high sensitivity, “+” indicates the sensibility is slight sensitivity, “-” indicates the sensibility is insensitivity; 2) C - *Coptis chinensis*, V - *Radix isatidis*, F - *Golden cypress*, E - *Fructus mume*, H - *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, K - *Astragalus mongholicus*, G - *Paeonia lactiflora* Pall, B - *Terminalia chebula*, I - *Rheum officinale*, J - *Forsythia suspensa* Vahl, A - *Scutellaria baicalensis*, W - *Licorice*.

当复方三联药物质量浓度为 240 mg/mL 时, 黄连 + 连翘 + 黄芪、黄连 + 乌梅 + 黄芪、黄连 + 乌梅 + 黄柏、黄连 + 板蓝根 + 黄柏、黄连 + 五味子 + 黄芪、黄连 + 连翘 + 黄柏等 6 种复方中药对变形假单胞菌的抑菌作用明显, 抑菌直径大于 20mm, 为极敏感; 黄连 + 白芍 + 黄柏、黄连 + 白芍 + 黄芪、黄连 + 黄芪 + 黄柏、黄连 + 诃子 + 黄柏、黄连 + 五味子 + 黄柏、乌梅 + 板蓝根 + 黄连、乌梅 + 五味子 + 黄连、乌梅 + 黄芩 + 黄连、黄连 + 板蓝根 + 黄芪、黄连 + 大黄 + 黄芪、黄连 + 大黄 + 黄柏等 11 种复方中药对变形假单胞菌的抑菌作用较明显, 为高敏; 诃子 + 白芍 + 甘草、乌梅 + 黄芩 + 诃子、诃子 + 乌梅 + 甘草、乌梅 + 五味子 + 诃子、乌梅 + 白芍 + 黄连、黄柏 + 五味子 + 黄芪等 6 种复方中药对变形假单胞菌的抑菌效果为中敏; 诃子 + 白芍 + 蒲公英、诃子 + 乌梅 + 蒲公英、诃子 + 五味子 + 甘草、蒲公英 + 五味子 + 诃子、乌梅 + 白芍 + 诃子、乌梅 + 板蓝根 + 诃子、乌梅 + 黄柏 + 诃子、板蓝根 + 诃子 +

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

甘草、蒲公英+苦参+诃子、大黄+栀子+白芍、蒲公英+野菊花+诃子、大黄+槐花+白芍、诃子+五味子+板蓝根、大黄+黄芪+白芍、诃子+白芍+板蓝根、白芍+贯众+大黄、苦参+五味子+白芍、黄芩+诃子+黄芪、蒲公英+木香+诃子、黄柏+诃子+黄芪、黄芩+连翘+黄芪、黄芩+板蓝根+黄芪、白芍+五味子+大黄等23种复方中药无抑菌效果(见表4)。

表4 240 mg/mL 复方三联中药对变形假单胞菌的抑菌作用

Tab.4 *In vitro* bacteriostatic effect of triple compound prescriptions of Chinese herbs triple-linked(240 mg/mL) on *Pseudomonas plecoglossicida*

中药组方 Compound prescriptions	变形假单胞菌 <i>P. plecoglossicida</i>		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	
	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	相对敏感度 Sensitivity
C + J + K	21.23 ± 2.47	+ + +	21.10 ± 1.43	+ + +
C + E + K	21.25 ± 2.47	+ + +	-	-
C + E + F	20.83 ± 2.47	+ + +	18.77 ± 1.43	+ +
C + V + F	20.38 ± 2.51	+ + +	17.88 ± 1.03	+ +
C + H + K	20.27 ± 1.23	+ + +	18.70 ± 0.48	+ +
C + J + F	20.06 ± 2.04	+ + +	16.56 ± 1.03	+ +
C + G + F	19.94 ± 1.33	+ +	18.44 ± 1.02	+ +
C + G + K	19.88 ± 0.72	+ +	21.06 ± 1.82	+ + +
C + K + F	19.82 ± 1.00	+ +	17.22 ± 2.01	+ +
C + B + F	19.57 ± 1.21	+ +	17.05 ± 0.94	+ +
C + H + F	19.44 ± 1.36	+ +	19.59 ± 2.74	+ +
E + V + C	19.24 ± 1.35	+ +	-	-
E + H + C	18.53 ± 1.05	+ +	-	-
E + A + C	18.36 ± 2.50	+ +	-	-
C + V + K	18.80 ± 2.48	+ +	16.82 ± 1.34	+ +
C + I + K	18.18 ± 2.48	+ +	16.01 ± 1.20	+ +
C + I + F	17.98 ± 1.43	+ +	17.11 ± 3.43	+ +
B + G + W	12.98 ± 2.15	+	15.26 ± 1.35	+ +
E + A + B	12.93 ± 1.02	+	16.07 ± 1.46	+ +
B + E + W	12.35 ± 1.24	+	16.67 ± 0.79	+ +
E + H + B	12.22 ± 0.98	+	17.07 ± 0.98	+ +
E + G + C	12.11 ± 0.53	+	-	-
F + H + K	10.18 ± 0.88	+	-	-

