

中药药敏试验新方法及 68 种中药对克氏原螯虾病原菌的抑菌活性研究

邹文腾¹, 彭开松^{1*}, 张子涵¹, 奚业文², 梅正龙³ (1. 安徽农业大学动物科技学院水产系水生健康与公共卫生实验室, 安徽合肥 230036; 2. 安徽省水产技术推广总站, 安徽合肥 230601; 3. 安徽省定远县水务局, 安徽定远 233200)

摘要 为消除中药颜色和不溶颗粒对最小抑菌浓度测定结果判定的影响, 建立了微量肉汤稀释联合平板计数法。结果发现, 抗菌剂(磺胺甲噁唑、多西环素、氟苯尼考、硫酸新霉素、恩诺沙星)MIC 测定前后的 MIC 孔细菌浓度比值(BCR_{MIC})为 $10^{-3} \sim 10^3$ 。以 BCR_{MIC} 为标准替代肉眼观察来判定中药 MIC, 采用微量肉汤稀释联合平板计数法定量评价了 68 种中药的抗菌活性。五倍子、黄连、山楂、地锦草、厚朴、黄芩、石榴皮、翻白草、乌梅对克氏原螯虾病原菌(嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌)的抗菌活性较强, 其 MIC 为 4~16 mg/mL。

关键词 中药; 最小抑菌浓度; 大肠杆菌; 气单胞菌; 柠檬酸杆菌; 克氏原螯虾

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)09-0087-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on A New Method for Drug Susceptibility Test of Traditional Chinese Medicine and Antibacterial Activity of 68 Kinds of Traditional Chinese Medicine against Pathogenic Bacteria of *Procambarus clarkii*

ZOU Wen-teng, PENG Kai-song, ZHANG Zi-han et al (Laboratory of Aquatic Health and Public Health, Department of Fisheries, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract In order to eliminate the influences of the color and insoluble particles of traditional Chinese Medicine on the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of traditional Chinese medicine, the micro broth dilution combined with plate counting method (MBD&PCM) was established. The results showed that the bacterial concentration ratio (BCR_{MIC}) in MIC cell before and after MIC determination of antibiotics (sulfamethoxazole, doxycycline, florfenicol, neomycin sulfate, enrofloxacin) was between 10^{-3} and 10^3 . The antibacterial activity of 68 kinds of traditional Chinese medicines was quantitatively evaluated by MBD&PCM, and BCR_{MIC} was used as the standard instead of naked eye observation to determine MIC of traditional Chinese medicine. The antibacterial activity of 68 kinds of traditional Chinese medicine was quantitatively evaluated by MBD&PCM. *Galla chinensis*, *Coptidis rhizoma*, *Crataegi fructus*, *Euphorbia humifusae herba*, *Magnolia officinalis cortex*, *Scutellariae radix*, *Cranati pericarpium*, *Potentillae discoloris herba* and *Mume fructus* had strong antibacterial activities against pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronica* and *Citrobacter freundii*) of *Procambarus clarkii*.

Key words Traditional Chinese medicine; Minimum inhibitory concentration (MIC); *Escherichia coli*; *Aeromonas* sp.; *Citrobacter* sp.; *Procambarus clarkii*

细菌病是水产养殖业的重大威胁, 每年给我国造成了数百亿元的经济损失。以前水产动物细菌病的防治主要依靠抗菌剂, 但渔业临床病原菌的耐药性正逐年增加, 抗菌药物的临床使用剂量也逐年加大, 这会增加水产品质量安全的风险^[1]。中药是中华民族的伟大瑰宝, 其来源广泛、细菌不易产生耐药性、毒副作用小、无残留。中药替代抗菌剂防治水产动物细菌病具有突出优点和广阔前景^[2]。普及中药在水产养殖上的应用, 不仅符合国家减抗、替抗战略, 而且将为保障舌尖上的安全作出突出贡献。

治疗水产动物细菌病的中药, 可能通过抑制或杀灭细菌直接发挥作用, 也可能通过调节宿主免疫功能或其他生理机能而间接发挥作用。在相同条件下定量评价不同中药对水产动物病原菌的抗菌活性, 是渔用抗菌中药开发的第一步。中药抗菌活性定量评价方法有琼脂稀释法^[3]、试管二倍稀释法^[4]、微量肉汤稀释法^[5]。琼脂稀释法需制备不同浓度梯度药液的琼脂平板, 操作烦琐、工作量大。试管二倍稀释法中, 中药用量大且不适于高通量测定。微量肉汤稀释法是国际、国内通用的抗菌剂最小抑菌浓度(MIC)定量测定方法^[6]。

