

牛津杯法测定五倍子对大黄鱼病原弧菌的体外抑菌活力

刘 健,王海雁,赵淑江

(温州医学院 环境与公共卫生学院,浙江 温州 325035)

摘要:实验采用乙醇蒸馏法、超声提取法两种不同提取工艺分别制备五倍子药液,并选用牛津杯法研究了两种提取药液对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)几种病原弧菌的体外抑菌效果差异。结果显示,两种五倍子药液对病原弧菌均具有明显的抑制效果,而超声所提药液的抑菌效果明显强于乙醇蒸馏法所提药液。

关键词:五倍子;牛津杯;病原弧菌;提取工艺;抑菌作用

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)11-0044-04

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是中国近海特有的主要海水养殖经济鱼类。近几年,由于野生资源枯竭,大黄鱼海水网箱养殖发展迅速。但是,随着养殖规模的增大和养殖环境的恶化,大黄鱼细菌性疾病频繁发生。其中弧菌病因为传播速度快,发病率高,流行范围广,成为对海水养殖大黄鱼危害最大的病原菌,主要包括溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*V. Harveyi*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)等。此类病原弧菌能够引起大黄鱼“烂尾病”、败血症等细菌性疾病,严重制约着大黄鱼养殖业的持续发展^[1]。目前,抗生素及化学药物仍是防治弧菌病的主要手段,但抗生素类药物的长期滥用不仅增加了病原菌的耐药性,而且药物残留于鱼体和水体中导致的食品安全问题也相当严重。

中草药由于具有“三效三小”的活性特点,符合中国鱼药无污染、低残留的发展目标,故其在渔业疾病防治方面的应用受到了人们的广泛关注^[2]。五倍子因富含鞣质(单宁酸),对革兰氏阳性及阴性菌均有抑制和杀灭作用,被应用于水产动物细菌性疾病的防治^[3,4]。本实验运用乙醇蒸馏法、超声提取法两种不同处理工艺提取中药五倍子中的有效抑菌成分,并采用牛津杯法定性测定了五倍子(*Galla chinensis*)两种提取液对鳃弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈氏弧菌这四种海水养殖大黄鱼致病弧菌的体外抑制效果。初步探索出一种有效的五倍子处理工艺及体外抑菌方法,为以后相关研究在方法上提供一定的参考,并为五倍子应用于大黄鱼弧菌病的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 药材

五倍子采购于温州市中医院药房,去虫磨粉备用。

1.1.2 培养基及试剂

2216E 液体和固体培养基,pH7.4 磷酸盐缓冲液均由本实验室配置。

1.1.3 供试菌种

本试验所用鳃弧菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、哈氏弧菌等为大黄鱼常见的致病弧菌,均分离自患病大黄鱼,由浙江省海洋水产养殖所分离并鉴定。将病原菌接种于 2216E 液体培养基中,28℃ 培养 18 h 使其活化,PBS 缓冲液调整菌液浓度为 0.5 麦氏浊度(含菌量约为 10^8 个/mL)^[5]。

1.1.4 仪器

隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器材厂),手提式高压蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司),垂直流超净工作台,旋转蒸发器 RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂),牛津杯(内径 6.0 mm±0.1 mm,高 10 mm±0.1 mm),散射光浊度仪 WGZ-2(金坛市泰纳仪器厂)。

收稿日期:2008-07-24;修回日期:2008-12-12

基金项目:温州市科技计划资助项目(Y20080092)

作者简介:刘健(1983-),男,山东烟台人,硕士,主要研究方向海洋渔业致病菌防治,E-mail:ljsky121@163.com;赵淑江,通信作者,电话:0577-86699553,E-mail:zsj62@163.com

1.2 试验方法

1.2.1 药液制备

采用超声提取^[6]和乙醇蒸馏两种方法提取五倍子的活性成分,制备药物提取液。称取两份五倍子各 20 g,分别放入 250 mL 三角烧瓶中,均加入 250 mL90% 的乙醇,一份于 20 kHz 超声处理 30 min 后过滤,将滤液减压浓缩至生药含量为 0.1 g/mL。另一份置于旋转蒸发仪中,用 90% 的乙醇回流提取 1 h,冷却后过滤。加等量的 90% 乙醇于滤渣中,第 2 次回流提取 40 min 后,合并两次的滤液,减压浓缩至生药含量为 0.1 g/mL。以上两份药液均经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 抑菌实验