说明: 1) “+ + +”为极敏感, “+ +”为高敏, “+”为中敏, “-”为低敏或无效; 2) C - 黄连, K - 黄芪, E - 乌梅, F - 黄柏, V - 板蓝根, H - 五味子, J - 连翘, G - 白芍, B - 诃子, A - 黄芩, I - 大黄, W - 甘草。

Notes: 1) “+ + +” indicates the sensibility is extreme sensitivity, “+ +” indicates the sensibility is high sensitivity, “+” indicates the sensibility is slight sensitivity, “-” indicates the sensibility is insensitivity; 2) C - *Coptis chinensis*, J - *Forsythia suspensa* Vahl, K - *Astragalus mongolicus*, E - *Fructus mume*, F - *Golden cypress*, V - *Radix isatidis*, H - *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, G - *Paeonia lactiflora* Pall, B - *Terminalia chebula*, A - *Scutellaria baicalensis*, I - *Rheum officinale*, W - *Licorice*.

参照复方三联中药对标准实验菌种金黄色葡萄球菌的抑菌直径数据,说明本实验结果可信度强(见表3、4)。相对于一联、二联中药的药效,三联中药抑菌作用强的复方数较多,但三联复方中起拮抗作用降低药效的药物组合也较多。

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

2.2 抗生素药物敏感试验

由表 5 可见, 变形假单胞菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、硫酸新霉素及硫酸庆大霉素 4 种药物高度敏感, 对氟苯尼考、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 2 种药物中度敏感, 对土霉素、磺胺嘧啶 2 种药物耐药。

表 5 变形假单胞菌对抗生素的药物敏感性

Tab.5 Antibiotic sensitivity of *Pseudomonas plecoglossicida*

药物 Drugs	抑制圈直径判断标准/mm Judgement standard of inhibition zone diameter			含量 Dose /($\mu\text{g} \cdot \text{孔}$ Hole) ⁻¹	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	敏感度 Sensitivity
	R	I	S			
恩诺沙星 Enrofloxacin	≤15	15 ~ 21	≥21	5	22.55 ± 1.82	S
盐酸多西环素 Oxytet racycline	≤12	12 ~ 16	≥16	30	20.30 ± 1.06	S
硫酸新霉素 Neomycin sulfate	≤12	12 ~ 17	≥17	30	19.12 ± 1.28	S
硫酸庆大霉素 Gentamicin sulfate	≤12	12 ~ 15	≥15	10	16.85 ± 0.96	S
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 Trimethoprim	≤10	10 ~ 16	≥16	25	12.58 ± 1.22	I
氟苯尼考 Florfenico	≤12	12 ~ 18	≥18	30	15.16 ± 1.01	I
土霉素 Oxytetracycline	≤14	14 ~ 19	≥19	30	13.54 ± 1.12	R
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	≤12	12 ~ 17	≥17	25	9.96 ± 0.58	R

说明: S - 高度敏感; I - 中度敏感; R - 耐药。

Notes: S - Highly sensitive; I - Medium sensitivity; R - Resistant.

