

黄连汤有效部位对鸭疫里氏杆菌的抑菌率

纪丽莎, 殷红福, 汪丽芬, 张先福

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 测定了黄连汤有效部位对鸭疫里氏杆菌 *Riemerella anatipestifer* 的抑菌率。将组成黄连汤的黄连 *Coptis chinensis*, 黄柏 *Phellodendron amurense* 和甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 3味中草药按规定比例混合, 采用水提醇沉法提取有效部位, 制成含生药为 $229.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的黄连汤水提醇沉浓缩物。首先测定鸭疫里氏杆菌生长的标准质量浓度曲线, 其次在不同药物质量浓度下分别加入振荡培养 12 h 的鸭疫里氏杆菌 20, 50, 120, 190 和 250 μL , 测定鸭疫里氏杆菌的吸光度。根据标准曲线关系式, 计算出药物作用后细菌的浓度, 进而得出各种质量浓度下药物对细菌的抑菌率, 并对抑菌率进行方差分析。结果表明, 当药物质量浓度是 $38.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌量为 20 和 50 μL 时, 对应的显著性抑菌率为 99.99% 和 99.98%; 药物质量浓度为 $46.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌量为 120, 190 和 250 μL 时, 对应的显著性抑菌率分别为 99.99%, 99.98% 和 99.98%。抑菌率都在 99.98% 以上。用紫外分光光度法研究药物抑菌率, 准确、方便、重复性好; 药物最优抑菌的临界浓度为 $29.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 1 表 3 参 14

关键词: 中药学; 黄连汤; 鸭疫里氏杆菌; 抑菌率

中图分类号: R282

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2010)05-0745-05

Inhibitory rate of a coptidis rhizoma decoction against *Riemerella anatipestifer* bacteria

Ji Li-sha, Ying Hong-fu, Wang Li-fen, Zhang Xian-fu

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To determine the inhibitory rates for effective ingredients of a coptidis rhizoma (*Coptis chinensis*) decoction against the bacteria *Riemerella anatipestifer* and to further the study of drugs acting on the outer membrane of a bacterial protein, extractions were made from a coptidis rhizoma decoction made of coptidis rhizoma, cortex phellodendri (*Phellodendron amurense*), and licorice root (*Glycyrrhiza uralensis*) using water extraction and alcohol precipitation methods. First, a standard concentration curve for *R. anatipestifer* was used. Next, bacteria of 250, 190, 120, 50 and 20 μL were added to drug concentrations of 115.0, 77.0, 57.0, 46.0, 38.0, 33.0 and $29.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ with three replications. Then, after oscillating the culture for 12 h, the optical density (OD) values were measured. Afterward, the bacterial content for each drug concentration was calculated, the bacterial inhibitory rate was determined, and an analysis of variance was conducted on the inhibition rate. Results showed that for a drug concentration of $38.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 20 μL of *R. anatipestifer*, the antibacterial rate was 99.99%, whereas with 50 μL the rate was 99.98%. However, for $46.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the antibacterial rate against *R. anatipestifer* with 120 μL was 99.99%, with 190 μL it was 99.98%, and with 250 μL it was 99.98%. The optimal and critical drug concentration for antibacterial action was $29.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. It showed a strong antibacterial effect for this medicine indicating further research would

收稿日期: 2009-11-23; 修回日期: 2010-04-14

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y3090613); 浙江省教育厅重点资助项目(Z200906965); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2351000746)

作者简介: 纪丽莎, 从事兽医学与野生动物疾病防治的研究, E-mail: jls59@yahoo.cn。通信作者: 张先福, 副教授, 博士, 从事兽医学与野生动物疾病防治的研究。E-mail: zhangxianfu@yahoo.cn

be beneficial. [Ch, 1 fig. 3 tab. 14 ref.]

Key words: traditional Chinese medicine; coptidis rhizoma decoction; *Riemerella anatipestifer*; inhibitory rate