牛津杯法又称管蝶法^[7]。每平板内倒入 15 mL 2216E 固体培养基,待培养基凝固后,移液枪取 100 μL 菌液均匀涂布于固体培养基上,每种指示菌设 4 个重复。根据药液的不同分为 A、B 两组,A 组加入乙醇蒸馏法提取的药液,B 组加入超声提取的药液,每组各分为 A₁、A₂、B₁、B₂两小组。每个平板中放置 3 个牛津杯,其中两个各加入同种药液 200 μL,另外一个加入相应的溶剂作阴性对照并做好标记。将 A₁、B₁ 两组培养皿直接放置于 30℃ 恒温培养箱中培养 24 h;A₂、B₂ 两组培养皿置于 4℃ 的冰箱中 24 h,使药液充分扩散,然后移置 30℃ 恒温培养箱中培养 24 h^[8]。游标卡尺测量抑菌圈,计算平均值,进行对比研究。抑菌直径≥20 mm 为极敏感“+++”;15 mm≤抑菌直径<20 mm 为高敏“++”;10 mm≤抑菌直径<15 mm 为中敏“+”;抑菌直径<10 mm 为

低敏或无效“—”。

1.2.3 最低抑菌浓度 (MIC) 与最低杀菌浓度 (MBC) 测定

采用双倍试管稀释法测定 MIC 与 MBC^[9]。将每种指示菌作为一组,编为五组,每组取 13 支编号无菌试管,均加入 5 mL 2216E 液体培养基。用移液枪向 1 号试管中加入 100 g/L 的药液 5 mL,混匀后,吸取 5 mL 到 2 号管中依次类推,最后从 11 号管中吸取 5 mL 丢弃。将 11 只管中均加入 0.5 mL 菌液,每组的第 12 管为不含药物只含等量菌液的对照管,第 13 管为不加药物不含菌液的阴性对照管,以上操作每次均更换枪头。充分混匀后置恒温培养箱中 30℃ 培养 24 h 观察结果,以无菌生长的药物最高稀释管中的药物浓度为该药液对致病弧菌的的最小抑菌浓度 (MIC),两种提取液各重复一次。从无菌生长的各试管中分别吸取 0.1 mL 均匀涂布于 2216E 平板培养基上,28℃ 恒温培养 24 h,观察结果。含药量最少且平板上无菌生长的试管中的药液浓度为该药液对致病弧菌的最低杀菌浓度 (MBC)。

2 结果

2.1 抑菌圈大小

两种方法处理后的五倍子药液具有不同的抑菌活性,均表现出极敏性,而经过扩散的药液抑菌效果强于未经扩散的药液(表 1、表 2),并且超声提取液的抑菌圈大小明显大于乙醇蒸馏法所提药液的抑菌圈(表 3)。

表 1 五倍子乙醇蒸馏法提取物对四种病原弧菌的体外抑菌圈 (mm)

Tab.1 Inhibitory circle of *Galla chinensis* extracts made by distillation of ethanol to four kinds of pathogen vibrio (mm)

菌株	未经扩散		经扩散	
	抑菌圈	相对敏感度	抑菌圈	相对敏感度
鳃弧菌	21.54±1.02	+++	23.87±0.85	+++
溶藻弧菌	21.67±0.96	+++	25.63±1.03	+++
哈氏弧菌	20.74±1.13	++	21.35±1.15	+++
副溶血弧菌	22.35±1.08	+++	25.78±1.23	+++

表 2 五倍子超声提取物对四种病原弧菌的体外抑菌圈 (mm)

Tab.2 Inhibitory circle of *Galla chinensis* extracts made by ultrasonic extraction to four kinds of pathogen vibrio (mm)

菌株	未经扩散		经扩散	
	抑菌圈	相对敏感度	抑菌圈	相对敏感度
鳃弧菌	24.63±1.14	+++	27.72±1.03	+++
溶藻弧菌	25.37±1.06	+++	27.54±0.96	+++
哈氏弧菌	21.87±0.95	+++	24.37±0.87	+++
副溶血弧菌	25.86±1.05	+++	28.76±1.08	+++

表 3 经过扩散的五倍子药液对四种病原弧菌的体外抑菌圈 (mm)

Tab.3 Inhibitory circle of *Galla chinensis* extracts after dispered to four kinds of pathogen vibrio (mm)

菌株	乙醇蒸馏法		超声处理法	
	抑菌圈	相对敏感度	抑菌圈	相对敏感度
鳃弧菌	23.87±0.85	+++	27.72±1.03	+++
溶藻弧菌	25.63±1.03	+++	27.54±0.96	+++
哈氏弧菌	21.35±1.15	+++	24.37±0.87	+++
副溶血弧菌	25.78±1.23	+++	28.76±1.08	+++

2.2 MIC、MBC 结果

由表 4 可见,乙醇蒸馏法与超声处理两种方法所得五倍子药液对鳃弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌的 MIC 均为 1.25 g/L,哈氏弧菌的 MIC 为 2.5 g/L。两种方法所得药液的最小抑菌效果没有明显的差别。乙醇蒸馏法所得药液对溶藻弧菌、哈氏弧菌、副

溶血弧菌的 MBC 均为 2.5 g/L,对鳃弧菌的 MBC 为 5 g/L。超声处理所得药液对溶藻弧菌、哈氏弧菌、副溶血弧菌的 MBC 均为 1.25 g/L,对鳃弧菌的 MBC 为 2.5 g/L。以上结果显示,超声处理在一定程度上提高了五倍子对各种致病弧菌的最小杀菌作用。

