

丁月云,余大华,孟 云,等. 中草药复方对猪常见致病菌的体外抑菌试验[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):236-238.

中草药复方对猪常见致病菌的体外抑菌试验

丁月云¹,余大华²,孟 云¹,朱卫华¹,薛玮玮¹,张晓东¹,殷宗俊¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院/安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室,安徽合肥 230036;

2. 安徽安泰农业集团,安徽广德 242200)

摘要:将黄芪、黄芩、麦芽、甘草、党参、茯苓、白术 7 种单味中药按 2:1:1:1:2:2:2 比例混合后,经水煎煮制成浓度为 1 g/mL 的溶液,分别采用平板打孔法和平皿二倍稀释法对猪致病性大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌进行体外抑菌试验,考察抑菌效果。结果表明:该复方中草药水煎剂对巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌抑菌效果为低敏,对大肠杆菌无抑菌作用;对猪致病性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为 0.10、0.05、0.10 g/mL,对大肠杆菌最低抑菌浓度(MIC) > 0.10 g/mL。由此可知,该复方中草药水煎剂对巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌有不同程度的抑菌作用,且对金黄色葡萄球菌的抑菌效果优于对巴氏杆菌和沙门氏菌的,而对大肠杆菌的抑菌作用甚微。

关键词:中草药;体外抑菌试验;大肠杆菌;巴氏杆菌;金黄色葡萄球菌;沙门氏菌

中图分类号: S858.282.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0236-03

大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌是引发猪场常见病和多发病的主要根源之一^[1-2]。近年来由于兽医临床大剂量使用抗生素而导致耐药菌株不断出现,使得对猪病的治疗效果变差;并且抗生素严重超标,不仅大大增加了防病的困难及生产成本,更严重威胁养猪业的健康发展及公共卫生和动物源性食品的安全^[3]。

中草药是我国特有的中医药理论与实践的产物,药源广泛,价格低廉,具有广阔的发展潜力。相比而言,西药侧重于药物与微生物间的作用,而中药则主要通过调整机体功能状态来实现抗菌作用。我国传统中草药以其作用独特、安全、环保、价廉、病菌不易产生耐药性等优势,发挥着抗生素无法取代的作用,受到越来越多研究者的重视^[4-5]。按照中药配伍理论,中药复方是中药的精髓^[6],任何一味药物,其作用不是单一的,根据临床的不同需要进行适当配伍,可充分发挥一药

多能的效果^[7]。本研究选用由 7 种单味中草药所组配的复方中草药水煎剂分别对猪致病性大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌进行体外抑菌试验,以期为该复方制剂的临床应用提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材 黄芪、黄芩、麦芽、甘草、党参、茯苓、白术 7 种单味中草药,购买于安徽省合肥市为民大药房。

1.1.2 菌株 猪致病性大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌,均由安徽农业大学动物科技学院动物医学系微生物实验室保存,试验前在斜面培养基上接种复活。

1.1.3 培养基 水解酪蛋白琼脂培养基(杭州微生物试剂有限公司),胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基 TSB-YE(绍兴天恒生物科技有限公司)。

1.1.4 仪器及其他设备 10 mL 玻璃试管,250 mL 玻璃三角烧瓶,60 mm 和 90 mm 培养皿,玻璃三角涂玻棒,50 μ L 和 200 μ L 移液枪,4 mm 孔径打孔器,100 mL 盐水瓶,50 mL 容量瓶,量筒,接种环,镊子,乙醇灯,冰箱,烧杯,医用纱布,电子天平,电热真空干燥箱,高压蒸汽灭菌锅,恒温培养箱,无菌操作台,可调式电炉等。

1.2 方法

1.2.1 复方药液的制备 将黄芪、黄芩、麦芽、甘草、党参、茯

收稿日期:2013-07-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31171200);国家星火计划重点项目(编号:2010GA710001);国家农业科技成果转化资金(编号:2011GB2C300017)。

