

中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验

王印庚¹ 冷敏^{1,2} 陈霞³ 荣小军¹ 廖梅杰¹

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学 生命科学与技术学院, 201306)

(³青岛九洋红水产科技有限公司, 266071)

摘要 用改良二倍稀释法和抑菌圈法测定了 24 种单方中草药和 9 种复方中草药对刺参腐皮综合征 4 种重要病原菌灿烂弧菌、假交替单胞菌、哈维氏弧菌和恶臭假单胞菌的体外抑菌活性。结果显示,不同中草药对特定病原菌抑菌效果差异较大,单方中草药最低抑菌浓度(MIC)为 1.56 mg/ml,中草药水煎剂 H-5 和 H-9 对假交替单胞菌的抑菌圈最大,达 22 mm。单方中草药中穿心莲、大青叶、金银花和川芎 4 种中草药对 4 株病原菌抑菌效果最好,其水煎剂对 4 株病原菌平均抑菌浓度分别为 6.25、7.81、5.86 和 3.52 mg/ml;平均抑菌圈直径分别是 17.5、11.3、14.0 和 11.5 mm。将筛选的 4 种单方中草药组成 9 种复方,复方 MIC 和抑菌圈均显著好于单方,最低 MIC 降低到 0.20 mg/ml。其中复方 HC-G 和 HC-D 抑菌浓度最低,效果最好,平均抑菌浓度分别降低为 0.54 和 0.64 mg/ml;平均抑菌圈直径分别为 15.3 mm 和 16.3 mm。试验结果显示,复方最佳配比为穿心莲、大青叶、金银花和川芎=2:1:3:2。该复方可为生产高效专用中草药,以替代抗生素,为刺参健康养殖提供技术保障。

关键词 刺参 海水养殖 腐皮综合征 中草药 配方 抑菌浓度

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0001-07

In vitro bacteriostatic effect of Chinese herbs against causative pathogens of skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*

WANG Yin-geng¹ LENG Min^{1,2} CHEN Xia³ RONG Xiao-jun¹ LIAO Mei-jie¹

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²School of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, 201306)

(³Sunny Oceans Aquaculture Technology Co., Ltd, Qingdao 266071)

ABSTRACT The bacteriostatic effect of 24 kinds of Chinese herbs and 9 kinds of herb compounds were determined in vitro by improved microdilution procedure and the bacteriostatic circle. This work conducted as the herbs were against four kind of causative pathogens (*Vibrio splendidus*, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas putida*) of skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. The results illustrated that different herbs showed different susceptivities to given pathogens. The lowest minimal inhibitory concentration(MIC) was 1.56 mg/ml. Decoction of H-5 and H-9 had maximal bacteriostatic circles a-

山东省科技发展计划项目(2004GG2205116)、青岛科技发展计划项目(02-1-kchhh-44)和农业部农业结构调整重大技术研究专项(06-05-04B)

收稿日期:2008-03-08; 接受日期:2008-05-13

作者简介:王印庚(1963-),博士,研究员,主要从事水产疾病研究。E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)85841732

against *P. nigri faciens* with 22 mm. Four kinds of Chinese herbs (H-5, H-6, H-9 and H-14) had better bacteriostatic effect on the four pathogens, in which the average MIC of the decoctum were 6.25 mg/ml, 7.81 mg/ml, 5.86 mg/ml and 3.52 mg/ml respectively, and the average bacteriostatic circles were 17.5 mm, 11.3 mm, 14.0 mm and 11.5 mm. Nine herbal-compounds were composed by 4 herbs, the bacteriostatic effect of 9 compounds enhanced remarkably than single herbs, and the lowest MIC reduced to 0.20 mg/ml. The best compounds were HC-G and HC-D, and the average MIC and bacteriostatic circle were 0.54 mg/ml, 0.64 mg/ml, 15.3 mm and 16.3 mm respectively. According to their bacteriostatic effects, the best ratio of the compounds was determined as H-5 : H-6 : H-9 : H-14 = 2 : 1 : 3 : 2.