表 4 五倍子对 4 种致病弧菌的最小抑菌质量浓度和最小杀菌质量浓度 (g/L)

Tab.4 MIC and MBC of *Galla chinensis* extracts to four kinds of pathogen vibrio (g/L)

菌株	MIC		MBC	
	乙醇蒸馏法	超声处理法	乙醇蒸馏法	超声处理法
鳃弧菌	1.25	1.25	5	2.5
溶藻弧菌	1.25	1.25	2.5	1.25
哈氏弧菌	2.5	2.5	2.5	1.25
副溶血弧菌	1.25	1.25	2.5	1.25

3 讨论

五倍子两种提取方法所得取物中均含有可以抑制甚至杀灭海洋病原弧菌的活性成分,因此用五倍子防治病原弧菌引起的海水养殖黄鱼相关疾病是确实可行的。本次实验虽证实了五倍子提取液对各病原弧菌具有明显的抑制作用,但其有效成分的作用机理仍需进一步的研究。

研究结果显示,两种提取方法所得药液的最小

抑菌浓度相同,而超声提取法明显提高了五倍子药液的杀菌效果,这可能是因为超声处理能有效地增加五倍子中有效杀菌活性成分的析出量。另外此方法与乙醇回流提取法相比具有操作方便、提取时间短的优点^[10,11]。因此仍需进行相关的治疗实验,以分析不同提取法是否对黄鱼弧菌病治疗效果有差异,以便设计合理的提取工艺,使五倍子治疗黄鱼各种弧菌病的中药提取液的制备更加高效、节约,为产业化生产中能有效预防和治疗海水养殖黄鱼弧菌病

的中草药制剂奠定基础。

本实验采用的牛津杯法与以往相关研究所报道的纸片法不同,克服了由于纸片厚度不均所导致的含药量不同造成抑菌圈大小在比较时存在的局限性^[11]。另外经作者多次实验发现,每次 200 μL 的加药量最为合适,既避免了加药过多使药液溢出杯外和扩散后仍有少量药液剩余的问题,又避免了药液过少造成含药量较低,影响实验结果的分析。作者认为中药的体外抑菌定性测定方法较多,选择一种有效的定性测定方法无疑能够增加所测抑菌圈的准确性和科学性。

作者通过与以往的相关报道相比较^[12],发现实验采用的抑菌方法、加药量、药物的产地、药物生长期及各致病菌本身的耐药性均可能造成实验结果的差异。针对以上问题,研究者认为今后有必要对不同产地五倍子药液的抑菌效果差异进行分析研究,为实践中科学有效地施药提供依据。

参考文献:

- [1] 杨少丽,王印庚,董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J]. 海洋水产研究, 2005, **26**(4): 75-80.
- [2] 叶金明,杨显祥,姜增华,等. 国内渔药使用现状、问

- 题及合理化建议[J]. 中国水产, 2007, 5: 65-69.
- [3] 吕永辉,王玉堂. 渔药中的中草药[J]. 中国水产, 2006, 7: 91-94.
- [4] 童国忠,石亚素,薛超波. 舟山海水网箱养殖大黄鱼烂尾病病原菌及药敏分析[J]. 浙江海洋学院学报, 2005, **24**(6): 118-121.
- [5] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005. 109-111.
- [6] 杨祖荣,等. 超声技术在天然药物有效成分提取中的应用[J]. 云南中医学院学报, 2003, **26**(3): 29-31.
- [7] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000. 207-208.
- [8] 刘冬梅,李理,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 2006, **27**(3): 111-113.
- [9] 周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 重庆: 重庆科学技术出版社重庆分社, 1987. 46-48.
- [10] 宋沛然,陈百泉,等. 超声提取技术的现代研究进展[J]. 科技速递, 2007, **4**(6): 341-342.
- [11] 张海宾,杨桂芳. 12 种中草药对嗜水气单胞菌杀伤能力的研究[J]. 水产科学, 2006, **25**(1): 16-18.
- [12] 苏振霞,肖辉,单娟娟,薛强,等. 十六种中草药提取物对鳗弧菌体外抑菌作用的研究[J]. 淡水渔业, 2008, **38**(6): 73-75.

Determination of the antibacterial activity of *Galla chinensis* on pathogen vibrio of *Pseudosciaena crocea* by oxford plate assay system

LIU Jian, WANG Hai-yan, ZHAO Shu-jiang

(School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Received: Jul. , 24, 2008

Key words: *Galla chinensis*; oxford plate; pathogen vibrio; extraction process; antibacterial activity

Abstract: In this study, the main active ingredients of *Galla chinensis* were respectively made by ultrasonic extraction and distillation of ethanol extract. Oxford plate was used to study the differences of bacteriostatic effect between two kinds of liquors on several pathogen vibrio. The results showed that, though two kinds of *Galla chinensis* liquors could inhibit the growth of pathogen vibrio, the antibacterial effects of them had great differences.

(本文编辑:梁德海)