鸭疫里氏杆菌 *Riemerella anatipestifer* 病, 也称鸭传染性浆膜炎, 是鸭的一种细菌性传染病, 死亡率达 30% ~ 50%。该病以纤维素性心包炎、气囊炎、肝周炎、输卵管炎、关节炎、脑膜炎等为主要病变特征^[1-2]。鸭疫里氏杆菌具有 21 个血清型, 各血清型相互之间没有交叉免疫力, 免疫预防效果不佳^[3-5]; 且鸭疫里氏杆菌对各类抗生素极易产生耐药性^[6-7], 在很多地区已经难以找到对鸭疫里氏杆菌敏感的药物。鉴于此, 我们前期试验筛选出对鸭疫里氏杆菌病具有显著效果并由黄连 *Coptis chinensis*, 黄柏 *Phellodendron amurense* 和甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 3 味中药组成的中药复方黄连汤^[8]。经 HPLC 测定, 黄连汤有效成分分别为小檗碱 299.73 mg·kg⁻¹, 药根碱 108.66 mg·kg⁻¹, 甘草酸 9.00 mg·kg⁻¹, 盐酸小檗碱 5.7 g·kg⁻¹, 盐酸巴马汀 254.00 mg·kg⁻¹ (中草药已录用)。为了进一步研究黄连汤对鸭疫里氏杆菌中外膜蛋白的作用, 本研究开展了黄连汤提取物对鸭疫里氏杆菌的抑菌率研究, 为中药抗菌机制的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 中 药 材 黄连、黄柏和甘草均购自浙江省临安市中医院。

1.1.2 菌 株 及 试 剂 鸭疫里氏杆菌, 由浙江省农业科学院畜牧研究所提供, 由笔者所在实验室进行扩增培养。胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)^[9]作为基础培养基, 配制固体培养基时, 另按 15 g·kg⁻¹ 加琼脂粉, 制成胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)。

1.1.3 仪 器 与 设 备 UV-2450 型精密紫外分光光度计(岛津国际贸易有限公司), 恒温培养箱(杭州蓝天化验仪器厂), 全自动高压灭菌锅(广州东南科仪有限公司)

1.2 方 法

1.2.1 中 药 原 料 处 理 采用水提醇沉法: 取黄连 2 g, 黄柏 2 g, 甘草 4 g 放入烧杯中, 加适量的水, 浸泡, 煮沸后用小火持续 20 ~ 30 min(视药物而定); 滤出煎液, 滤渣加水, 进行第 2 次煎煮(20 ~ 30 min); 滤出煎液, 合并 2 次滤液, 用纱布过滤, 得滤液 75.0 mL, 加入体积分数为 95%乙醇 225 mL, 4 °C 下静置 24 h, 滤纸过滤除沉淀, 在 75 °C 下减压回收乙醇, 85 °C 下继续浓缩得原药 34.8 mL, 药液含生药 229.9 g·L⁻¹, 微孔滤膜过滤除菌后, 放置在 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 鸭疫里氏杆菌的复苏和菌悬液的制备^[10] 在 TSB 肉汤培养基中加入 15 g·kg⁻¹ 琼脂, 加热溶解, 121 °C 高压灭菌 20 min, 倾倒在平板培养皿内, 以此用作冻干菌株的复苏平板培养基。利用平板划线法将冻干菌株接种至平板内, 37 °C, 培养 24 h 后, 挑取单个生长的菌落, 转种至 TSB 肉汤培养基, 振荡培养 12 h。此为菌悬液。

1.2.3 扩 增 培 养 取培养 12 h 的菌悬液 100 μL, 加至装有 TSB 的肉汤培养基中, 37 °C 恒温箱, 分别培养 0, 2, 4, 6, 8 和 10 h, 对各个时间段的生长菌落进行计数, 并测定吸光度值。

1.2.4 菌 落 计 数 和 吸 光 度 值 的 相 关 性 分 析 采用平板菌落计数法^[11]。将定时培养的菌液进行 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, ..., 10⁻⁷, 10 倍递增稀释, 然后分别取不同稀释度的菌液 100 μL 滴加于胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)平板上, 用无菌涂棒涂布均匀, 每个稀释度重复 3 块平板, 37 °C 温箱中培养 12 h。统计平板上生长的活菌数, 乘以稀释倍数, 再乘以 10, 即为菌浓度 (× 10¹⁰ 个·L⁻¹)。定时吸取适量菌液和参比液, 将参比液调 0 后, 测定菌悬液的吸光度 D_{0600} 。该试验设 3 次重复。

1.2.5 药 物 稀 释 与 菌 液 接 种 取无菌试管, 将黄连汤原液与培养基按照 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 和 1:7 的体积比稀释, 药物质量浓度分别为 115.0, 77.0, 57.0, 46.0, 38.0, 33.0 和 29.0 g·L⁻¹, 分别放置到各个试管中。接种菌悬液 20, 50, 120, 190 和 250 μL 到各组配制好的试管药液中。置于 37 °C, 180 r·min⁻¹ 的恒温摇床中培养 12 h。该试验设 3 次重复。另取 1 支含菌悬液的试管作对

照，此为净生长量。

1.2.6 抑制生长率的计算 将不同药物的光密度值代入到鸭疫里氏杆菌生长曲线的线性关系方程式中，计算抑制生长率。抑制生长率 = (细菌净生长量 - 处理净生长量)/细菌净生长量 × 100 %。