作者简介:丁月云(1981—),女,安徽蒙城人,博士研究生,讲师,主要从事猪遗传育种研究。Tel:(0551)65787303;E-mail:dingyueyun@ahau.edu.cn。

通信作者:殷宗俊,博士,教授,主要从事猪遗传育种研究。Tel:(0551)65787303;E-mail:yinzongjun@ahau.edu.cn。

细胞吞噬率和免疫器官指数,为家禽传染病提供了一个新型的防治药物。

参考文献:

- [1] 谷新利,李宏全,王俊东,等. 从中药方剂中提取的复合多糖对雏鸡免疫功能的影响[J]. 中国农业科学,2005,38(4):813-820.
- [2] 殷超,陈亮,王勇,等. 复方中药制剂对仔猪免疫机能及消化酶活性的影响[J]. 畜牧与兽医,2010,42(11):56-59.

- [3] 陈如明,谢明星,高学运,等. 抗 IBD 中药制剂治疗鸡传染性法氏囊病的研究[J]. 中兽医医药杂志,2000,3(3):10-13.
- [4] 戴远威,江青艳,傅伟龙,等. 补益中药提取物对雏鸡免疫功能的影响[J]. 中兽医学杂志,1997(2):2-5.
- [5] 马飞. 青蒿复方中药制剂对鲁旺喜鸡生长和免疫性能的影响[J]. 安徽农业科学,2011,39(32):19891-19892,19895.
- [6] 张香斋,贾青辉,李蕴玉,等. 中药制剂对热应激下雏鸡 T 淋巴细胞转化率和免疫器官指数的影响[J]. 河北科技师范学院学报,2009,23(3):29-32.

苓、白术 7 种单味中草药按 2:1:1:1:2:2:2 称取,共称取复方中草药制剂 50 g,加 500 mL 去离子水,室温下浸泡 30 min 后煎煮,煮沸后文火煎煮 30 min,用 4 层纱布过滤;药渣加水 400 mL,煮沸后煎 30 min,过滤药液;合并 2 次所得药液,浓缩至 50 mL,使其终浓度为 1 g/mL。由于一般中药 pH 值偏低(在 2~5 之间)^[8],煎好后用氢氧化钠溶液调整至 pH 值 7.4。浓缩后的水煎剂装入 100 mL 生理盐水瓶,高压灭菌 15 min,4 ℃ 冰箱保存待用。

1.2.2 打孔法

1.2.2.1 菌液制备 将猪致病性大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌分别接种于水解酪蛋白琼脂平板,37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h,挑选单个菌落接种于肉汤培养基,37 ℃ 恒温培养箱中培养 16~18 h 后,菌种浓度相当于 1×10^8 CFU/mL;用肉汤培养基作稀释液稀释 1 000 倍,使稀释后的菌液浓度约为 1×10^5 CFU/mL,4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2.2 培养基的制备 称取胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基,溶于蒸馏水,分装于试管中,高压灭菌后置于 4 ℃ 冰箱备用。称取水解酪蛋白琼脂培养基,溶于蒸馏水,高压灭菌后分别倾注于 12 个无菌 90 mm 平皿中,待凝固后 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2.3 涂菌 吸取 100 μ L 1×10^5 CFU/mL 的各菌液于 90 mm 水解酪蛋白琼脂平板培养基上,涂布均匀,待菌液干燥后备用。

1.2.2.4 打孔 选取孔径 4 mm 的打孔器(已灭菌),在涂菌液平板上打孔,每板打 3 个孔,每孔加复方中草药水煎剂 50 μ L,每种菌做 3 个重复板。37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h 后,用游标卡尺测量抑菌圈直径,判断药液对巴氏杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果。抑菌圈直径 $d > 20$ mm 为极敏, $15 < d \leq 20$ mm 为高敏, $10 < d \leq 15$ mm 为中敏, $d < 10$ mm 为低敏,无抑菌圈为不敏感^[9]。