该方法对 MIC 的判断是基于抗菌药物抑制细菌生长的孔澄清透明, 未被抑制的孔浑浊, 浑浊孔与澄清孔经肉眼观察即可区别开来。微量肉汤稀释法用于中药抗菌活性定量测定时, 虽然具有中药用量少、操作简便快速、适于高通量测定等优点, 但也具有中药提取液的颜色和不溶颗粒会干扰结果判读的缺点。因此, 需要对微量肉汤稀释法进行改进, 以克服中药颜色和不溶颗粒对结果判读的影响。

克氏原螯虾产业近年来发展迅猛, 2019 年全国养殖面积 128.6 万 hm^2 , 总产值达 4 110 亿元^[1]。细菌病是克氏原螯虾产业的重大危害因素^[7]。克氏原螯虾细菌病主要发生在捕捞上市期, 执行抗菌剂休药期存在一定难度。中药适合添加到饲料中高温制粒、安全无残留的特性, 特别适用于克氏原螯虾细菌病的防控。为了筛选适用于克氏原螯虾细菌病防控的中药, 笔者以抗菌剂 MIC 孔在测定前后细菌浓度比值为 MIC 判定依据, 先建立微量肉汤稀释联合平板计数的中药 MIC 定量测定方法, 然后采用该方法测定 68 种常见中药对克氏原螯虾常见细菌性病原的体外抑菌活性, 以期对中药抗菌活性定量评价和克氏原螯虾细菌病的中药防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 嗜水气单胞菌 17J154、维氏气单胞菌 18J032 和弗氏柠檬酸杆菌 17J144 分离自克氏原螯虾, 以上病原菌和大肠杆菌 ATCC25922 均由安徽农业大学动物科技学院水产系水生健康与公共卫生实验室保存^[7]。磺胺甲噁唑、多西环

基金项目 安徽省现代农业产业技术体系项目(皖农科[2016]84号)。
作者简介 邹文腾(1996—), 男, 广东惠东人, 硕士研究生, 研究方向: 水生动物疾病与渔用保健品研发。*通信作者, 副教授, 硕士生导师, 从事水产养殖健康与公共卫生研究。

收稿日期 2021-05-27

素、氟苯尼考、硫酸新霉素、恩诺沙星标准品购自中国兽药监察所。中药均购自合肥市蜀山区长江西路百姓缘大药房。

1.2 方法

1.2.1 中药水提液的制备。取过80目筛的微粉中药各50g放入烧杯,加500mL蒸馏水充分浸透后浸泡4h,60℃水浴1h,沸水浴30min,将药液和药渣经3层200目绢纱过滤压榨至无液体滴出,文火浓缩至512mg/mL。115℃高温灭菌20min后,4℃下保存备用。

1.2.2 微量肉汤稀释联合平板计数测定抗菌剂MIC孔测定前后细菌浓度比值。参考欧盟药敏试验标准方法^[6]进行MIC测定。取-20℃冻存的上述菌株,经MHA平板划线,大肠杆菌ATCC25922在37℃、其他致病菌在25℃下培养,挑取单菌落接种至MH肉汤,制备细菌储备液(用灭菌生理盐水洗涤菌体后,调整菌液OD_{625nm}至0.1,对应菌液浓度约为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL),10倍比稀释至 10^4 、 10^5 (欧盟标准浓度)和 10^6 CFU/mL 3个数量级。采用平板计数法测定细菌工作液初始浓度,该浓度的1/2即为MIC孔测定前细菌浓度。

配制磺胺甲噁唑、多西环素、氟苯尼考、硫酸新霉素、恩诺沙星的药物储备液和药物工作液,在96孔板上依次进行药物工作液和细菌工作液的布板,同时设置阳性对照和阴性对照。96孔板在适温下培养16~18h后,肉眼判读MIC。MIC结果读取后,立刻取MIC对应孔的菌液进行细菌平板计数,测定MIC读取时的MIC孔细菌浓度(即MIC孔测定后细菌浓度)。MIC孔细菌浓度比值(bacterial concentration ratio of MIC well, BCR_{MIC})=(MIC孔测定前细菌浓度)/(MIC孔测定后细菌浓度)。