KEY WORDS *Apostichopus japonicus* Mariculture Skin ulcer syndrome
Herb Formula MIC

迈入 21 世纪,海珍品特别是刺参消费量迅速增加,越来越多的养殖户将投资目光转向效益较好的刺参养殖业,使之迅速成为我国北方沿海水产养殖的新兴支柱产业(Wang *et al.* 2004; 荣小军等 2005)。养殖产地主要集中在山东、辽宁和河北 3 省。2006 年仅山东省刺参养殖面积就达 2.5×10^4 hm² 万亩,产量达 50 000 t 余,直接经济效益达 70 多亿元(荣小军等 2005)。然而,随着刺参养殖的迅速扩展和管理滞后,病害问题也日趋明显,严重制约了该产业的健康可持续发展。由于抗生素易产生残留,影响产品质量安全,因此研发中草药将具有重要的现实意义和广阔的发展前景。

刺参腐皮综合征,波及面广,传染性强,死亡率极高,是近年来养殖刺参的重要病害之一(Wang *et al.* 2004; 王印庚等 2005; 荣小军等 2005; 张春云等 2006; 马欣悦等 2006)。经过病原学研究证实,导致疾病的原因具有多样性和复杂性,本试验室从患病刺参上分离并鉴定了灿烂弧菌 *Vibrio splendidus*、假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas nigri faciens*、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 和恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*。本文作者针对上述致病原进行了 24 种单方中草药和复方制剂的体外抑菌效果检测,以期进一步开发高效、低毒中草药,促进刺参的健康养殖。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病原菌

试验所用灿烂弧菌、假交替单胞菌、哈维氏弧菌和恶臭假单胞菌为本实验室从患腐皮综合征的刺参上分离,并经人工感染证实为病原菌(王印庚等 2005; 荣小军等 2005; 张春云等 2006)。将菌接种到胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)中活化,27 ℃ 培养 18 h 后挑选单菌落接种于液体 TSB 中,培养 16~20 h,再用无菌 1.5% NaCl 水溶液将菌悬液均稀释至 1×10^7 CFU/ml 备用。

1.1.2 中草药及其制备

(1)水煎剂制备方法:试验用 24 种草药原料购自青岛同仁堂药店,分别是苍术、大黄、马齿苋、甘草、穿心莲、大青叶、鱼腥草、当归、金银花、五加皮、杜仲、淫羊藿、秦皮、川芎、柴胡、茯苓、黄柏、地榆、党参、五倍子、板蓝根和黄芩,编号为 H-1、H-2、H-3……H-24。使用粉碎机将中草药粉碎,0.15 mm 孔径过筛,称取 5 g 中草药,按 1 : 70 加入约 50 ℃ 蒸馏水,即 350 ml,浸泡 2 h 后用大火加热至沸腾,小火熬制 90 min,浓缩至 50 ml 时,先用 8 层消毒纱布滤出药液,然后用双层滤纸加压过滤,即制成 0.1 g/ml 浓度的草药原液,121 ℃ 灭菌 20 min 备用。

(2)复方水煎剂提取方法同上。

水浸剂制备方法:称取 5 g 0.15 mm 孔径过筛的草药药粉,加入 60 ml 约 50 ℃ 蒸馏水,浸泡 24 h。用 8 层消毒纱布过滤出药液,然后用双层滤纸加压过滤,不足 50 ml 时用蒸馏水补足 50 ml,使其浓度为 0.1 g/ml。所

得药液于 4 °C 下保存备用, 14 d 内测完。复方不做水浸剂。

1.2 方法

1.2.1 体外抑菌测定方法

(1) 最低抑菌浓度的测定: 采用改良微量二倍稀释法测定各中草药的最低抑菌浓度 (MIC 值), 参照张传亮等 (2007) 的方法。于无菌 96 孔酶标板, 1~7 孔对测定中草药原液 (0.1 g/ml) 用液体 TSB 进行两倍递进稀释, 每孔加 10 μ l 菌悬液 (1×10^7 CFU/ml), 第 8 孔为对照, 不加菌悬液, 用于检验试验过程中是否被微生物污染。然后每孔中加 5 μ l 0.5% 红四氮唑指示剂, 用于指示细菌生长与否 (细菌的琥珀酸脱氢酶在其生长繁殖过程中利用糖类, 使之脱氢, 氢与无色的红四氮唑结合生成不可逆的红色化合物, 使培养基变红)。27 °C 湿盒中摇床培养 6~8 h, 有菌生长者其酶标板孔呈红色, 无颜色变化者的最低药液浓度即为 MIC 值。对于因中草药本身带颜色而影响判断者, 用无菌棉签蘸取酶标板孔中混合液涂布于 TSB 平板上, 直接采取培养法观察细菌生长与否。