1.3 数据分析

试验结果用 Excel 处理，用 SPSS 11.0 统计软件对试验数据进行 ANOVA 分析和回归分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 鸭疫里氏杆菌浓度标准曲线

细菌在培养了 0, 2, 4, 6, 8 和 10 h 后，取 3.0 mL 细菌悬液与参比液，进行吸光度 D_{0600} 测定，以吸光度为横坐标，以菌浓度为纵坐标 ($\times 10^{10}$ 个·L⁻¹)，绘制标准曲线^[13](图1)。

曲线方程为 $y = 0.485 1e^{1.906 8x}$ ， $R^2 = 0.981 1$ 。将其化为线性模型后进行显著性检验，得 $F = 156.006 > F_{0.01} (1, 3) = 34.1$ ，说明在 0.01 水平上两者相关性显著，线性关系良好。

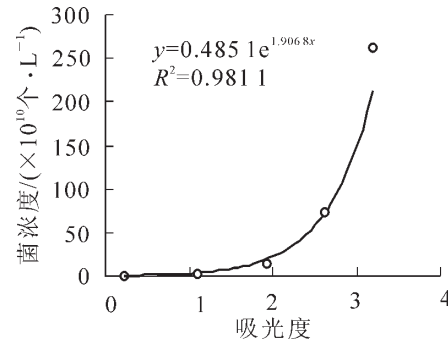


图 1 鸭疫里氏杆菌的吸光度和菌浓度的标准曲线

Figure 1 Curve between OD values and the concentration of *Riemerella anatipestifer*

2.2 不同质量浓度中药浸提物对不同菌量的抑制效果

通过肉眼观察，菌量为 20 μ L 时药物质量浓度在 33.0 g·L⁻¹ 时液体出现混浊，38.0 g·L⁻¹ 时有絮状物；菌量在 50 和 120 μ L 时，药物质量浓度大于 38.0 g·L⁻¹ 时液体较清澈，但 46.0 g·L⁻¹ 有絮状物；菌量在 190 和 250 μ L 时，药物质量浓度在 38.0 g·L⁻¹ 时，液体出现混浊，在 57.0 和 46.0 g·L⁻¹ 都有絮状沉淀，但 57.0 g·L⁻¹ 透明度大于 46.0 g·L⁻¹。从结果可以看出，黄连汤有抑菌效果，但其抑制效果不能得出确切数值。现通过定量的方法来测定抑制率。紫外分光光度计测定各菌量的吸光度值见表 1。

表 1 不同药物质量浓度下对应的吸光度

Table 1 OD values of various drug concentrations corresponding

组别	药物质量浓度/(g·L ⁻¹)	不同菌量的吸光度				
		20 μ L	50 μ L	120 μ L	190 μ L	250 μ L
1 组	29.0	3.225 ± 0.071	2.465 ± 0.014	4.550 ± 0.102	3.250 ± 0.085	3.250 ± 0.174
2 组	33.0	2.050 ± 0.045	2.625 ± 0.062	3.085 ± 0.094	2.200 ± 0.014	2.840 ± 0.135
3 组	38.0	0.149 ± 0.014	0.394 ± 0.059	1.419 ± 0.074	1.440 ± 0.091	2.508 ± 0.097
4 组	46.0	0.024 ± 0.003	0.057 ± 0.011	0.148 ± 0.054	0.284 ± 0.043	0.316 ± 0.085
5 组	57.0	0.022 ± 0.002	0.029 ± 0.005	0.060 ± 0.002	0.138 ± 0.049	0.159 ± 0.046
6 组	77.0	0.017 ± 0.006	0.022 ± 0.001	0.046 ± 0.019	0.096 ± 0.021	0.118 ± 0.024
7 组	115.0	0.035 ± 0.007	0.041 ± 0.002	0.074 ± 0.017	0.112 ± 0.016	0.121 ± 0.025
	细菌对照	4.848 ± 0.003	4.848 ± 0.003	4.848 ± 0.003	4.848 ± 0.003	4.848 ± 0.003

从表 1 中可以看出，除第 7 组外，随着药物质量浓度的增大，吸光度依次递减，抑制率依次增大，但第 7 组的吸光度值小于第 6 组。将以上吸光度值数据代入到曲线方程中，得到各吸光度对应的菌浓度(表 2)。

