

中草药抑制剂对中国对虾致病菌哈维氏弧菌的抑制效果

樊英, 盖春蕾, 王晓璐, 许拉, 刁菁, 于晓清, 叶海斌*

(山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266104)

摘 要: 用抑菌圈法和微量二倍稀释法研究金银花、车前草等 16 种中草药提取液和纳米锌、纳米银对中国对虾来源病原菌——哈维氏弧菌 TCBS-G 的抑制效果。结果表明: 纳米锌对 TCBS-G 产生的透明抑菌圈直径达 35 mm, 地锦的透明抑菌圈直径约 25 mm; 采用 96 孔板倍数稀释法测定最小抑菌浓度(MIC), 纳米锌、地锦的最小抑菌浓度均为 12.5 mg/mL, 纳米银的达 6.25 mg/mL; 采用 MTT 比色法检测不同抑制剂对哈氏弧菌生物膜形成的影响, 纳米锌、纳米银对 TCBS-G 生物膜形成具有明显的抑制作用, 药液质量浓度大于 3.125 mg/mL 时具有显著差异($P<0.05$); 黄芪、地锦药液质量浓度大于 12.5 mg/mL 时抑制作用显著($P<0.05$)。普通药敏试验结果显示, 该菌株对头孢他啶、庆大霉素、复方新诺明等药物极其敏感, 抑菌圈直径达 20 mm 以上, 对头孢氨苄、四环素等均不敏感。

关 键 词: 中国对虾; 哈维氏弧菌; 中草药; 纳米锌; 纳米银; 敏感性

中图分类号: S945.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)06-0657-05

Effects of different inhibitors on *Vibrio harveyi* from *Fenneropenaeus chinensis*

FAN Ying, GAI Chunlei, WANG Xiaolu, XU La, DIAO Jing, YU Xiaoqing, YE Haibin

(Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China)

Abstract: The inhibitory effects of *Lonicera japonica*, *Plantago depressa* and other 16 herbal extracts and nano-zinc, nano-silver on *Vibrio harveyi* (TCBS-G) from *Fenneropenaeus chinensis* were studied by means of disc agar diffusion and micro double dilution methods. The results showed that nano-zinc had a strong inhibitory effect on TCBS-G with the diameter of 35 mm inhibition zone, followed by *Herba euphorbiae* with the diameter of 25 mm. The MIC of nano-zinc and *Herba euphorbiae* detected on 96 well plates via multiple dilution method was 12.5 mg/mL, the value was 6.25 mg/mL for that of nano-silver. From the test of different inhibitors on biofilm formation of *Vibrio harveyi* by mean of MTT assay, we found that the inhibitory effect of nano-zinc on the formation of *V. harveyi* biofilm was significant, especially when the solution concentration was above 3.125 mg/mL ($P<0.05$), and there were also significant effects for *Astragalus membranaceus* and *Herba euphorbiae*, when their concentration were above 12.5 mg/mL ($P<0.05$). The result from susceptibility test of general drugs showed that the TCBS-G was very sensitive to Ceftriaxime, Gentamicin, compound Sulfamethoxazole with less than 20 mm diameter of inhibition zone, however, it was not sensitive to Cephalosporins, Tetracycline etc.

Keywords: *Fenneropenaeus chinensis*; *Vibrio harveyi*; herbal; nano-zinc; nano-silver; sensitivity

目前, 中国对虾养殖品种主要有凡纳滨对虾、中国对虾、斑节对虾和日本对虾。各品种养殖面积迅速增长, 养殖规模不断扩大^[1]。由于生产经验不足和可持续发展理念缺乏及养殖者对经济利益过

分追求, 养殖水质及生态环境恶化, 细菌病和病毒病等各种疾病蔓延, 使虾养殖产业经济损失严重^[2-3]。细菌、真菌、病毒、寄生虫等各种病害在对虾养殖过程中都有不同程度发生, 细菌性疾病——弧菌病

收稿日期: 2017-06-12

修回日期: 2017-11-07

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项基金(CARS-47); 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类产业创新团队项目(SDAIT-13)

作者简介: 樊英(1980—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事水产动物养殖及病害防控研究, fy_fy123@126.com; *通信作者, 叶海斌, 副研究员, 主要从事水产动物养殖及病害防控研究