(2) 抑菌圈测定: 取直径约 90 mm 的平底双碟, 注入经加热融化的 TSB 7~9 ml, 均匀摊布碟底, 放置超净工作台, 待其凝固后, 在每一平底双碟中等分置入内径 6.0 ± 0.1 mm, 外径 7.8 ± 0.1 mm 牛津杯, 再倒入经加热融化的 TSB 15~17 ml, 凝固后再用灭菌镊子将牛津杯取出, 便形成带孔的培养基平板。随后将菌悬液 (1×10^7 CFU/ml) 用灭菌棉签在带孔平板上均匀涂布, 然后在孔中加入 100 μ l 中草药提取液 (0.1 g/ml), 每种中草药做两个重复, 测定记录抑菌圈大小, 取其平均值。

1.2.2 复方配伍方法

利用正交试验设计复方中草药配方: 将所筛选出的体外抑菌效果较好的 4 种单方中草药作为因素 (即 H-5、H-6、H-9 和 H-14), 以药物添加量为水平, 分别是 10、20 和 30 mg/ml。通过正交表 $L_9(3^4)$ 构成 9 组复方, 分别记为 HC-A、HC-B、HC-C……HC-I (表 1)。

2 结果

2.1 单方中草药对腐皮综合征病原菌的最低抑菌浓度

24 种单方中草药对 4 株刺参腐皮综合征病原菌的最低抑菌浓度见表 2。结果表明, 各中草药对特定菌株的抑菌效果差异较大, 如中草药 H-4 和 H-5 水煎剂对灿烂弧菌的最低抑菌浓度分别是 50.00 和 3.13 mg/ml, 相差 16 倍。同一种中草药对不同菌株的 MIC 也有较大差异, 如中草药 H-10、H-13 对不同菌株的最低抑菌浓度相差 10 倍以上。另外, 不同提取方式所得药液的最低抑菌浓度也不相同。大部分草药水煎剂抑菌效果好于水浸剂, 如中草药 H-2、H-9、H-11、H-14 和 H-17; 小部分则相反, 如 H-15。

H-14 水煎剂对 4 株病原菌的平均抑菌浓度最低, 为 3.52 mg/ml。其次为 H-9 水浸剂, 为 4.69 mg/ml。总体而言, 相对其他 20 种中草药, 单方中草药 H-5、H-6、H-9 和 H-14 对 4 株海参腐皮综合征病原菌均有良好抑菌效果, 其水煎剂平均抑菌浓度为 6.25、7.81、5.86 和 3.52 mg/ml; 水浸剂平均抑菌浓度为 8.60、9.38、4.69 和 10.94 mg/ml。从 MIC 值比较, 水煎剂的抑菌效果比水浸剂略好。

2.2 单方草药抑菌圈测定

测定结果显示, 中草药水煎剂 H-5 和 H-9 对假交替单胞菌的抑菌圈最大, 达到 22 mm; 其次为 H-12 水浸剂对假交替单胞菌的抑菌圈为 21 mm。中草药水煎剂 H-5、H-6 对 4 株病原菌均有抑菌作用, 平均抑菌圈直径

表 1 正交设计的中草药复方配伍方案 (mg/ml)

Table 1 The herbal compounds designed by different herbs and their quantity $L_9(3^4)$ (mg/ml)

成分 Component	H-5	H-6	H-9	H-14
HC-A	10	10	10	10
HC-B	10	20	20	20
HC-C	10	30	30	30
HC-D	20	10	20	30
HC-E	20	20	30	10
HC-F	20	30	10	20
HC-G	30	10	30	20
HC-H	30	20	10	30
HC-I	30	30	20	10