1.2.3 68种中药对克氏原螯虾病原菌的药敏试验。为了消除中药颜色和不溶颗粒对MIC结果读判的影响,以抗菌剂的

BCR_{MIC}值为依据,参考欧盟药敏试验标准^[6],采用微量肉汤稀释法联合平板计数法测定试验中药的MIC和MBC。将上述细菌的储备液用MH肉汤稀释至 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL数量级,并采用平板计数法测定细菌工作液初始浓度(即MIC孔测定前细菌浓度)。取96孔板,在A行各孔中加入200μL中药提取液,B~F行各孔中加入100μL无菌蒸馏水,从A行各孔中吸取100μL移至B行各对应孔中混匀,依次稀释至F行后,弃100μL混合药液。在除H行外的各孔中加入100μL对应数量级的菌液,并在H和G行中分别加入100和200μL MH肉汤作为对照,适温培养16~18h。因为中药水提液颜色深、含有颗粒物,肉眼很难判读MIC值。培养完成后,取96孔板上除对照孔外的各孔菌液10μL加入10mL灭菌生理盐水中混匀稀释后,取0.1mL涂布在MHA平板上,于适宜温度下培养24h,计数,得到MIC测定后各孔细菌浓度。MIC孔测定后细菌浓度=BCR_{MIC}×MIC孔测定前细菌浓度。满足上述条件的孔对应的最小中药浓度,即为该中药对该菌株的MIC。

2 结果与分析

2.1 抗菌剂MIC测定前后MIC孔细菌浓度比值 由表1可知,静止期慢效杀菌剂硫酸新霉素的BCR_{MIC}在 $10^{-3} \sim 10^{-1}$ 数量级,静止期慢效抑菌剂磺胺甲噁唑的BCR_{MIC}在 $10^1 \sim 10^2$ 数量级,繁殖期快效抑菌剂多西环素的BCR_{MIC}在 $10^0 \sim 10^1$ 数量级,繁殖期快效抑菌剂氟苯尼考的BCR_{MIC}在 $10^0 \sim 10^3$ 数量级,繁殖期快效杀菌剂恩诺沙星的BCR_{MIC}在 $10^0 \sim 10^1$ 数量级。综上所述,以水产养殖用国标抗菌剂中具有代表性的5种抗菌剂为测试药物,测定的BCR_{MIC}值均在 $10^{-3} \sim 10^3$ 之间,这也符合理论上的预测。根据MIC测定原理,抗菌剂MIC测定前后MIC孔中菌液浓度比值(BCR_{MIC})可以类推应用于中药MIC的测定。

表1 抗菌剂MIC测定前后MIC孔细菌浓度比值

Table 1 The bacterial concentration ratio (BCR_{MIC}) in MIC cell before and after MIC determination of antibiotics

测前菌液浓度 Bacterial concentration before the determination CFU/mL	菌株 Strain	磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	多西环素 Doxycycline	氟苯尼考 Florfenicol	硫酸新霉素 Neomycin sulfate	恩诺沙星 Enrofloxacin
1.51×10 ⁴	大肠杆菌 ATCC25922	100.66	2.32	5.63	0.1523	16.56
	嗜水气单胞菌 17J154	168.21	38.41	7.95	0.2053	21.85
	维氏气单胞菌 18J032	125.17	21.19	9.93	0.1457	17.88
	弗氏柠檬酸杆菌 17J144	235.76	11.92	21.19	0.3179	30.46
2.10×10 ⁵	大肠杆菌 ATCC25922	23.81	4.24	814.57	3.3113	3.31
	嗜水气单胞菌 17J154	48.10	2.71	1331.13	0.4172	13.91
	维氏气单胞菌 18J032	38.57	5.62	2066.23	0.5894	21.19
	弗氏柠檬酸杆菌 17J144	53.33	7.57	1993.38	0.6291	12.58
1.27×10 ⁶	大肠杆菌 ATCC25922	68.50	7.07	96.85	0.0050	7.01
	嗜水气单胞菌 17J154	119.69	19.76	82.68	0.0061	7.56
	维氏气单胞菌 18J032	46.46	24.41	7.72	0.0077	0.76
	弗氏柠檬酸杆菌 17J144	52.76	2.20	50.39	0.0315	0.31