是其中危害对虾育苗及养殖的重要病害之一。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种条件致病菌。该菌通常在病灶处大量繁殖,使内脏等发生严重病变,从而导致养殖动物死亡^[4-5]。

中草药因其独特的性质,在水产养殖业越来越受到青睐。中草药防治疾病的机理可能在于它的复杂成分。中草药中的多糖类、生物碱类等有效活性成分既具有广泛的抗病力,又可作为营养物质调节动物机体的抗病因子,提高动物自身组织的防御能力和免疫功能^[6-8]。笔者研究不同抑制剂对中国对虾来源病原菌哈维氏弧菌的抑制效果,以期研发具有针对性的专用抗菌药物或饲料添加剂,为对虾养殖病害防控和实现绿色健康养殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和中草药及其他试剂

供试哈维氏弧菌从某海水养殖场濒死中国对虾病变组织(鳃、肝胰腺)中分离得到,保存于 -80°C 。纳米锌、纳米银均来自南京精德丰新材料科技有限公司。大黄(*Rheum officinale*)、公丁香(*Flos caryophylli*)、鸡血藤(*Millettia reticulata* Benth)、五倍子(*Gallachinensis*)、金银花(*Flos loniceræ*)、苏木(*Caesalpinia sappan*)、地锦(*Herba euphorbiae*)、艾草(*Folium artemisiae*)、黄芩(*Radix scutellariae*)、穿心莲(*Andrographis paniculata*)、黄芪(*Astragalus membranaceus*)、桑叶(*Folium mori*)、石韦(*Folium pyrrhosiae*)、车前草(*Plantago asiatica*)、苜蓿(*Medicago sativa* Linn)、金钱草(*Dichondra repens* Forst)等均购自宝鸡市方晟生物开发有限公司。药敏试剂盒购自杭州天和微生物试剂有限公司。MTT,又称噻唑蓝,化学名为3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐购自Sigma。其他试剂均为化学分析纯。

1.2 菌液及中草药提取液的制备

将供试菌株纯培养物转接于2216E培养基上, 28°C 过夜培养,稀释活化菌液至 1.0×10^8 cfu/mL, 4°C 保存,备用。

取16种中草药提取物各1 g,分别用10 mL无菌水浸泡30 min,浸泡期间不断搅拌,用双层纱布过滤,煮沸煎煮5 min灭菌, 4°C 保存,备用。

1.3 中草药体外抑菌效果及最小抑菌浓度的测定

采用琼脂扩散抑菌圈法判断不同抑制剂对TCBS-G的体外抑制效果。将150 μL 活化的TCBS-G均匀涂布于2216E平板,随即放入无菌牛津杯4个(十字直径摆放,保证每孔之间的距离不小于2 cm),每孔加入50 μL 灭菌药液,以只涂有菌液的平板作为对照。 28°C 培养24 h,用游标卡尺测量抑菌圈;每孔取不同方向测量3次,取平均值。抑菌圈直径 ≥ 20 mm为强,以“+++”表示;抑菌圈直径 $> 10\sim 20$ mm为中等,以“++”表示;抑菌圈直径为 $> 3\sim 10$ mm为弱,以“+”表示;抑菌圈直径 ≤ 3 mm无抑菌作用,以“-”表示。

选取抑菌效果明显的不同抑制剂(纳米锌、纳米银、黄芪、地锦、鸡血藤、天蚕素、车前草),参照吴增华^[9]的方法,用优化的二倍稀释法进行MIC测定。取无菌96孔酶标板,每孔加入100 μL 灭菌2216E液体培养基;第一孔中加入100 μL 无菌中草药液,充分混匀后取出100 μL 混合液加入到第2孔中,充分混匀后再取100 μL 混合液加入到第3孔,以此类推,获得原药液质量浓度的1/2、1/4、1/8,……,1/128;第8孔作为阴性对照组,加入100 μL 中草药液后不加菌悬液,其余7孔均加入100 μL 菌悬液(1×10^8 cfu/mL);将最后一行设为阳性对照组,不加中草药液,加入100 μL 培养基,再加入100 μL 菌悬液,混匀后置于 28°C 培养24 h。参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)发布的水产细菌药敏检测标准(M49-A),将细菌存活率 $\leq 20\%$ 的最低药物质量浓度判定为最小抑菌浓度(MIC)。

