

中草药对海水养殖鲈鱼病原菌的抑菌效果研究*

THE INHIBITION OF CHINESE HERBAL MEDICINES FROM PATHOGENIC BACTERIA OF MARINE CAGE-CULTURED SEA-PERC

金 珊 王国良 赵青松 陆彤霞

(宁波大学水产系 315211)

长期大量使用抗生素药物,不仅毒害鱼类的肝胰脏,严重影响鱼类的自身免疫力,而且也破坏了养殖生态系中的正常菌群,导致耐药性微生物大量出现,为日后疫病的控制带来了更大困难。白云志 1989 年报道,中草药具价廉、低毒、副作用小、不易产生抗药性等特点,且药中某些成分不仅有抗菌作用,而且有免疫作用,能改善机体的免疫状态,提高自身抗菌能力。本文采用 15 种中草药对所分离的 3 株海水养殖鲈鱼病原菌进行了体外抑菌试验,为日后海水鲈鱼养殖中正确选择和使用中草药预防和治疗疾病提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株

从濒死的海水养殖鲈鱼体分离经鉴定的菌株中,选取河弧菌 I (*Vibrio fluvialis* 9687-02)、哈氏弧菌 (*V. harveyi* 96915-1)、鳃弧菌 (*V. anguillarum* 96924-1) 3 种菌作为试验菌株,它们都是养成期中海水养殖鲈鱼细菌性疾病的病原菌(菌种鉴定及病原性实验另文报告)。

1.2 实验用培养基(IP)成分

蛋白胨 10 g,酵母膏 1.5 g,FePO₄ 0.01 g,琼脂 15~20 g,陈海水 700 ml,蒸馏水 300 ml,pH 7.8~8.0,比重 0.8 kg/cm²,25 min 灭菌。

1.3 药物来源及中草药提取液

15 种中草药为市售,每份样品处理参照文献 [1]。

1.4 药物抑菌作用

将培养 24 h 的病原菌以无菌生理盐水制成菌悬液(约 10⁷ 个/ml),取 0.1 ml 于灭菌平皿中,将 IP 培养基灭菌冷却后加入不同体积药液倒入含菌平皿制成平板,25 °C 培养 24 h,观察计数细菌生长情况,能够完全抑制细菌生长的最大稀释度即为该药的最小抑菌浓度(MIC),继续培养 48 h,以无菌生长的最低

浓度为最低杀菌浓度(MBC)。

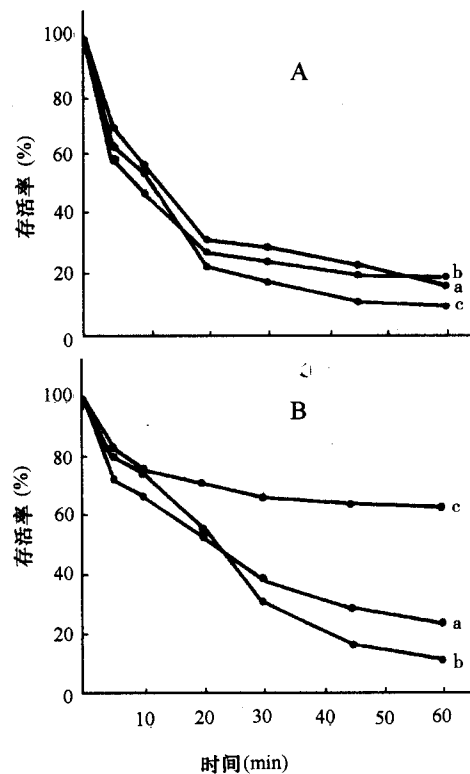


图 1 两种稀释液对病原菌的抑制作用

A. 石榴皮水浸液; B. 地榆水浸液
a. 河弧菌; b. 哈氏弧菌; c. 鳃弧菌

1.5 一定浓度药物的抑菌过程

将病原菌于 IP 斜面活化 24 h,用无菌生理盐水制成约 10⁷ 个/ml 菌悬液,将一定浓度的石榴皮、地榆提取液分别加入盛有菌悬液的三角瓶中,分别于 0,5,10,20,30,45,60 min 后取样 1 ml 加入 100 ml 无

* 浙江省自然科学基金 396269 号和“九五”宁波市渔业攻关科技项目共同资助。

收稿日期: 1998-09-14; 修回日期: 1998-11-02

菌陈海水中稀释,中止抑菌作用,用倾注平板法计数活菌数。以某一时刻样品中活菌数与0时刻活菌数之比表示该时刻的细菌的存活率。

1.6 杀菌曲线

将试验菌株 96915-1 接种于 IP 培养液中 25 ℃

培养 18 h, 稀释使其浓度约为 200 000 个/ml, 移至含有地榆、石榴皮及地榆、石榴皮混合的试管中, 药物的浓度都为 1/4 MIC。25 ℃ 培养 1, 2, 4, 8, 24 h, 然后作菌数测定, 联用管与单独管比较, 菌落数减少 100 倍以上者为协同作用。