3 讨论

3.1 关于中药的抗菌作用

数千年来, 中药作为人类与动物疾病治疗的主要手段, 在病证防治中积累了丰富的经验和有效的药方, 有力地保障了中国畜牧业的健康发展。研究证明, 不少中药具有显著而广谱的抗菌活性^[7]。中药颗粒是采取提取、浓缩、干燥、制粒、包装等技术将中药制成颗粒状剂型, 具有良好药效, 是高效、质量可控的中药制剂^[4]。本研究中单方中药的抑菌试验结果显示, 诃子、乌梅对变形假单胞菌抑菌效果为极敏或高敏, 白茅根、苦参、金银花、五倍子等 45 种中药无抑菌效果。抑菌效果好的中药与其他学者的研究结果相似, 文献 [4 - 5, 8 - 10] 报道抑菌效果强的中药包括黄连、黄柏、黄芩、茯苓、虎杖、大黄、五倍子等。已有研究^[11]发现五味子、黄芩、黄连对鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、屎肠球菌与大肠埃希菌有较好的抑菌效果。五味子、黄连、乌梅、石榴皮对鸡源多杀性巴氏杆菌抑制效果为极敏感^[12]。五倍子、五味子、乌梅、黄芩对嗜水气单胞菌、耐药鲍曼不动杆菌有较强抑菌作用^[13 - 15]。黄芩、连翘、黄连对鲍曼不动杆菌有不同程度的体外抑菌作用^[16]。黄连、黄芩、连翘、丹参对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌均具较强灭菌作用^[17]。以上研究结果中抑菌效果为高敏与中敏的中药种类与本研究的结果相似。

开发中药复方制剂是当前中药研究的主流之一。由于中药复方由多种中药组成, 化学成分更加复杂多样, 不同成分间产生复杂的化学变化^[13], 可起协同增效作用, 满足治疗复杂病情的需求。已有研究证明, 复方药的抑菌作用强于其组分中的任何单味药^[18]。本研究结果表明, 在 240 mg/mL 的药物质量浓度下, 诃子 + 白芍等 4 种复方二联中药对变形假单胞菌的抑菌效果为极敏感, 诃子 + 乌梅等 11 种复方二联中药对变形假单胞菌的抑菌效果为高敏, 蒲公英 + 木香等 22 个复方二联中药无药效, 黄连 + 连翘 + 黄芪等 6 个复方三联中药对变形假单胞菌的抑菌效果为极敏感, 另有诃子 + 白芍 + 蒲公英等 23 个复方三联草药无抑菌效果。参照实验菌种标准中金黄色葡萄球菌对变形假单胞菌的抑菌直径数据, 说明本实验结果可信度强。相对于复方二联中药的药效, 相同抑菌作用的复方三联中药的复方总数更多, 不少学者的研究结果与本研究结果相似。有研究^[18]发现黄连、五倍子、大黄、诃子对嗜水气单胞菌有较强体外抑菌作用, 五倍子分别与黄连、诃子、大黄组成的复方中药的抑菌作用都显

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

著高于组成复方的各单方中药,并且抑菌及杀菌活性都强过大黄蓝散、黄连解毒散和青莲散。说明有的药物之间有协同增效作用,即抑菌效果不好的单方药组合成复方药后其抑菌效果可能得到增强。

3.2 抗生素药物的抑菌作用

防治鱼类变形假单胞菌病,应选用既符合《中华人民共和国农业部公告第2638号》要求又药效较强的抗生素,以有效治疗疾病,减少养殖经济损失。本研究结果表明变形假单胞菌对恩诺沙星、盐酸多西环素、硫酸新霉素及硫酸庆大霉素4种药物高度敏感。不少学者的研究与本研究结果相似,例如:腐败希瓦氏菌对恩诺沙星较敏感^[19];长吻鲩(*Leiocassis longirostris*)鲷爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)对恩诺沙星、盐酸多西环素敏感^[20];硫酸新霉素对嗜水气单胞菌抑制和杀灭能力较强^[21];硫酸庆大霉素对恶臭假单胞菌、布氏杆菌的体外抑菌效果好^[22-24]。

本研究结果表明嗜水气单胞菌对氟苯尼考中度敏感。氟苯尼考是广谱抗生素,广泛应用于养殖生产,易使病原菌短时间内产生较高的耐药性,并且耐药性消失较慢^[20]。邓小红等^[25]发现禾花鲤(*Procypris merus*)致病性嗜水气单胞菌对氟苯尼考不敏感,这与本结果相似。而王虹等^[26]认为肠杆菌属细菌对氟苯尼考较为敏感,这与本结果不同。