1.4 哈维氏弧菌 TCBS-G 生物膜的形成及抑制剂对其形成的影响

参考黎家勤的方法^[10],将TCBS-G通过2216E液体培养基按1:10和1:100的比例进行稀释,分别将稀释好的菌悬液以每孔200 μL 加入到无菌96孔酶标板(设3个平行),以无菌液体培养基为对照, 28°C 恒温静置培育24、36、48 h;弃孔内培养液,用无菌生理盐水清洗, 60°C 干燥固定,每孔加入100 μL 0.1%结晶紫,室温染色10 min,用无菌生理盐水清洗多余染液3次;待干燥后,每孔加入200 μL 33%的乙酸充分溶解结晶紫,用酶标仪测定 $OD_{590\text{ nm}}$ 。

研究纳米锌、纳米银、黄芪、地锦、鸡血藤、天蚕素和车前草对生物膜形成的影响。TCBS-G活化菌液用2216E液体培养基按1:100进行稀释、分

装；分别加入同体积 7 种不同的抑制剂，混匀，分别吸取 200 μL 加入到无菌 96 孔酶标板中，设 3 个平行，并设阳性对照(含 0.1 mol/L EDTA)、阴性对照(仅含培养基和供试菌液)、空白对照(仅含培养基)和无菌的药物对照(仅含中草药液和培养基)，倍比稀释(1/2, 1/4, 1/128)后 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 48 h。待生物膜形成后，采用 MTT 法检测抑制生物膜量：将 50 μL MTT 溶液(通过预温的 0.15 mol/L PBS 按 1 : 5 的比例进行稀释)加入每孔中，28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 5 h；弃每孔溶液，用 PBS 冲洗 3 次；每孔加入二甲基亚砷 DMSO 150 μL ，振荡 5 min，检测 $OD_{540\text{ nm}}$ 。

1.5 不同药物对致病菌的抑制效果

用药敏纸片法检测抑制效果。以无菌涂布棒将 1.0×10^8 cfu/mL 菌液均匀涂布于 2216E 平板，将不同的药敏纸片按照规则贴于涂布平板上，培养 24 h 后观察，记录各药敏纸片的抑菌圈直径。

1.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 不同抑制剂对哈维氏弧菌 TCBS-G 的体外抑制效果

由表 1 可见，纳米锌对 TCBS-G 的抑制作用最强，抑菌圈直径达 35 mm，其次是纳米银。这可能

表 1 不同抑制剂对哈维氏弧菌 TCBS-G 的体外抑制效果

<i>in vitro</i>		
抑制剂	抑菌圈/mm	敏感性
纳米锌	35	+++
大黄	—	—
公丁香	—	—
金钱草	—	—
苜蓿	—	—
车前草	12	++
石韦	—	—
黄芪	25	+++
桑叶	—	—
天蚕素	12	++
纳米银	25	+++
鸡血藤	10	++
五倍子	12	++
金银花	13	++
苏木	—	—
地锦	25	+++
艾草	3	+
黄芩	5	+
穿心莲	2	—

“+++”示极敏感；“++”示中度敏感；“+”示敏感；“—”示不敏感。

是纳米级的锌和银更容易参与到细菌的代谢过程中，从而其抑菌效果比单纯金属锌和单独金属银的更好。黄芪和地锦对 TCBS-G 表现出了极强的抑制效果，抑菌圈直接均达 25 mm，金银花、五倍子、鸡血藤的次之；石韦对 TCBS-G 表现出促生长现象。可见，中草药以其复杂的成分对 TCBS-G 产生了不同的作用。

2.2 最小抑菌浓度(MIC)检测结果

通过二倍稀释法测定优势抑制剂纳米锌、纳米银、黄芪、地锦、鸡血藤、天蚕素、车前草对 TCBS-G 的最小抑菌浓度分别为 12.5、6.25、12.5、12.5、25、25、25 mg/mL。

2.3 不同稀释比例和不同培育时间下哈维氏弧菌 TCBS-G 生物膜的形成情况

哈维氏弧菌 TCBS-G 起始浓度不同、培育时间不同，生物膜的形成量不同。在 590 nm 下通过分光光度计比色法获得其 OD 值，在稀释比 1 : 10 的情况下，36 h 的生物膜形成量最高， $OD_{590\text{ nm}}$ 为 0.527 9；在稀释比 1 : 100 时，48 h 的生物膜形成量最高， $OD_{590\text{ nm}}$ 为 0.586 8。对于生物膜的形成，并不是浓度越高生物膜的形成量就越高，生物膜的形成量与起始浓度和培育时间相关。本研究选取稀释比 1 : 100 和培育时间 48 h 进行后续试验。生物膜的形成也与哈维氏弧菌的致病机理有关，这方面还有待研究。

