

韦 嫔,谭艾娟,吕世明,等. 中药消除致病性大肠杆菌耐药性的研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):127-129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.035

中药消除致病性大肠杆菌耐药性的研究

韦 嫔¹,谭艾娟¹,吕世明²,王学君¹

(1. 贵州大学生命科学学院,贵州贵阳 550025; 2. 贵州大学动物科学学院,贵州贵阳 550025)

摘要:为了解黄连、金银花、艾叶、鱼腥草和五倍子5种中药对猪源致病性大肠杆菌的抑菌效果以及对庆大霉素耐药性的消除情况,采用试管二倍稀释法测定5种中药的最小抑菌浓度,通过影印培养法筛选出耐药性消除菌落并计算其消除率。结果表明,除鱼腥草外,黄连、金银花、艾叶、五倍子表现出明显的抑菌效果,亚抑菌浓度的黄连、金银花、艾叶、五倍子作用24 h后对致病性大肠杆菌庆大霉素耐药性的消除率分别为5.34%、2.67%、10.01%、12.53%;作用48 h后其消除率分别为7.27%、3.47%、10.93%、13.68%。黄连、金银花、艾叶和五倍子能消除致病性大肠杆菌对庆大霉素的耐药性。

关键词:中药;致病性大肠杆菌;耐药性;消除

中图分类号: S852.61*2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0127-02

致病性大肠杆菌是兽医临床感染中最常见的病原菌之一,每年因其引起的疾病给养殖业造成了巨大的经济损失。为防治疾病,许多养殖场广泛且不规范地使用抗菌药物,导致细菌的耐药问题越来越严重,最后不得不通过加大用药剂量、增加药物种类来治疗大肠杆菌病,从而陷入“应用抗菌药物→耐药→加大剂量和种类→高度耐药和多重耐药→治疗无效和残留增加”的恶性循环,最终危及养殖业发展和人类健康。因此,如何解决细菌耐药性的问题成为人们关注的焦点,我国中药资源丰富,已有研究证实许多中药具有抗菌作用,且可以降低或消除细菌耐药性^[1-2]。因此,本试验研究黄连、金银花等5种常见中药的抑菌效果以及对致病性大肠杆菌耐药性的消除,旨在筛选出对耐药致病性大肠杆菌具有强抑菌作用的中药,为中草药在临床上治疗由耐药性致病菌引起的传染性疾病和进一步进行中药逆转细菌耐药性研究提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验药物及试剂

黄连、金银花、鱼腥草、艾叶、五倍子,购于西安海佳生物科技有限公司。卡那霉素(KAN)、庆大霉素(GEN)、氧氟沙星(OFL)、环丙沙星(CIP)、头孢唑林(CEF)、四环素(TET)、地美环素(DMCT)、磺胺嘧啶(SD),购于大连美仑生物技术有限公司。MH琼脂、伊红美兰琼脂和LB培养基,均购于上海博微生物科技有限公司;氯化钠(NaCl),分析纯,购于南汇

彭德公社营房化工厂;十二烷基硫酸钠(SDS),分析纯,购于广东顺德化学生物研究所。

1.2 试验菌株

采样于贵州省规模养猪场共5株,且经鉴定的致病性大肠杆菌EC1、EC2、EC3、EC4、EC5,由贵州大学药理实验室提供。它们对卡那霉素、庆大霉素、氧氟沙星、环丙沙星、头孢唑林、四环素、地美环素、磺胺嘧啶8种抗菌药物的MIC值见表1。大肠杆菌质控菌株ATCC25922,购于中国兽药监察所。

1.3 中药药液的制备

将黄连、金银花、鱼腥草、艾叶、五倍子5种中药按刘玉庆等的方法^[3]煎煮提取后浓缩药液,使各药液中生药含量均为1 g/mL,110℃灭菌20 min,于4℃冰箱保存备用。

1.4 中药提取液对致病性大肠杆菌MIC值的测定

采用改良的肉汤二倍稀释法^[4-5]测定各中药药液对受试菌的最小抑菌浓度(MIC)。取11个灭菌离心管并编号,每管先加入无菌LB肉汤培养基2.0 mL,然后于第1个离心管加中药提取液2.0 mL,混匀后取出2.0 mL放入第2个离心管中,依次类推作倍比稀释,直至第9个离心管取出2.0 mL弃去,第10个离心管不加中药作为无药物空白对照,第11管不加药物和菌液做空白对照。取100 μL受试菌稀释液(菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL)分别加至1~10号离心管内,置于37℃恒温培养箱中培养24 h,然后用无菌棉拭子分别蘸取各管内少量肉汤,涂布在LB固体培养基平板上,37℃再培养18~24 h。以平板上无细菌生长的最低药物浓度为该种中药对该菌株的最小抑菌浓度(MIC)。