2.2 68种中药对克氏原螯虾病原菌的MIC和MBC 以抗菌剂MIC测定前后MIC孔菌液浓度比值(BCR_{MIC})为依据,判定中药的MIC值,结果见表2。根据MIC的范围,将中药抗菌活性分为强、中、弱3类。以盐酸小檗碱作为该试验

的阳性对照,未予归类。①MIC值为4~16mg/mL的中药归为抗菌力强的中药,共17种,包括五倍子、黄连、山楂、地锦草、焦山楂、厚朴、黄芩、石榴皮、翻白草、乌梅、墨旱莲、连翘、地榆炭、半边莲、六月雪、大蓟、夏枯草。②MIC值为32~

64 mg/mL 的中药归为抗菌力中等的中药,共 27 种,包括石见穿、牡丹皮、防风、川楝子、千里光、西青果、冬瓜子、桑叶、姜皮、马鞭草、知母、陈皮、艾叶、忍冬藤、青蒿、茵陈、蒲公英、透骨草、野菊花、金银花、秦皮、炒栀子、龙胆、败酱草、桂枝、大黄、蒲黄。③MIC 值 ≥ 128 mg/mL 的中药归为抗菌力弱的中药,共 23 种,包括马齿苋、桑寄生、墓头回、浮萍、车前草、