分别是 17.5 和 11.3 mm。中草药 H-9、H-14 对灿烂弧菌、假交替单胞菌和哈维氏弧菌均有良好抑菌效果,对 4 株菌的平均抑菌圈直径分别是 14 和 11.5 mm(图 1,表 3)。单方中草药水煎剂 H-5、H-6、H-9 和 H-14 对 4 株菌的抑菌圈优于其他中草药。

表 2 24 种单方中草药对 4 株刺参腐皮综合征病原菌的最低抑菌浓度(mg/ml)

Table 2 The MIC of 24 kind of Chinese herbs on four pathogens associated with the skin ulcer syndrome(mg/ml)

单方编号 Code of herb	剂型 Form							
	水煎剂 Decoction of herbs				水浸剂 Infusion of herbs			
	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nigrifaciens</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nigrifaciens</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
H-1	50.00	25.00	50.00	>100.00	50.00	50.00	>100.00	50.00
H-2	50.00	25.00	25.00	>100.00	50.00	>100.00	50.00	>100.00
H-3	25.00	50.00	50.00	>100.00	25.00	50.00	50.00	>100.00
H-4	50.00	25.00	50.00	>100.00	50.00	50.00	25.00	>100.00
H-5	3.13	3.13	6.25	12.50	3.13	12.50	12.50	6.25
H-6	12.50	6.25	6.25	6.25	12.50	6.25	12.50	6.25
H-7	12.50	12.50	50.00	50.00	12.50	>100.00	>100.00	50.00
H-8	25.00	25.00	50.00	25.00	无	无	无	无
H-9	1.56	3.13	6.25	12.50	1.56	3.13	1.56	12.50
H-10	1.56	3.13	3.13	>100.00	3.13	12.50	1.56	>100.00
H-11	25.00	50.00	50.00	50.00	50.00	>100.00	>100.00	50.00
H-12	12.50	12.50	12.50	50.00	>100.00	>100.00	50.00	25.00
H-13	>100.00	3.13	>100.00	50.00	50.00	50.00	>100.00	25.00
H-14	1.56	3.13	3.13	6.25	12.50	6.25	12.50	12.50
H-15	25.00	50.00	25.00	50.00	25.00	25.00	25.00	50.00
H-16	50.00	12.50	50.00	50.00	50.00	12.50	50.00	>100.00
H-17	12.50	50.00	50.00	>100.00	50.00	50.00	>100.00	>100.00
H-18	50.00	50.00	>100.00	50.00	12.50	>100.00	25.00	>100.00
H-19	25.00	25.00	50.00	>100.00	50.00	>100.00	50.00	25.00
H-20	>100.00	50.00	>100.00	>100.00	>100.00	>100.00	50.00	25.00
H-21	12.50	25.00	50.00	12.50	25.00	12.50	50.00	12.50
H-22	25.00	25.00	50.00	>100.00	12.50	50.00	>100.00	>100.00
H-23	50.00	12.50	25.00	>100.00	>100.00	25.00	50.00	25.00
H-24	25.00	>100.00	50.00	50.00	50.00	25.00	50.00	25.00

注:“无”表示草药 H-8 无水浸剂

2.3 复方中草药对腐皮综合征病原菌的最低抑菌浓度

通过单方试验,筛选出对刺参腐皮综合征均有较好抑菌效果的 4 种单方中草药 H-5、H-6、H-9 和 H-14,按表 1 方式组成复方,结果见表 4。复方 HC-G、HC-D 和 HC-F 对 4 株菌效果最好, MIC 均值分别是 0.54、0.64 和 1.87 mg/ml。复方的 MIC 也显示出菌株差异性,如 HC-A、HC-B 和 HC-F 对 4 株菌的 MIC 均不同。

结合复方配伍方法和 MIC 结果分析得知,复方中单方 H-9 质量浓度为 10、20 和 30 mg/ml 时,其复方的 MIC 均值分别为 2.71、2.62 和 1.19 mg/ml,即复方中 H-9 含量越高其 MIC 均值越小,说明复方中 H-9 抑菌效果与质量成正相关,因此复方中 H-9 应取 30 mg/ml。H-6 则与 H-9 相反,即 H-6 质量浓度为 10 mg/ml 时复方药效最好,而 H-5 和 H-14 在 20 和 30 mg/ml 时差别不大,因此从经济角度考虑应取 20 mg/ml 为佳。因此,最佳的中草药复方应该是: H-5 : H-6 : H-9 : H-14 = 2 : 1 : 3 : 2(重量比)。