由表 2 说明，药物质量浓度在 29.0 g·L⁻¹ 时，95% 的菌已经被抑制。菌浓度小于 0.7×10^{10} 个·L⁻¹ 时，液体已经处于澄清透明。横向对比，除第 1 组和第 2 组外，第 3 组到第 7 组随着菌量的增加，菌浓度依次增大。将以上菌浓度通过抑菌生长率公式求得各质量浓度对应的抑菌率(表 3)。

通过上表可见，通过纵向对比，菌量在 20 和 50 μ L 时，药物质量浓度的显著性差异出现在第 3

表2 药物质量浓度作用下对应的菌浓度

Table 2 Bacterial content of under the action of various drug concentrations

组别	药物质量浓度/(g·L ⁻¹)	不同菌量对应的菌浓度/(×10 ¹⁰ 个·L ⁻¹)				
		20 μL	50 μL	120 μL	190 μL	250 μL
1组	29.0	227.245 20	53.349 35	2 842.786 00	238.340 40	238.340 40
2组	33.0	24.180 34	72.381 43	174.003 90	32.186 91	109.061 50
3组	38.0	0.644 50	1.028 27	7.259 78	7.556 38	57.907 92
4组	46.0	0.507 82	0.550 80	0.643 27	0.833 71	0.886 17
5组	57.0	0.505 88	0.512 68	0.543 90	0.631 12	0.656 90
6组	77.0	0.501 08	0.505 88	0.529 57	0.582 55	0.607 50
7组	115.0	0.518 58	0.524 55	0.558 61	0.600 59	0.611 00
细菌对照		5 017.897 00	5 017.897 00	5 017.897 00	5 017.897 00	5 017.897 00

表3 黄连汤有效部位抑菌率

Table 3 Antibacterial rate of ethanol extracts of *Coptidis rhizoma* Decoction against *Riemerella anatipestifer*

组别	药物质量浓度/(g·L ⁻¹)	不同菌量抑菌率/%				
		20 μL	50 μL	120 μL	190 μL	250 μL
1组	29.0	95.426 1**	98.910 2**	39.947 9 **	94.799 2**	94.704 1**
2组	33.0	99.513 3**	98.521 5**	96.324 3 **	99.297 6**	97.576 6**
3组	38.0	99.987 0**	99.979 0**	99.846 6 **	99.835 1**	98.713 3**
4组	46.0	99.989 8	99.989 0	99.986 4**	99.981 8**	99.980 3**
5组	57.0	99.989 8	99.989 5	99.988 5	99.986 2	99.985 4
6组	77.0	99.989 9	99.989 7	99.988 8	99.987 3	99.986 5
7组	115.0	99.989 6	99.989 3	99.988 2	99.986 9	99.986 4

说明: **表示数据之间纵向对比差异极显著($P < 0.01$)。

组, 菌量在 120, 190 和 250 μL 时, 药物质量浓度的显著性差异出现在第 4 组, 与肉眼观察不相吻合。各个菌量的抑菌率分别为 99.99%, 99.98%, 99.99%, 99.98% 和 99.98%, 抑菌率都在 99.98% 以上。

3 讨论

从表 1 中可以看出, 除第 7 组外, 其余药物质量浓度组随着药物质量浓度的增大, 吸光度值依次递减, 抑制率依次增大, 但第 7 组的吸光度值小于第 6 组。药物质量浓度在 77.0 g·L⁻¹ 时抑菌效果最佳。试验说明, 药物质量浓度越大抑制细菌的效率反而会减弱, 可能因为中药是由多种复杂成分构成, 不是所有成分都直接作用于致病菌达到抑制细菌的目的, 有些成分会因为药物质量浓度的增高起到自身抑制的效果, 故中药的抑制率反而会减少, 甚至有些中药的抗菌有效成分在体外抑菌试验中测不出或显示不强, 但在体内却有较好的抑菌效果(如鱼腥草 *Houttuynia cordata*)^[14]。前期试验已经证明, 鸭疫里氏杆菌对人工发病鸭具有显著的治疗效果。

通过肉眼观察, 菌量为 20, 50, 120, 190 和 250 μL 时, 对应的含有絮状物的药物质量浓度分别为 38.0, 46.0, 46.0, 57.0 和 57.0 g·L⁻¹。由表 2 的数值可以看出, 絮状物都出现在 $0.5 \times 10^{10} \sim 0.6 \times 10^{10}$ 个·L⁻¹, 是抑制与非抑制的临界值, 可能是细菌在生长时与药物对抗直至被杀死后所产生细菌死亡之后的菌体变为絮状物, 而大于临界值的细菌未被抑制住, 会使菌液混浊; 小于临界值的细菌被药物抑制, 使液体澄清透明。死亡之后的菌体给实验人员的判读带来了不便的影响, 测定细菌吸光度值, 具有定量准确、方法简便及重复性好等优点。