芦根、淡豆豉、苦参、土牛膝、紫花地丁、黄芪、升麻、地骨皮、天冬、海桐皮、猕猴桃根、白头翁、莱菔子、玄参、黄柏、鹿衔草、仙茅、醋没药。

由表 2 可知,68 种中药的 MBC 与 MIC 比值为 1~8,且大部分中药的 MBC 与 MIC 比值为 2,说明所测细菌对 68 种中药没有耐药性。

表 2 68 种中药对大肠杆菌及克氏原螯虾病原菌的 MIC 和 MBC

中药 Traditional Chinese medicine	大肠杆菌 ATCC25922 <i>E. Coli</i> ATCC25922		嗜水气单胞菌 17J154 <i>A. hydrophila</i> 17J154		维氏气单胞菌 18J032 <i>A. veronica</i> 18J032		弗氏柠檬酸杆菌 17J144 <i>C. freundii</i> 17J144	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
盐酸小檗碱 <i>Berberine hydrochloride</i>	0.5	4	0.5	2	1	4	1	4
五倍子 <i>Galla chinensis</i>	4	4	4	4	4	4	4	4
黄连 <i>Coptidis rhizoma</i>	4	8	4	8	4	8	4	8
地锦草 <i>Euphorbia humifusae herba</i>	4	8	4	8	4	8	8	16
山楂 <i>Crataegus pinnatifida</i>	4	8	4	16	8	16	8	16
焦山楂 <i>Crataegus pinnatifida</i>	8	16	8	16	8	16	8	32
厚朴 <i>Magnoliae officinalis cortex</i>	8	16	8	16	8	16	8	16
黄芩 <i>Scutellariae baicalensis</i>	8	32	8	32	8	32	16	32
石榴皮 <i>Cranati pericarpium</i>	16	32	16	32	8	32	16	32
翻白草 <i>Potentillae discoloris herba</i>	16	32	16	32	16	32	8	32
乌梅 <i>Mume fructus</i>	16	32	8	32	8	32	16	32
墨旱莲 <i>Ecliptae herba</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
连翘 <i>Forsythiae fructus</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
地榆炭 <i>Sanguisorba officinalis</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
半边莲 <i>Lobelia chinensis herba</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
六月雪 <i>Serissa japonica</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
大蓟 <i>Cirsii japonica herba</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
夏枯草 <i>Prunellae spica</i>	16	32	16	32	16	32	16	32
石见穿 <i>Salviae chinensis herba</i>	16	64	32	64	32	64	32	64
牡丹皮 <i>Moutan cortex</i>	16	64	32	64	32	64	32	64
防风 <i>Saposhnikoviae radix</i>	32	64	32	64	16	64	32	64
川楝子 <i>Toosendan fructus</i>	32	64	32	64	32	64	32	64
千里光 <i>Senecionis scandentis herba</i>	32	64	32	64	32	64	32	64
西青果 <i>Chebulae fructus immaturus</i>	32	64	32	64	32	64	32	64
冬瓜子 <i>Semen benincasae</i>	32	64	32	64	32	64	32	64
桑叶 <i>Mori folium</i>	32	64	32	64	32	64	32	64
姜皮 <i>Zingiber officinale</i>	32	64	32	64	32	64	64	64
马鞭草 <i>Verbenae herba</i>	32	64	32	64	32	64	32	64
知母 <i>Anemarrhenae rhizoma</i>	32	64	32	64	64	64	32	64
陈皮 <i>Citri reticulatae pericarpium</i>	32	64	32	64	64	64	64	64
艾叶 <i>Artemisiae argyi folium</i>	32	64	32	64	64	64	64	64
忍冬藤 <i>Lonicerae japonicae caulis</i>	64	64	64	64	32	64	64	64
青蒿 <i>Artemisiae annuae herba</i>	64	64	64	64	64	64	64	64
茵陈 <i>Artemisiae scopariae herba</i>	64	64	64	64	64	64	64	64
蒲公英 <i>Taraxaci herba</i>	64	64	64	64	64	64	64	64
透骨草 <i>Phryma leptostachya</i>	64	64	64	64	32	64	64	64
野菊花 <i>Chrysanthemi indicis flos</i>	64	64	64	64	32	64	32	64
金银花 <i>Lonicerae japonicae flos</i>	64	64	64	64	32	64	32	64
秦皮 <i>Fraxini cortex</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
炒栀子 <i>Gardenia jasminoides</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
龙胆 <i>Gentianae radix et rhizoma</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
败酱草 <i>Herba Patriniae</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
桂枝 <i>Cinnamomi ramulus</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
大黄 <i>Rhei radix et rhizoma</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
蒲黄 <i>Typhaepollen pollen</i>	64	128	64	128	64	128	64	128
马齿苋 <i>Portulacae herba</i>	64	128	64	128	128	128	128	128

接下表

续表 2

中药 Traditional Chinese medicine	大肠杆菌 ATCC25922 <i>E. Coli</i> ATCC25922		嗜水气单胞菌 17J154 <i>A. hydrophila</i> 17J154		维氏气单胞菌 18J032 <i>A. veronica</i> 18J032		弗氏柠檬酸杆菌 17J144 <i>C. freundii</i> 17J144	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
桑寄生 <i>Taxilli herba</i>	64	128	64	128	128	128	128	128
墓头回 <i>Patrinia heterophylla</i>	64	128	64	128	128	128	64	128
浮萍 <i>Spirodela herba</i>	64	128	64	128	128	128	128	128
车前草 <i>Plantaginis herba</i>	128	128	128	128	128	128	128	128
芦根 <i>Phragmitis rhizoma</i>	128	128	128	128	128	128	128	128
淡豆豉 <i>Sojae semen praeparatum</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
苦参 <i>Sophorae flavescens radix</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
土牛膝 <i>Eupatorium chinense</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
紫花地丁 <i>Viola herba</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
黄芪 <i>Astragali radix</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
升麻 <i>Cimicifugae rhizoma</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
地骨皮 <i>Lycii cortex</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
天冬 <i>Asparagi radix</i>	128	256	128	256	64	256	128	256
海桐皮 <i>Erythrina variegata</i>	128	256	128	256	128	256	128	256
猕猴桃根 <i>Radix actinidiae</i>	128	256	128	256	128	256	128	256
白头翁 <i>Pulsatillae radix</i>	128	256	128	256	128	256	128	256
莱菔子 <i>Raphani semen</i>	128	256	128	256	128	256	128	256
玄参 <i>Scrophulariae radix</i>	128	256	128	256	128	256	128	256
黄柏 <i>Phellodendri chinensis cortex</i>	128	256	128	256	128	256	128	256
鹿衔草 <i>Pyrolae herba</i>	128	>256	128	>256	128	>256	128	>256
仙茅 <i>Curculiginis rhizoma</i>	256	>256	256	>256	256	>256	256	>256
醋没药 <i>Myrrha</i>	256	>256	256	>256	256	>256	256	>256