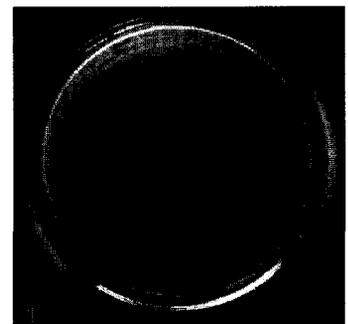


图 1 单方中草药 H-14 对假交替单胞菌有明显的抑菌圈
Fig. 1 The herb H-14 has obvious bacteriostatic effect against bacterium *P. nigrifaciens*

表 3 单方抑菌圈测定(mm)
Table 3 The bacteriostatic circle(value) of 24 kinds of Chinese herbs(mm)

单方编号 Code of herb	剂型 Form							
	水煎剂 Decoction of herbs				水浸剂 Infusion of herbs			
	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nigri faciens</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nigri faciens</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
H-1	0	0	0	0	0	0	0	0
H-2	0	0	0	0	0	0	0	0
H-3	0	0	0	0	0	0	0	0
H-4	0	0	0	0	0	0	0	0
H-5	16	22	16	16	16	16	0	15
H-6	15	18	11	13	0	13	11	0
H-7	0	16	0	0	0	0	0	0
H-8	11	0	0	0	无	无	无	无
H-9	17	22	17	0	14	0	18	20
H-10	14	0	0	0	13	0	0	0
H-11	0	0	0	0	0	0	0	0
H-12	0	15	0	0	0	21	0	0
H-13	0	0	0	0	0	0	0	0
H-14	17	18	11	0	16	13	0	0
H-15	0	0	0	0	0	0	0	0
H-16	0	0	0	16	0	0	0	14
H-17	0	0	0	0	0	13	0	0
H-18	0	0	0	0	0	0	0	0
H-19	0	0	0	0	0	0	0	0
H-20	0	11	0	0	0	0	0	13
H-21	0	0	0	11	0	0	0	0
H-22	0	13	0	0	0	17	0	0
H-23	0	14	0	0	0	0	0	0
H-24	0	0	0	0	0	0	0	0

注:因为牛津杯形成的孔大约为 10 mm,故抑菌圈直径≤10 mm 时记录为 0 值

2.4 复方中草药抑菌圈

复方草药抑菌圈直径最大为 21 mm,为 HC-D 对假交替单胞菌的抑菌圈(图 2)。同时对 4 株细菌的平均抑菌圈直径最大也为 HC-D,达 16.3 mm,说明在总体水平上 HC-D 抑菌最好(表 5)。HC-G、HC-E 和 HC-F 对 4 株菌也具有较好的抑菌效果,平均抑菌圈直径分别为 15.3、15.0 和 14.5 mm。根据平均抑菌圈直径可以判断,4 株病原菌对复方敏感性强弱分别为:假交替单胞菌 > 灿烂弧菌 > 哈维氏弧菌 > 恶臭假单胞菌。

由表 6 分析知,复方中草药 H-5、H-6、H-9 和 H-14 分别为 20、10、30 和 20 mg/ml 时,其抑菌圈平均直径分别达最大值,即为 15.25、12.67、13.50 和 13.25 mm。复方最佳配比即为 H-5 : H-6 : H-9 : H-14 = 2 : 1 : 3 : 2。



图 2 复方中草药 HC-F、HC-G、HC-H 和 HC-I 对假交替单胞菌(JJT)有更明显的抑菌圈
Fig. 2 The herbal compounds HC-F、HC-G、HC-H、HC-I have better bacteriostatic effect than single herb H-14 as they are against bacterium *P. nigri facien*

表4 复方中草药最低抑菌浓度(mg/ml)

Table 4 The MIC of herbal compounds(mg/ml)