1.2.3 平皿二倍稀释法

1.2.3.1 菌液制备 菌液制备方法同“1.2.2.1”节,稀释后的菌液浓度为 1×10^{-5} CFU/mL。

1.2.3.2 培养基的制备 胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基制备方法同“1.2.2.2”节。水解酪蛋白琼脂培养基制备方法同“1.2.2.2”节,各取 45 mL 分别装于 10 个 150 mL 三角烧瓶中(依次编号为 1~10),加塞后高压灭菌。

1.2.3.3 药液的稀释 取 10 支试管编号排列在试管架上,先于各试管(除 1 号试管)中加入 5 mL 蒸馏水,然后在 1 号、2 号试管中加入 5 mL 药液,将 2 号试管混匀后从中取出 5 mL 加入 3 号试管中,依此类推,直到 10 号试管取出 5 mL 弃去,使各管药液浓度依次为 1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512 g/mL。

1.2.3.4 含药液培养基制备 将稀释好的药液(1~10 号试管),分别加入刚高压好且编号对应的装有水解酪蛋白琼脂培养基的三角烧瓶内,混合均匀,使培养基内药液浓度分别为 1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640、1/1 280、1/2 560、1/5 120 g/mL,分别倾注于无菌的 60 mm 平皿中(每个浓度做 12 个重复平皿,依次做好标记),凝固后 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 涂菌 吸取 100 μ L 1×10^5 CFU/mL 的各菌液均匀涂

布于 60 mm 水解酪蛋白琼脂培养基平皿中,每个菌种每个药液浓度做 3 个平行,37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h 后,观察细菌的生长情况并统计菌落个数,以无细菌生长的最小药液浓度为该药物对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与分析

2.1 复方中草药水煎剂对猪病原菌的体外抑菌作用

由表 1 可以看出,由黄芪、黄芩、麦芽、甘草、党参、茯苓、白术所组成的中草药复方水煎剂对猪致病性大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果不同。该复方中草药水煎剂对巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌具有一定的抑菌作用,抑菌效果为低敏;而对大肠杆菌无抑菌作用。

表 1 复方中草药水煎剂体外抑菌效果

| 菌种 | 平均抑菌圈直径(mm) | 敏感性 |
|---------|-------------|-----|
| 沙门氏菌 | 1.42 | 低敏 |
| 大肠杆菌 | 0.00 | 不敏感 |
| 金黄色葡萄球菌 | 3.58 | 低敏 |
| 巴氏杆菌 | 2.13 | 低敏 |

2.2 复方中草药水煎剂对猪病原菌的最小抑菌浓度

由表 2 可知,该复方中草药水煎剂对大肠杆菌的 MIC > 0.10 g/mL,对沙门氏菌 MIC 为 0.10 g/mL(稀释 10 倍),对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.05 g/mL(稀释 20 倍),对巴氏杆菌的 MIC 为 0.10 g/mL(稀释 10 倍),说明该复方中草药水煎剂对大肠杆菌的抑菌效果最差,对沙门氏菌、巴氏杆菌 2 种菌的抑菌效果相近,对金黄色葡萄球菌的体外抑菌效果最好,优于沙门氏菌和巴氏杆菌。

表 2 复方中草药水煎剂对各菌株的最低抑菌浓度

| 菌种 | 最低抑菌浓度(g/mL) | 药物稀释倍数 |
|---------|--------------|--------|
| 沙门氏菌 | 0.10 | 10 |
| 大肠杆菌 | > 0.10 | |
| 金黄色葡萄球菌 | 0.05 | 20 |
| 巴氏杆菌 | 0.10 | 10 |