3 讨论

3.1 抗菌剂 MIC 测定前后 MIC 孔细菌浓度比值 该研究预试验结果显示,抗菌剂 MIC 测定前的细菌工作浓度为 $(1\sim 2)\times 10^4$ 、 $(1\sim 2)\times 10^5$ (欧盟标准浓度)和 $(1\sim 2)\times 10^6$ CFU/mL 时,对上述 5 种抗菌剂 MIC 的测定值无明显影响。该研究中细菌起始浓度在 $10^4\sim 10^6$ CFU/mL 数量级时,同一抗菌剂 BCR_{MIC} 值的数量级大部分相同,仅少数相差 1 个数量级。按照最大杀菌浓度(MBC)的定义^[6],杀死 99.9%(降低 3 个数量级)的供试细菌所需的最低药物浓度即 MBC,可确定 MIC 测定前后细菌浓度比值(BCR_{MIC}) $\leq 10^{-3}$ 的孔所对应的药物浓度属于杀菌浓度范围。当细菌菌液浓度为 $(1\sim 2)\times 10^8$ CFU/mL 时,肉眼可见菌液浑浊^[6]。理论上,当 BCR_{MIC} 为 $10^{-3}\sim 10^3$ 时,该孔对应药物浓度属于抑菌浓度范围,该试验也进一步证实了此推测。

3.2 中药体外抑菌效果的影响因素 中药抗菌定量评价方法中的试管二倍稀释法^[4]、微量肉汤稀释法^[5]是参考抗菌剂 MIC 测定方法进行,通过肉眼观察培养物是否浑浊来判断 MIC。由于中药颜色深或中药微细颗粒会影响结果判断,特别是 MIC 值较大的中药颜色更深,可能导致无法判读结果或误读结果。该改进方法借鉴了抗菌剂 MBC 测定方法,联合微量肉汤稀释和细菌平板计数,将 MIC 测定过程中细菌增殖倍数为 $10^{-3}\sim 10^3$ 的药物浓度定义为最小抑菌浓度范围,该定量方法可消除中药颜色和不溶颗粒对结果判读的干扰。

影响中药体外抑菌效应的因素较多。一方面,可能来自中药,包括中药种类不同,同一种中药的产地、生境和炮制方法不同等;另一方面,可能来自菌株,包括菌株的种属不同,

同一种属细菌的分离来源、耐药性等不同。同一种中药对同一种菌不同菌株 MIC 值的比较,其结果在很多时间可能并不一致。例如,大黄水提液对不同大肠杆菌菌株的 MIC 值分别为 7.82^[8]、15.63^[4]、62.5^[9]、500^[10] mg/mL,对不同嗜水气单胞菌菌株的 MIC 值分别为 0.75^[3]、15.62~31.25^[11]、100^[5]、227^[12] mg/mL。黄芩水提液对不同大肠杆菌菌株的 MIC 值分别为 15.63^[6]、31.25^[4]、62.5^[10]、208.33^[13] mg/mL,对嗜水气单胞菌不同菌株的 MIC 值为 0.375^[3]、15.62~62.50^[11]、166.30^[14] mg/mL。

鉴于以上原因,固定某一菌株后才能在体外比较不同中药的相对抑菌活性。

3.3 固定菌株条件下不同中药在体外对克氏原螯虾病原菌的抑菌活性 李海华等^[2]测定了 17 种中药对大肠杆菌的抑菌活性,抑菌活性大小为博落回>黄连>水杨梅>乌梅>马齿苋>诃子>黄柏>赤芍>山楂>五味子>柴胡、桔梗、石榴皮、黄芩、荆芥、山豆根、八角茴香。

彭金菊等^[5]研究显示五倍子、梔子、诃子和五味子对嗜水气单胞菌抑菌作用比较明显,其 MIC ≤ 12.5 mg/mL;其次为黄芩、石榴皮、乌梅、川黄连,其 MIC 均为 25.0 mg/mL;青蒿 MIC 为 50.0 mg/mL,鱼腥草、甘草、大黄等 23 味药的 MIC ≥ 100.0 mg/mL。