复方 Herbal compounds	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nigri faciens</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	平均浓度 Average concentration.
HC-A	0.78	0.39	3.13	12.50	4.20
HC-B	0.78	1.56	3.13	6.25	2.93
HC-C	1.56	1.56	1.56	6.13	2.70
HC-D	0.20	0.78	0.78	0.78	0.64
HC-E	0.39	1.56	6.13	1.56	2.41
HC-F	0.20	0.39	6.13	0.78	1.87
HC-G	0.20	0.20	1.56	0.20	0.54
HC-H	0.39	0.39	6.13	1.56	2.12
HC-I	0.39	0.39	6.13	3.13	2.51

表5 复方中草药抑菌圈(mm)

Table 5 The bacteriostatic circle (value) of herbal compounds(mm)

复方 Herbal compounds	灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	假交替单胞菌 <i>P. nigri faciens</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	平均直径 Average diameter
HC-A	11	15	0	0	6.5
HC-B	12	17	11	0	10.0
HC-C	11	17	13	0	10.3
HC-D	15	21	14	15	16.3
HC-E	12	19	16	13	15.0
HC-F	12	17	18	11	14.5
HC-G	13	19	13	16	15.3
HC-H	0	17	0	0	4.3
HC-I	0	18	0	0	4.5

表6 复方配伍与抑菌效果分析

Table 6 The herbal compounds and their bacteriostatic effect

质量浓度 Mass concentration (mg/ml)	H-5		H-6		H-9		H-14	
	\overline{MIC} (mg/ml)	\overline{BC} (mm)	\overline{MIC} (mg/ml)	\overline{BC} (mm)	\overline{MIC} (mg/ml)	\overline{BC} (mm)	\overline{MIC} (mg/ml)	\overline{BC} (mm)
10	3.28	8.92	1.79	12.67	2.71	8.42	2.45	8.67
20	1.64	15.25	2.49	9.75	2.62	10.25	1.78	13.25
30	1.72	8.00	2.36	9.75	1.19	13.50	1.82	10.25

注: \overline{MIC} 表示 MIC 平均值, \overline{BC} 表示抑菌圈直径平均值

3 讨论

本试验进行了24种单方中草药和9种复方中草药对养殖刺参腐皮综合征重要病原菌的体外抑菌试验研究,通过比较单方中草药与复方面MIC和抑菌圈大小可见,复方中草药对4株病原菌的最低抑菌浓度远低于单方中草药,可见复方中没有明显相互拮抗作用的单方,却能有效提高抑菌效果(图1和图2)。司红彬等(2006)报道鱼腥草和大青叶1:1配伍对大肠杆菌的MIC为3.906 mg/ml,抗菌活性为单方药物的4倍,本试验复方能有效提高抑菌效果与之结论是一致的,也基本符合“药有个性之特长,方有合群之妙用”这一中草药配伍理论。

中草药复方配伍剂量的变化对功效的影响早已为历代医家所认识,方中药味的量发生变化时药效也往往随之发生变化。本试验在组方过程中,同为4种单方,因入药量不同组成的HC-A、HC-B、HC-C……HC-I 9种复方,无论抑菌圈抑或MIC均会产生较大差异,可见组方过程中量效差异是明显的。经过本试验对单方种类和量变组合,分析抑菌浓度和抑菌圈,筛选出复方面最佳配伍比例,即为H-5(穿心莲):H-6(大青叶):H-9(金银花):H-14(川芎)=2:1:3:2。这为下一步生产高效、专用中草药提供了依据。

试验结果显示,中草药水煎剂抑菌效果略好于水浸剂,主要原因是加热的方式能加速分子运动,有利于水分进入药材细胞和细胞间隙中去,也有利于使药材中的有效成分的浸出。由于本试验所设定的水浸剂浸泡时间远大于煎剂煎煮时间,增加浸泡时间同样有利于药材中有效成分的扩散,因此煎剂与浸剂的抑菌效果差别并不十分显著。说明在药物剂型上仍可选择使用方便的粉剂,在使用时可以通过增加中草药的浸泡时间来增加药物的效果。而草药水剂则并非首选,否则生产成本太高,储运也不方便。