抗生素在水产养殖中用于细菌性疾病防治,具有经济、高效的优点,但在鱼病防治中,抗生素的广泛使用导致了细菌的耐药性。在养殖场病鱼中检测出一些致病菌具有多种抗生素的耐药基因^[27],为鱼类病害防治带来困难。因此,要提倡科学合理使用抗生素,严禁滥用抗生素,减少病原菌耐药性的产生。在养殖过程中要有针对性地选用抑菌作用强的抗生素,也应交替使用不同抗生素减少细菌抗药性。

4 结论

本研究针对鱼类主要致病菌——变形假单胞菌,进行单方中药与复方中药及抗生素的体外抑菌实验,并对其致病性和药物敏感性进行了初步探究,其结果可为石斑鱼变形假单胞菌细菌性疾病的防治用药提供帮助。这些复方中药及中西药物联用对鱼病的防治效果,将在今后的试验中进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张丹枫,安树伟,周素明,等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病的组织病理和超微病理分析[J]. 渔业科学进展,2017,38(4):11-16.
- [2] 周琳,覃映雪,黄力行,等. 温度对大黄鱼源变形假单胞菌胞外产物酶活力的影响[J]. 集美大学学报(自然科学版),2015,20(5):333-338.
- [3] 霍建强,赵玲敏,覃映雪,等. 变形假单胞菌灭活疫苗研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2017,22(4):12-19.
- [4] 陈希文,赖守勋,尹苗,等. 22种中药多糖对猪源金黄色葡萄球菌的体外抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):264-267.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 潘杰,苗霞,刘启波,等. 12种中药配方颗粒体外逆转临床常见细菌耐药性分析[J]. 检验医学,2016,31(6):503-508.
- [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] 曹俊辉,谢丽玲,杨素霞,等. 中草药提取物体外抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(23):9982-9983.
- [10] 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

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- 报, 2012, 36(1): 85-92.
- [11] 张景皓, 肖明霞, 季萍. 黄芩、黄连、五味子对 5 种多重耐药菌抑菌作用的实验研究 [J]. 新疆医学, 2012, 42(2): 4-7.
- [12] 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.
- [13] 彭金菊, 马驿, 梁淑莹, 等. 30 种中药及其复方对温和气单胞菌的抗菌作用 [J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(6): 42-45.
- [14] 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.
- [15] 靳恒, 李忠琴, 罗鸣钟, 等. 5 种中草药和 9 种抗生素对养殖鳊鱼主要致病菌的抑制作用 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(32): 15737-15740.
- [16] 谭俊青, 李蔼文, 王康椿, 等. 16 种中药颗粒剂对泛耐药鲍曼不动杆菌体外抑菌活性研究 [J]. 按摩与康复医学, 2015, 6(18): 119-121.
- [17] 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.
- [18] 苏振霞, 肖辉, 陈列欢, 等. 中药单味药及复方对嗜水气单胞菌的体外抑菌作用 [J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(11): 52-54.
- [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] 卓玉琛, 樊海平, 廖碧钗, 等. 嗜水气单胞菌控菌药物配方的筛选 [J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(6): 35-39.
- [22] 杨圆圆, 杨移斌, 曹海鹏, 等. 杂交鲟源恶臭假单胞菌的分离鉴定及药敏特性研究 [J]. 浙江农业学报, 2017, 29(12): 1978-1985.
- [23] 任燕, 陈献稿, 刘鹏威, 等. 大黄鱼假单胞菌病原的分离鉴定及药物敏感试验 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(18): 151-154.
- [24] 王晶妍, 张煜, 王建英. 抗菌药物对布鲁氏菌体外最低抑菌浓度研究 [J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 2013, 41(2): 136-138.
- [25] 邓小红, 梁静真, 黎姍梅, 等. 禾花鲤致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定、耐药性及毒力基因检测 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(4): 952-956.
- [26] 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.
- [27] 张冬星, 康元环, 田佳鑫, 等. 鲫鱼源致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国兽医科学, 2017(3): 366-374.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)