1.5 耐药性的消除试验

分别制备含中药的浓度为1/2 MIC的LB肉汤,再分别加入稀释好的菌液,37℃恒温培养24、48 h,同设不加药物的空白组和SDS对照组,然后再转种分离于LB固体培养基平板上,37℃恒温培养待长出单个菌落后,随机挑取300个菌落,按照影印培养法^[6-7]用无菌牙签分别对应点种含庆大霉素的MH琼脂平板及不含药物的MH琼脂平板上,37℃培养18~24 h。

收稿日期:2016-02-25

基金项目:贵州省科技厅社会发展攻关计划项目[编号:黔科合SY字(2012)3060];贵阳市农委科学技术计划项目[编号:筑科合(2010)12-1]。

作者简介:韦 嫔(1990—),女,广西南宁人,硕士研究生,研究方向为细胞功能成分研究与利用。E-mail:425702628@qq.com。

通信作者:谭艾娟,教授,硕士生导师,从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:772771688@qq.com。

1.6 耐药性消除子的筛选与鉴定

挑取在含庆大霉素平板上不生长且在不含药物的平板上生长的菌落,在 LB 固体培养基上传代后,再接种于含庆大霉素平板上进行检测证实,即为消除子。根据耐药性消除菌落数与检测菌落总数之比,计算大肠杆菌耐药性消除率^[8]。

2 结果与分析

2.1 耐药性的测定结果

在质控菌株 ATCC25922 对临床常用的 8 种抗菌药物均敏感的情况下,5 株致病性大肠杆菌不仅对 GEN 耐药,还对 KAN、TET、CEF、CIP、OFL、DMCT、SD 都呈不同程度的耐药,致病性大肠杆菌的耐药情况比较严重。

表 1 8 种抗菌药物对致病性大肠杆菌的 MIC 值

抗菌药物	MIC 值(μg/mL)					
	ATCC25922	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
GEN	<1	64	128	128	64	256
KAN	<1	128	256	256	128	128
CIP	<0.25	64	64	64	32	32
OFL	<0.5	32	64	32	16	64
DM-CT	<1	32	64	64	32	64
TET	<1	128	128	256	128	256
SD	<4	1 024	≥2 048	≥2 048	≥2 048	1 024
CEF	<1	256	≥512	256	256	256

2.2 中药对大肠杆菌最小抑菌浓度 MIC 值的测定结果

由表 2 可知,5 种中药提取液中五倍子提取液对大肠杆菌的抑菌效果最好,艾叶、黄连、金银花都表现出一定的抑菌效果,而在可配制的最高浓度下,鱼腥草没有表现出抑菌作用,5 种中药对 5 株致病性大肠杆菌的抑菌效果不同。

表 2 5 种中药提取液对致病性大肠杆菌的 MIC 值

药物	MIC 值(mg/mL)				
	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5
黄连	500	125	250	500	250
金银花	500	500	500	250	500
艾叶	250	250	250	250	125
鱼腥草	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500
五倍子	7.81	15.62	7.81	15.62	7.81

2.3 耐药性消除结果

由表 3 可知,5 种中药中五倍子对菌株耐药性的平均消除率最高,作用 24 h 后,平均消除率为 12.53%,其最高消除率可达 22.33%;其他中药的消除率依次是艾叶 10.01%、黄连 5.34%、金银花 2.67%;五倍子作用 48 h 后其平均消除率为 13.68%,最高消除率可达 24.41%,其他中药的消除率依次是艾叶 10.93%、黄连 7.27%、金银花 3.47%,4 种中药对致病性大肠杆菌庆大霉素耐药性的消除率均高于 SDS 对照组;未经药物处理的空白对照耐药菌株的耐药性自发消除率为 0.00,说明细菌耐药性在短时间内自然丢失的概率极低。