朱成科等^[15]比较了 150 种中药对维氏气单胞菌 RC110724 的体外抑菌活性,结果发现五倍子、地榆、石榴皮、乌梅、虎杖、诃子、五味子的 MIC 均小于 16 mg/mL,仙鹤草、香薷、射干、吴茱萸、鹿含草、苦地丁、红藤、黄连的 MIC 为 31.25 mg/mL。

(下转第 95 页)

$H' < 1$ 时,人类对生物的影响为重度;当 $1 < H' < 3$ 时,人类对生物的影响为中度;当 $H' > 3$ 时,人类对生物基本没影响。依此判断,此调查海域的渔业资源可能受到的人为影响为中度。这可

能与人类的过度捕捞以及该海域周边临港工程、养殖活动产生的污染物有关。

表 3 岚山港区近岸海域秋季渔业资源多样性指数

Table 3 The diversity indices of fishery resources in the coastal waters of Lanshan Port in autumn

站位 Stations	H'	J'	D	站位 Stations	H'	J'	D	站位 Stations	H'	J'	D
LS01	1.891	0.654	2.231	LS05	2.147	0.651	2.754	LS09	2.329	0.733	3.160
LS02	2.273	0.675	3.395	LS06	2.208	0.649	4.010	LS10	2.761	0.838	3.865
LS03	2.460	0.704	4.389	LS07	2.078	0.638	3.287	LS11	1.903	0.766	1.615
LS04	2.734	0.804	4.416	LS08	2.718	0.855	3.309	LS12	2.209	0.678	4.137

3 结论

此次调查共捕获渔业资源种类 59 种,其中鱼类 38 种,甲壳类 16 种,头足类 5 种。优势种为 3 种,分别为戴氏赤虾、尖海龙和短蛸。此调查海域平均重量资源密度和平均尾数资源密度分别为 411.36 kg/km^2 和 $102.53 \times 10^3 \text{ ind./km}^2$ 。

与该海域同一季节历史资料相比,甲壳类重量占比和数量占比均有所增加,同时经济价值较高的种类数量明显下降。

参考文献

- [1] 中国海洋志编纂委员会. 中国海洋志: 第 4 分册 [M]. 北京: 海洋出版社, 1993.
- [2] 王尽文, 陶卉卉, 张乃星, 等. 2016 年春季日照港岚山港区近岸海域渔业资源浅析 [J]. 广西科学院学报, 2018, 34(2): 125-129, 136.
- [3] 王尽文, 黄娟, 张亮, 等. 石臼港近岸海域秋季游泳动物群落结构浅析 [J]. 广西科学院学报, 2020, 36(2): 158-163.
- [4] 王尽文, 黄娟, 陶卉卉, 等. 石臼港近岸海域春季鱼卵仔稚鱼调查研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(21): 91-94.
- [5] 王尽文, 黄娟, 孙彦, 等. 石臼港区近岸海域春季游泳动物群落结构浅析 [J]. 海岸工程, 2020, 39(3): 224-230.
- [6] 张亮, 王尽文, 任荣珠, 等. 海洲湾北部海域春季渔业资源的群落结构特征 [J]. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 1-7.

- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 海洋调查规范 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [8] 中华人民共和国农业部. 建设项目对海洋生物资源影响评价技术规范: SC/T 9110-2007 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [9] PINKAS L, OLIPHANT M S, IVERSON I L K. Food habits of albacore, bluefin tuna and bonito in California waters [J]. Fish Bull, 1971, 152: 1-105.
- [10] SHANNON C E, WEAVER W. The mathematical theory of communication [M]. Illinois: Urbana University of Illinois Press, 1949.
- [11] MARGALEF R. Information theory in ecology [J]. General systematics, 1958, 3: 36-71.
- [12] PIELOU E C. Ecological diversity [M]. New York: Wiley, 1975: 4-49.
- [13] 李涛. 北黄海及山东半岛南部近岸海域渔业资源群落结构的初步研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [14] 戴芳群, 朱玲, 陈云龙, 黄. 东海渔业资源群落结构变化研究 [J]. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 1-10.
- [15] 程济生. 黄渤海近岸水域生态环境与生物群落 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2004.
- [16] 王尽文, 黄娟, 姜万钧, 等. 日照近岸海域冬夏季网采浮游植物群落结构及其与环境因子的关系 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(1): 86-96.
- [17] 国家环保局《水生生物监测手册》编委会. 水生生物监测手册 [M]. 南京: 东南大学出版社, 1993: 34-37.