2.4 不同抑制剂对哈氏弧菌 TCBS-G 生物膜形成的影响

由表 2 可见，不同浓度抑制剂对 TCBS-G 生物膜形成产生不同的抑制效果。浓度越高，抑制效果越强。当质量浓度大于 3.125 mg/mL 时，纳米锌、纳米银对 TCBS-G 生物膜的形成产生了明显的抑制($P<0.05$)；当地锦、黄芪等的浓度大于 12.5 mg/mL 时，可对 TCBS-G 生物膜的形成产生抑制($P<0.05$)，不同的抑制剂的抑制效果不同。

表 2 不同抑制剂浓度下的 $OD_{540\text{ nm}}$

Table 2 Effects of different inhibitors on biofilm formation of TCBS-G

抑制剂	药物浓度/(mg·mL ⁻¹)	$OD_{540\text{ nm}}$
纳米锌	3.125	0.119
纳米银	3.125	0.122
黄芪	12.5	0.797
地锦	12.5	0.441
鸡血藤	12.5	0.658
天蚕素	12.5	0.490
车前草	12.5	0.551

2.5 30 种不同药物对致病菌的抑制效果

由表 3 可见, 复方新诺明、氯霉素、头孢他啶对 TCBS-G 产生了及其敏感的抑制效果, 透明抑菌

圈直径达 20 mm 以上; 诺氟沙星、哌拉西林等的抑制作用相对较弱。

表 3 30 种药物对菌株 TCBS-G 的抑制效果

Table 3 Inhibitory effects of antimicrobial agents on strains of TCBS-G

抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性	抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性	抗菌药物	抑菌圈直径/mm	敏感性
头孢拉定	—	—	克林霉素	—	—	诺氟沙星	12	++
头孢唑啉	8	+	麦迪霉素	6	+	氧氟沙星	10	++
头孢曲松	12	++	卡那霉素	10	++	环丙沙星	11	++
头孢他啶	20	+++	万古霉素	—	—	氨苄西林	—	—
头孢呋辛	—	—	庆大霉素	13	++	羧苄西林	—	—
头孢氨苄	—	—	新霉素	13	++	苯唑西林	—	—
头孢哌酮	18	++	多粘菌素	9	+	哌拉西林	15	++
青霉素	—	—	四环素	—	—	呋喃唑酮	—	—
红霉素	10	++	多西环素	—	—	丁胺卡那	10	++
氯霉素	23	+++	米诺环素	10	++	复方新诺明	23	+++

“+++”示极敏感; “++”示中度敏感; “+”示敏感; “—”示不敏感。

3 结论与讨论

目前, 在水产养殖中预防或治疗弧菌病主要使用抗生素类药物, 但治疗效果并不理想, 且抗生素的使用不仅使细菌产生耐药性, 还会严重破坏水体质量和生态环境, 进而对人体健康造成危害^[11]。通过中草药等绿色安全药物或饲料添加剂进行病害防控是水产养殖业发展的趋势和需要, 是药物与营养价值的结合。中草药具有杀菌、抗病毒、抗应激、促生长、提高免疫等多重作用, 且实际养殖过程中残留少, 不产生耐药性^[12-16]。本研究中发现, 不同中草药对中国对虾哈维氏弧菌 TCBS-G 产生的体外抑制作用不同, 黄芪、地锦产生了较强的抑菌作用, 能明显抑制 TCBS-G 的生长。这可能是因为不同中草药的主要活性成分不同, 不同活性成分与病原菌产生了不同的拮抗作用(其具体抑制机理有待研究)。饲料中添加锌对凡纳滨对虾养殖具有很强的促进作用^[17]。天蚕素抗菌肽具有杀菌效率高、稳定性好、免疫原性低、不易产生耐药性、产率高等优点, 是无毒、无害、无残留的绿色产品, 是新一代抗生素的替代品^[18], 本研究中天蚕素和纳米锌对 TCBS-G 均产生了明显的抑制作用, 实际应用中纳米锌和天蚕素的使用时间、使用剂量及应用方式等还有待研究。