3 讨论

细菌的耐药性问题越来越受关注,本试验选取的 5 株致病性大肠杆菌对临床常用的 8 种抗菌药物全部耐药,这与兽医临床大量不合理使用药物密切相关。我国中药资源丰富、

表 3 中药作用 24、48 h 后致病性大肠杆菌对庆大霉素耐药性的消除率

药物	消除时间(h)	消除率(%)					平均
		EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	
黄连	24	1.00	11.33	7.36	1.33	5.67	5.34
	48	3.33	11.67	9.67	4.33	7.33	7.27
金银花	24	1.33	2.67	2.33	1.67	5.33	2.67
	48	2.33	3.67	2.67	1.67	7.00	3.47
艾叶	24	14.05	4.33	8.67	16.33	6.67	10.01
	48	15.67	5.00	8.67	18.33	7.00	10.93
五倍子	24	22.33	11.67	9.33	3.67	15.67	12.53
	48	24.41	11.67	10.33	5.33	16.67	13.68
SDS	24	1.67	4.67	0.67	2.00	3.67	2.54
	48	2.00	5.00	0.67	2.67	4.00	2.87
空白对照	24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

品种繁多、安全可靠,许多中草药不仅有益气健脾、解毒清热等功效,还可抑制和杀灭细菌。本试验选用的黄连是清热燥湿类中药,金银花、鱼腥草属于清热解毒药,艾叶是温经止血类中药,五倍子是敛肺涩肠类中药。本试验中,除鱼腥草外,其余 4 种中药均有较好的抑菌作用。对致病性大肠杆菌中药最小抑菌浓度的测定结果表明,黄连、金银花、艾叶和五倍子抑菌效果明显,但是不同中药对同一株细菌的最小抑菌浓度不同,抑菌效果也不同,这可能与中药含有的有效成分不同有关。五倍子、艾叶和黄连对临床大肠杆菌抑菌效果较强,这与黄玲等所报道的结果^[9]一致;金银花在体外对致病性大肠杆菌有抑菌作用与陈希文等的报道^[10]一致,却与刘荣欣等的报道结果^[11]不同;鱼腥草在所配制的 500 mg/mL 浓度下无抑菌作用,这与杜银忠所报道的结果^[12]一致。目前关于中药体外抑菌作用的研究报道较多,但报道结果之间有差异,产生这种差异可能与中药的产地、采收季节、提取方法和试验用的菌株等不同有关。

耐药性消除试验结果显示,五倍子、艾叶、黄连对临床致病性大肠杆菌耐药性具有较高的消除率,金银花的消除率相对较低,但均高于 SDS 对照组。不同的中药对致病性大肠杆菌耐药性的消除率有很大的差异,五倍子作用 48 h 后的平均消除率为 13.68%,而金银花为 3.47%,这可能是因为不同的中药含有不同的有效抑菌成分、各个中药成分具有不同的药理作用的原因。同种中药对不同菌株耐药性消除率也不同,具有较大的波动范围,黄连作用 48 h 后对 EC1 耐药性的消除率为 3.33%,对 EC2 却为 11.67%,这可能是由于不同的耐药菌株其对抗菌药物的耐药机制不同而引起的差异。对比中药作用 24、48 h 致病性大肠杆菌耐药性消除率的差异可以看出,作用时间直接影响着中药消除耐药性的效果,随着作用时间的延长,其消除率均有所提高,这是由于中药作用机理比较复杂,中药所含有的各种成分比较多,作用比较缓慢。阴性对照组的大肠杆菌耐药性消除率为 0.00%,表明耐药性大肠杆菌其耐药性短时间内自然丢失的概率极低。许多中草药具有抑菌或抗菌作用,而且不易产生耐药性,毒副作用小。因此,筛选开发出抑菌效果好、耐药性消除率高的中草药,对于控制细菌耐药性的传播与中药的开发利用都具有十分重要的意义。但中药消除细菌耐药性的机制比较复杂,据目前报道主要是通过消除耐药质粒、影响外排泵、影响细胞膜和细胞壁

高泽磊,张 建. 不同冻结方式对高白鲑肌原纤维蛋白理化特性和功能特性的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):129-134.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.036

不同冻结方式对高白鲑肌原纤维蛋白理化特性和功能特性的影响

高泽磊,张 建

(石河子大学食品学院,新疆石河子 832003)

摘要:为了研究不同冻结方式对高白鲑肌原纤维蛋白理化特性和功能特性的影响,取高白鲑背部肌肉,一部分置于普通冷柜-18、-24℃冻藏5周,另一部分利用液氮快速冷冻的方法置于-18、-24℃温度下,利用FeCl₃/H₂O₂/Asc氧化系统模拟对高白鲑肌原纤维蛋白的氧化,每隔1周测定鱼肉理化指标及功能性指标的变化情况。结果表明:高白鲑在4种温度条件下冻藏1~5周后,羰基含量和表面疏水性含量上升,总巯基含量和游离氨含量下降,氮溶性指数降低,乳化性及乳化稳定性下降,起泡性降低,蛋白质发生不同程度的氧化。贮藏的温度越低,防止蛋白质氧化的效果越好。利用液氮快速冷冻的方法有助于高白鲑的贮藏保鲜,提高鱼肉品质。可见,不同的冻结方式对高白鲑肌原纤维蛋白理化特性和功能特性有显著影响,液氮快速冷冻的方法可有效提高鱼肉品质。