表 1 15 种中草药的 MIC 和 MBC 的值

药名	9687-02		96915-1		96924-1	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
乌梅	1:320	1:80	1:160	1:80	1:160	1:80
黄芩	1:40	1:20	1:80	1:20	1:80	1:20
地榆	1:320	1:160	1:320	1:80	1:160	1:80
石榴皮	1:640	1:160	1:640	1:320	1:640	1:320
公丁香	1:10	1:10	1:20	1:10	1:40	1:20
大黄	1:160	1:40	1:160	1:40	1:160	1:40
白芍	1:80	1:40	1:80	1:40	1:40	1:10
大青叶	1:20	1:10	1:20	1:10	1:10	1:5
五味子	1:160	1:80	1:320	1:80	1:320	1:160
连翘	1:160	1:40	1:160	1:80	1:160	1:40
木瓜	1:10	1:10	1:20	1:10	1:10	1:5
威灵仙	1:10	1:5	1:5	1:5	1:20	1:10
地丁	1:10	1:5	1:10	1:10	1:10	1:5
黄芪	1:20	1:10	1:40	1:20	1:20	1:10
板兰根	1:320	1:80	1:160	1:80	1:80	1:40

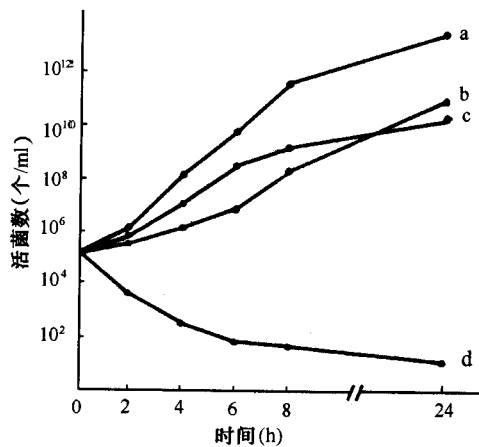


图 2 石榴皮与地榆联用对 96915-1 菌株的杀菌曲线
a. 对照; b. 石榴皮; c. 地榆; d. 石榴皮+地榆

2 实验结果

2.1 中草药的抑菌作用

15 种中草药对鲈鱼病原菌的最小抑菌浓度 MIC 1999 年第 5 期

和最小杀菌浓度 MBC 见表 1。石榴皮完全抑制所试菌株生长的最高稀释度为 1:640;地榆、大黄、五味子、连翘等对各菌株的抑制作用也非常强,而大青叶、木瓜、威灵仙、地丁、黄芪等只有在较高浓度时才有抑菌作用。各种药物对病原菌的 MBC 值多数情况下是其 MIC 值的 2 倍,少数为其 4 倍。

2.2 中草药抑菌过程

选择抑菌效果较好的石榴皮、地榆原汁分别稀释 200, 150 倍, 测定稀释液对病原菌的抑菌过程, 结果见图 1, 从图中可见药物与病原菌接触 30 min 左右即可抑制大部分病原菌生长。由于地榆的稀释浓度(1:150)接近其对 96924-1 菌株的最小抑菌浓度(1:160), 故地榆与 96924-1 菌接触 1 h 内对它的抑制作用不明显。

2.3 菌浓度变化对 MIC 的影响

在菌浓度不同的情况下, 测定几种药物对 96915-1 菌株的 MIC 值, 结果见表 2。菌浓度变化引起 MIC 值大小的变化因药物的不同而异, 有些药物对不同菌浓度所测的 MIC 值变化不大, 如连翘、大黄, 有的药物菌浓度的变化对 MIC 值有一定的影响。从表中

也可看出,随着菌浓度升高,要达到一定抑菌效果所需药浓度也应随之加大。

表 2 菌浓度对 MIC 值影响

药名	各菌浓度的 MIC			
	$\times 10^9$	$\times 10^7$	$\times 10^5$	$\times 10^3$
石榴皮	1:160	1:640	1:640	1:1280
地榆	1:80	1:320	1:320	1:640
乌梅	1:80	1:160	1:320	1:320
五味子	1:160	1:320	1:320	1:640
连翘	1:80	1:160	1:160	1:160
大黄	1:40	1:160	1:160	1:160

2.4 杀菌曲线

石榴皮与地榆联合对 96915-1 菌株的作用,在 24 h 内作菌落计数,结果见图 2,联合管与单独管比较菌落数减少了约 10 000,显示协同作用。

3 讨论

实验结果表明在所试的 15 种中草药中以石榴皮、地榆的抑菌效果最好,大黄、五味子、连翘、乌梅

等也有一定的抑菌作用,特别是石榴皮与地榆的联合有协同作用,可以增强杀菌能力。这些药物都可用于配制抗病药物饵料或用于病鱼的体表消毒,但联合用药需要实验依据。由于某些中草药在低浓度时有促细菌生长的作用,这就要求在应用中草药防治鱼类细菌性病害时,应注意选择适当的药物及合适的用药浓度。

至于病原菌对药物的耐受力,实验结果表明,药物对不同菌浓度的抑菌作用大小是呈负相关的,因此在实际生产上,要做到无病先防,有病早治,可用小剂量定期预防,在病原菌尚未达到一定数量或尚未蔓延时就抑制其生长或杀灭。对病情较轻的鱼群用药量较低,病情加重,感染范围较大时应加大用药量。本试验的结果是在离体条件下进行的研究,其结果可供参考,实际用药时还要考虑鱼体对该药物的耐受能力,正确的用药浓度是既能有效抑制病菌生长,又不致于损害鱼体。

参考文献

- 1 王雷、李光友等。海洋与湖沼,1995,26(3):338~340