(上接第 90 页)

杨移斌等^[16]研究了中药对弗氏柠檬酸杆菌的 MIC, 抗菌活性大小依次为乌梅>石榴皮、地榆、杞子>大青叶、黄柏、茉莉花>艾叶、薄荷叶、杜仲、红花。

以上文献显示, 不同中药对不同菌株的 MIC 值存在差异, 抗菌活性相对强的中药有五倍子、黄连、山楂、地锦草、焦山楂、厚朴、黄芩、石榴皮、翻白草、乌梅等, 这与前人研究报告^[2,5,15-16]基本一致。

4 结论

以 MIC 测定前后 MIC 孔细菌浓度比值 (BCR_{MIC}) 为 $10^{-3} \sim 10^3$ 为判定标准, 或者以 MIC 测定过程中细菌增殖倍数为 $10^{-3} \sim 10^3$ 的孔对应药物浓度为最小抑菌浓度, 采用微量肉汤稀释联合平板计数法能更准确地定量评价中药抗菌活性。对克氏原螯虾病原菌 (嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌) 抗菌活性较强的中药有五倍子、黄连、山楂、地锦草、厚朴、黄芩、石榴皮、翻白草、乌梅。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2019 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 152.
- [2] 李海华, 郭蔚冰, 陈志强, 等. 45 味中药对多重耐药大肠杆菌的抑菌效果 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(6): 791-796.

- [3] 李秋云, 李忠琴, 张坤, 等. 5 种中药和 28 种抗生素对养殖鳊致病菌的抑制作用 [J]. 中兽医医药杂志, 2014, 33(3): 9-12.
- [4] 吕彪, 宋志元, 储君, 等. 20 种中草药提取物对 4 种常见病原菌体外抑菌试验 [J]. 中兽医学杂志, 2016(4): 4-6.
- [5] 彭金菊, 马骅, 罗伟英, 等. 32 种中药及其复方对嗜水气单胞菌体外抑菌效果 [J]. 中兽医医药杂志, 2009, 28(6): 5-7.
- [6] 刘玉庆, 李璐璐, 骆延波, 等. EUCAST 欧盟药敏试验标准 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 148.
- [7] 唐庆权, 韩阳, 许晓牧, 等. 克氏原螯虾肝胰腺病原菌的分离鉴定和药敏试验 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47(21): 96-98.
- [8] 王俊丽, 张要齐, 孙雪峰, 等. 18 种中药对猪大肠杆菌的体外抑菌活性的测定方法比较 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 12947-12948, 12951.
- [9] 姜源明, 俸祥仁, 兰宗宝, 等. 中药对猪场常见病原菌的药敏特性及联合抑菌活性评价 [J]. 江西农业学报, 2019, 31(2): 80-85.
- [10] 鹿意, 梁晓, 秦志华, 等. 八味中药及其复方对鸡大肠杆菌的体外抑制试验 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(6): 70-72.
- [11] 陈晓利, 彭彬, 占爱思, 等. 黄鳝源嗜水气单胞菌的体外中药药敏试验 [J]. 淡水渔业, 2014, 44(2): 43-46.
- [12] 陶健, 李绍成, 刘红柏. 21 种中草药及复方制剂对嗜水气单胞菌的体外抑菌作用 [J]. 水生态学杂志, 2013, 34(3): 90-93.
- [13] 王帅兵, 王婧, 陈海峰, 等. 8 种中药对猪源大肠杆菌的体外抑菌效果 [J]. 贵州农业科学, 2018, 46(4): 94-97.
- [14] 曹良, 李英伦. 斑点叉尾鲷“腹水症”病原的体外中药药敏试验 [J]. 水生态学杂志, 2009, 30(1): 95-97.
- [15] 朱成科, 王建, 周燕, 等. 150 种中草药体外抑杀维氏气单胞菌的药效研究 [J]. 淡水渔业, 2018, 48(1): 80-85, 96.
- [16] 杨移斌, 曹海鹏, 夏永涛, 等. 41 种中草药对 3 种鳊源病原菌的体外抑菌效果 [J]. 淡水渔业, 2013, 43(4): 80-84.