关键词:高白鲑;冻结方式;蛋白质氧化;肌原纤维蛋白;液氮速冻

中图分类号:TS254.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)11-0129-06

高白鲑是一种高好氧性冷水鱼类,肉味鲜美,无肌间刺,生长迅速,是新疆冷水鱼中的一大重要产业。目前低温冷冻贮藏是高白鲑主要的保存方式之一,这种方式可以使原料中酶的活性、脂肪和蛋白质的氧化速率、微生物的生长代谢等都受到一定程度抑制。研究发现,冻肉品质的变化与冻藏条件有密切关系。国内外关于冻藏对水产品品质的影响研究较多,主要集中在不同冻藏条件下水产品的生化、功能特性以及加工特性的变化规律^[1-6]。通常情况下,肉类品质随着冻藏

时间的延长而逐渐劣变。冻藏过程中,组成肉的各种化学成分之间会发生一系列复杂的物理、生物、化学变化,如蛋白质聚集变性、脂肪氧化、腐败变质等。通常在相同温度下畜肉冻藏的时间较长,禽肉和水产品的冻藏时间则相对较短,因为禽肉和水产品中易被氧化的不饱和脂肪酸含量相对较多^[7-11]。但由于高白鲑肉质鲜嫩,极易受蛋白质氧化的影响,因此普通的低温贮藏会造成鱼肉品质的下降。

液氮是将空气中的氮气液化,得到无色、无味、透明、微溶于水的液体,化学性质稳定,而且无毒、无刺激性。美国最先将液氮应用于速冻食品,目前已广泛应用于虾、银鱼、蟹及鲍鱼等水产品的速冻^[12-15]。研究表明,液氮速冻处理的水产品可以保持较高的鲜度、味道和色度,而且可以杀死部分细菌,达到较高的卫生要求^[16-18]。因此,本试验利用液氮快速冷冻的方法,通过测定肌原纤维蛋白理化特性和功能特性来考察高白鲑肌肉蛋白氧化的情况,以期高白鲑的贮藏保鲜提供依据。

收稿日期:2016-11-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460438);石河子大学重大科技攻关计划(编号:gxjs2015-zdgg06)。

作者简介:高泽磊(1992—),男,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全。E-mail:1549838248@qq.com。

通信作者:张 建,博士,副教授,研究方向为食品生物化学。E-mail:zhangjian0411@163.com。

等,具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1]王思芦,杨 柳,曾中良,等. 中药消除致病性大肠杆菌耐药性研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(10):79-81.
- [2]孟 甄,金建玲,刘玉庆,等. 细菌耐药性的诱导与消除[J]. 中国药理学通报,2003,19(9):1047-1051.
- [3]刘玉庆,李 晔,车程川,等. 大肠杆菌对中草药敏感性试验及其方法研究[J]. 中兽医医药杂志,2003,22(1):3-5.
- [4]何湘蓉,王一然,李伟奇,等. 黄芩提取物对耐药性金黄色葡萄球菌的体外抑菌和耐药抑制作用研究[J]. 中兽医医药杂志,2012,31(3):12-14.
- [5]杨建江,韩文瑜,杜 锐,等. 30种中草药对耐药性猪链球菌的抑菌试验[J]. 中兽医医药杂志,2004,23(2):14-16.

- [6]徐民俊,田小群,周世宁. 一种改进的平板影印工具及其应用[J]. 微生物学报,2008,48(5):657-660.
- [7]王晓波. 中药黄连对耐药金葡萄抑制作用的研究[J]. 现代畜牧兽医,2007(10):9-10.
- [8]肖 潇,李英伦,杨 锐. 复方蒲公英对金黄色葡萄球菌耐药质粒的体外消除试验[J]. 中国兽医科学,2010,40(3):307-311.
- [9]黄 玲,林居纯,马 驰,等. 12种中药的体外抑菌试验[J]. 动物医学进展,2010,31(6):50-52.
- [10]陈希文,王雄清,郭晓萍,等. 猪致病性大肠杆菌的分离鉴定及对24种中药的敏感性[J]. 江苏农业科学,2008(4):176-180.
- [11]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.
- [12]杜银忠. 3种中药对产酶菌R质粒消除作用的研究[J]. 青海大学学报,2009,27(1):82-85.