通过表 2 可以看出, 在 20 μL 菌量时, 第 1 组的菌浓度为 227×10^{10} 个 $\cdot\text{L}^{-1}$, 远远低于对照组 5017×10^{10} 个 $\cdot\text{L}^{-1}$, 抑制率为 95.00%。同样, 在第 2 组里, 只有 24×10^{10} 个 $\cdot\text{L}^{-1}$ 个细菌。这可能是由于药物作用后, 细菌崩解, 破裂, 胞质流出, 体积变小, 减少了混浊度, 从而减少了吸光度。这说明药量在很少的情况下, 都有很大的抑制效果。下一步做药物对细菌外膜蛋白的提取时, 选药物质量浓度为 29.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的即可。

参考文献:

- [1] 李春芬, 李郁, 魏建忠, 等. 安徽省部分地区鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, **31** (3): 197 - 200.
LI Chunfen, LI Yu, WEI Jianzhong, *et al.* Isolation and biological characterization of *Riemerella anatipestifer* in Anhui Province [J]. *J Chin J Prev Vet Med*, 2009, **31** (3): 197 - 200.
- [2] TIMMS L M, MARSHALL R N. Laboratory assessment of protection given by experiment pasteurized *Riemerella anatipestifer* vaccine [J]. *J British Vet*, 1989, **145**: 483 - 493.
- [3] SANDHU T S. Immunization of white pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection [J]. *J Avian Dis*, 1979, **23**: 662 - 669.
- [4] SUBRAMANIAM S, HUANG B, LOH H. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer* [J]. *J Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, **7** (2): 168 - 174.
- [5] 张大丙, 郭玉璞. 鸭疫里氏菌血清型的研究概况[J]. 中国兽医杂志, 2006, **11** (42): 38 - 40.
ZHANG Dabing, GUO Yupu. Development of the research on *Riemerella anatipestifer* [J]. *J Chin J Vet Med*, 2006, **11** (42): 38 - 40.
- [6] 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 等. 我国鸭疫里氏菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性[J]. 中国兽医学报, 2003, **23** (4): 320 - 323.
CHENG Anchun, WANG Mingshu, CHEN Xiaoyue, *et al.* Epidemiology and new serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in China and studies on their pathogenic characteristics [J]. *J Chin J Vet*, 2003, **23** (4): 320 - 323.
- [7] 刘颖. 鸭疫里氏菌耐药性监测与分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
LIU Ying. *Surveillance and Analysis on the Antibiotic Resistance of Riemerella Anatipestifer* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.
- [8] 张先福. 中药防治鸭疫里氏杆菌病的组方筛选及其抗菌机制的初步研究[D]. 浙江: 浙江大学, 浙江省农业科学院, 2006.
ZHANG Xianfu. *Screening of Chinese Herbal Medicine Against Riemerella Anatipestifer Disease and the Preliminary Study of Antibacterial Mechanism* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 2006.
- [9] 杨小林, 刘国平, 龚大春, 等. 鸭里氏杆菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 湖北农业科学, 2006, **9** (45): 5.
YANG Xiaolin, LIU Guoping, GONG Dachun, *et al.* Isolation and Identification of *Riemerella Anatipestifer* [J]. *J Hubei Agric Sci*, 2006, **9** (45): 5.
- [10] 罗如松, 郭爱珍, 林荔雯, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌浊度与细菌计数的关系[J]. 畜牧与兽医, 2005, **37** (10): 10 - 12.
LUO Rusong, GUO Aizhen, LIN Liwen, *et al.* Relationship between the optical density and bacterial count of swine *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *J Anim Husb Vet Med*, 2005, **37** (10): 10 - 12.
- [11] 沈萍. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [12] 胡咏梅. 教育统计学与 SPSS 软件应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2001.
- [13] 胡清海, 陈鸿军, 刘晓文, 等. 鸭疫里氏杆菌生长曲线的测定[J]. 畜牧与兽医, 2002, **34** (8): 8 - 9.
HU Qinghai, CHEN Hongjun, LIU Xiaowen, *et al.* Determination of growth curve of *Riemerella anatipestifer* [J]. *J Anim Husb Vet Med*, 2002, **34** (8): 8 - 9.
- [14] 王嵩. 中草药抗细菌感染研究[J]. 北京中医杂志, 2002, **21** (4): 249 - 250.
WANG Song. Chinese herbal anti-bacterial infection [J]. *J Beijing J Trad Chin Med*, 2002, **21** (4): 249 - 250.