由于中草药中成分复杂,含有生物碱、多聚糖、苷、鞣质、黄酮、内酯和萜类等物质(路振香等 2006,张显忠等 2006),本试验所选草药以含鞣质、甙类、萜醌类和没食子酸等物质为主,其作用机理以直接作用于细菌的结构和代谢而达到抗菌作用。中草药提取物的体外抑菌强弱与提取物成分和浓度密切相关。试验结果显示中草药MIC从50.00到0.20 mg/ml不等,与司红彬等(2006)、朱壮春等(2007)、段纲等(2005)报道的抑菌浓度范围基本一致。实验数据也表明,单方中草药之间的最低抑菌浓度差异较大,表现出对抑菌种类的狭隘性,而复方却相对表现出抑菌全面、效果均衡等特点,为此在生产实践中应选择配伍,形成合理的复方药物,以达到最佳的抗菌效果。

中草药防治水产疾病不仅是中草药对病原菌有直接抑菌或杀灭作用,更重要的是中草药能有效促进养殖鱼类等水生动物的非特异或特异性免疫作用(简纪常等 2002,柯浩等 2004,陈孝萱等 2005)。另外,随着当前消费者对抗生素药物残留、水产品质量安全的广泛关注和重视,中草药以其成本低、药效好、无残留的特点取代抗生素的大量使用,在水产养殖疾病防治当中将占有重要的位置。本试验筛选出4种对海参腐皮综合征病原菌体外抑菌效果最好的单方中草药和最佳的复方配方。今后将针对上述配方的药理、毒理、加工工艺和临床中试等开展深入的研究工作,以期生产高效、专用中草药产品,为刺参的健康养殖提供技术保障。

参 考 文 献

- 马悦欣,徐高蓉,常亚青,张恩鹏,周玮,宋林生. 2006. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究. 大连水产学院学报, 21(1):13~18
- 王印庚,荣小军,张春云,孙素凤. 2005. 养殖海参主要疾病及防治技术. 海洋科学, 29(3):1~7
- 王道坤. 2006. 常见抗菌中草药的有效成分及应用. 兽药市场指南, 6:22~23
- 司红彬,陈鹏举,赵瑞丽,匡秀华,胡功政. 2006. 用改进的方法测中草药对细菌的体外抑菌试验. 黑龙江畜牧兽, 9:75~76
- 朱壮春,史相国,张淑杰,姜广建,邢朝斌,赵亚龙,李占军,吴鹏. 2007. 中草药对牙鲆病原迟缓爱德华氏菌的体外抑制作用研究. 水产科学, 26(5):278~251
- 张春云,王印庚,荣小军. 2006. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. 水产学报, 30(1):118~123
- 张显忠,郭爱军,李艳玲,苗苗. 2006. 中草药提取物的体外抑菌活性研究. 中华医院感染学杂志, 16(5):563~566
- 张传亮,李樵年,汪兴生,祖国掌,李小飞,余为一. 2007. 水产动物常见病原菌的耐药性分析及中草药体外抑菌活性的检测. 中国微生态学杂志, 19(2):152~157
- 陈孝萱,吴志新,张厚梅. 2005. 大黄与黄连对二种淡水虾血细胞吞噬活性的影响. 水生生物学报, 269(2):201~204
- 段纲,朱春贤,代飞燕,项勋. 2005. 中草药提取物对不同分离菌株的体外抑菌试验. 中兽医杂志, 3:29~30
- 柯浩,王江勇,彭绪运,石和荣,黄郁葱,陈毕生. 2004. 复方中草药对杂色鲍血淋巴中几种酶活力的影响. 海洋水产研究, 25(5):74~79
- 荣小军,王印庚. 2005. 当前养殖刺参暴发病的病因探讨和防治对策. 水产科技情报, 32(4):169~171
- 简纪常,吴灶和. 2002. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响. 大连水产学院学报, 17(2):114~119
- 路振香,谢文科. 2005. 八味中药提取物的体外抑菌试验. 中国兽医医药杂志, 3:37~39
- Wang, Y. G., Zhang, C. Y., Rong, X. J. et al. 2004. Diseases of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in China. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper, 463:297~310