2.3 复方中草药水煎剂对猪病原菌体外抑菌的变化趋势

2.3.1 沙门氏菌 由图 1 可以看出,该复方中草药水煎剂对沙门氏菌的体外抑菌作用随着稀释倍数的升高有逐渐减弱的趋势。在药物稀释 10 倍时,对沙门氏菌增殖具有完全抑制作用;在药物稀释 40 倍开始,细菌数量没有明显增多,但菌落变大,说明从此稀释倍数开始,该复方中草药水煎剂对沙门氏菌增殖已无抑制作用。

2.3.2 大肠杆菌 从图 1 可以看出,大肠杆菌菌落数随药物稀释倍数增加而逐渐增大,且随着稀释度增加,菌落变大。由此可见,该复方中草药水煎剂对大肠杆菌增殖有抑制作用,但抑制作用不明显。

2.3.3 金黄色葡萄球菌 从图 1 可以看出,该复方中草药水煎剂对金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用随着稀释倍数的增大有逐渐降低的趋势。在药物稀释 10、20 倍时,对金黄色葡萄球菌增殖具有完全抑制作用;在药物稀释 40、80 倍时,细菌数量明显少于后 6 个稀释度,说明该复方中草药水煎剂在药物稀释 40、80 倍时对细菌增殖也有一定抑制作用。从稀释 160 倍以后,细菌数量没有明显增多,但菌落变大,说明后续稀释

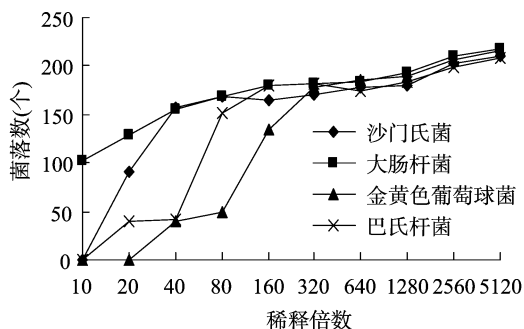


图1 复方中草药水煎剂的体外抑菌效果

处理对金黄色葡萄球菌增殖已无抑制作用。

2.3.4 巴氏杆菌 从图1可以看出,该复方中草药水煎剂对巴氏杆菌的体外抑菌作用随着稀释倍数的升高有逐渐减弱的趋势。在药物稀释10倍时,对巴氏杆菌具有完全抑制作用;在药物稀释20、40倍时,细菌数量明显少于后7个稀释度,说明该复方中草药水煎剂在药物稀释20、40倍时对细菌增殖起到一定抑制作用;在药物稀释80倍时,细菌数量没有明显增多,但菌落变大,说明后续稀释处理对巴氏杆菌增殖已无抑制作用。

3 讨论与结论

试验结果表明,大肠杆菌对该复方中草药水煎剂存在耐药性,它对菌株的抑菌圈为0,且MIC > 0.10 g/mL。该复方中草药水煎剂对沙门氏菌、巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌效果优于对大肠杆菌。这可能是由于药物本身的特性决定的,但也不排除试验方法对结果的影响。首先,与抗生素相比,中药抗菌活性较低,需要用较大的药量才能达到相同效果^[10]。中草药的提取方法决定了药液的成分和含量,提取方式的选择直接影响药物有效成分的含量,从而影响药物的作用效果^[11]。本试验采用的提取液浓度为1 g/mL,可能所选药物中个别药物添加量不够,而未能表现出良好的抑菌效果。其次,中草药提取液成分复杂,普遍为悬浊液,其中有些成分不溶于水,水煮液不能完全提取出有效成分,同时大量化学成分具有挥发性或对热敏感,在高压过程中可能挥发或失效^[12],从而影响抑菌效果。

就中医来说,中药讲求的是药物的组方配伍。中药单味药的功用各有所长,也各有所偏,通过合理的配伍可以增强其原有的功用^[13-14]。中草药的抑菌机理不同于抗生素,抗生素的作用机理早已阐明,主要是干扰病原微生物的代谢过程,影响其结构与功能,如阻碍细胞壁的形成,影响胞浆膜的通透性及核酸、蛋白质的合成等环节,从而抑制或杀灭细菌^[15]。但是中草药的抑菌机理目前尚未完全明了,有时体内外抗菌效果并不一致,如早在20世纪70年代就有人报道黄酮类化合物在体外有抑菌作用,但用于兽医临床效果不佳^[16],而体外测试未表现有抗菌作用的新穿心莲内脂,在兽医临床上用于治疗菌痢效果显著^[17]。上述事实说明,体外抑菌试验对中草药的抗菌作用只能是一种参考性的方法,其实际临床应用效

果还必须通过动物体内试验加以比较、验证,从而进一步阐明其抑菌机理。

中药提取物与抗生素类药物相比抑菌效果弱得多,但是中药具有抗生素所不具备的全面调理作用,且不易导致细菌的耐药性,因此选择中草药与抗生素联用既可以提高抑菌效果,又能减少耐药性的产生,已经成为很多学者研究的方向。

猪致病性大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的体外抑菌试验表明:该复方中草药水煎剂对4种病原菌在体外均有不同程度的抑菌作用;对金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用优于对沙门氏菌、巴氏杆菌和大肠杆菌,且对沙门氏菌与巴氏杆菌的体外抑菌效果相近,而对大肠杆菌的体外抑菌作用甚微。

参考文献:

- [1] 郭苏晓,肖正中,李淑仪,等. 中草药制剂对猪链球菌和大肠杆菌的体外抑菌效果[J]. 江苏农业科学,2008(5):183-184.
- [2] 陈薇,曾艳,贺月林,等. 20种中草药体外抑菌活性研究[J]. 中兽医医药杂志,2010,29(3):34-37.
- [3] 丁月云,李茜,王恬. 21种中药对奶牛乳房炎3种病原菌的体外抑菌试验[J]. 畜牧与兽医,2004,36(12):5-7.
- [4] 陈希文,王雄清,代敏,等. 24种中药对猪沙门氏菌的体外抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2008(5):180-182,205.
- [5] 傅文栋. 中草药及其有效成分体外抗菌抗病毒研究进展[J]. 中兽医医药杂志,2006,25(5):66-67.
- [6] 李琦. 中药配伍略谈[J]. 大同医学专科学校学报,1999,19(4):35-36.
- [7] 何志生,焦镭. 兽医临床常用中草药配伍之我见[J]. 中兽医杂志,2005(6):38-39.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:36-38.
- [9] 袁婷,钟学稳. 常见中草药的体外抑菌试验[J]. 畜牧兽医学科技信息,2009(9):23-25.
- [10] 金升藻,金巍,徐文英. 苦参等中草药的体外抑菌作用试验[J]. 上海畜牧兽医通讯,2009(5):41-42.
- [11] 赵恒章,李国旺,徐之勇,等. 60种中草药对猪源致病性大肠杆菌体外抑菌试验[J]. 河南农业科学,2008(10):129-131.
- [12] 曾分有,周海燕,孙天玮,等. 富硒中草药复方对猪大肠杆菌和沙门氏菌的体外抑菌试验[J]. 湖北民族学院学报:自然科学版,2007,25(2):199-202.
- [13] 刘荣欣,鲁改儒,郭吉勇. 中药及其组方对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 安徽农业科学,2011,39(4):2265-2267.
- [14] 蒋芬芳,胡仕凤,董伟,等. 复方中草药添加剂对保育仔猪生长性状影响及对大肠杆菌体外抑菌试验的研究[J]. 湖南畜牧兽医,2009(5):8-9.
- [15] 周立勤,陈林娜,李波,等. 中药制剂对多重耐药细菌的体外抑菌试验[J]. 微循环学杂志,2005,15(4):87-88.
- [16] 何明,张永跟. 中药抑菌作用研究现状[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版,2007,14(6):44-46.
- [17] 郑全喜,苏显中,王河清,等. 中草药体外抑菌作用的研究进展[J]. 中国医药生物技术,2009,4(4):295-298.