哈维氏弧菌是水产养殖业的主要致病菌之一, 它在水体中主要以生物膜的形式生存。生物膜是细

菌聚集、粘结在一起分泌的黏性物质, 在环境中形成的一层黏膜状物质, 能保护细菌对抗外界侵犯, 增强其对抗菌药物的抵御能力^[19-20]。本实验室分离获得的哈维氏弧菌 TCBS-G 在生长过程中即形成生物膜, 不同抑制剂以其不同成分对 TCBS-G 生物膜形成发挥影响。纳米锌作为一种新材料, 比金属锌制剂发挥的作用更大。质量浓度 100 mg/mL 的纳米锌对 TCBS-G 生物膜的形成产生了极显著的抑制作用 ($P < 0.05$); 随着质量浓度的降低, 纳米锌对 TCBS-G 生物膜形成的抑制作用其减小, 当质量浓度小于 3.125 mg/mL 时, 纳米锌对 TCBS-G 生物膜的抑制作用与阴性对照组的差异无统计学意义。黄芪、地锦、鸡血藤等中草药液也抑制了 TCBS-G 生物膜的形成。

参考文献:

- [1] 王清印, 杨丛海. 中国对虾健康养殖的发展现状及展望[J]. 中国水产, 2005(1): 21-24. DOI:10.3969/j.issn.1002-6681.2005.01.013.
- [2] 牟海津, 李筠, 包振民, 等. 中国对虾养成期病害的细菌学分析[J]. 海洋学报(中文版), 1999, 21(1): 139-145.
- [3] 何苹萍, 赵永贞, 陈秀荔, 等. 凡纳滨对虾及养殖水体中弧菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 199-202. DOI:10.3969/j.issn.1002-1302.2013.06.073.
- [4] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 致病性哈氏弧菌生物学及分子特征[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(9): 1120-1124.

- [5] 刘迪. 水产养殖源哈维氏弧菌的流行特征与致病性差异分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- [6] 樊英, 王淑娴, 叶海斌, 等. 黄芪多糖对仿刺参非特异性免疫功能的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(6): 321–324. DOI:10.3969/j.issn.1003–1111.2010.06.003.
- [7] 王淑娴, 李天保, 樊英, 等. 茯苓多糖对刺参体腔液中免疫因子活性的影响[J]. 饲料研究, 2010(1): 59–61.
- [8] FAN Y, YU X, XU L, et al. Synergy of microcapsule polysaccharides and *Bacillus subtilis* on the growth, immunity and resistance of sea cucumber *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection[J]. Fisheries Science, 2013, 79(5): 807–814. DOI:10.1007/s12562–013–0644–3.
- [9] 吴增华. 几种中草药对大肠杆菌抑菌抗病作用及对绵羔羊的增重免疫实验研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [10] 黎家勤, 庞欢瑛, 简纪常, 等. 大黄和公丁香对致病性哈氏弧菌及其生物膜的体外抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(24): 8188–8190, 8202. DOI:10.3969/j.issn.0517–6611.2014.24.040.
- [11] 孙铭. 诺氟沙星在中国对虾养殖系统中的残留及风险评估[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.10.7666/d.y1927888.
- [12] 吴梅秀. 中草药在水产养殖业中的应用前景[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(2): 64–65. DOI:10.3969/j.issn.1004–6704.2008.02.023.
- [13] 文国樑, 林黑着, 李卓佳, 等. 饲料中添加复方中草药对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫相关酶活性的影响[J]. 南方水产科学, 2012, 8(2): 58–63. DOI:10.3969/j.issn.2095–0780.2012.02.009.
- [14] 王芸, 李健, 陈萍, 等. 复方中草药对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫功能的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(29): 109–114. DOI:10.3969/j.issn.1000–6850.2012.29.024.
- [15] 高国瑞, 潘鲁青, 黄辉, 等. 黄芪和黄连活性提取物对凡纳滨对虾代谢相关酶的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(6): 61–68. DOI:10.16441/j.cnki.hdxh.20160135.
- [16] 樊英, 李乐, 于晓清, 等. 免疫增强剂党参对仿刺参肠道菌群结构的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(2): 638–646. DOI:10.3969/j.issn.1006–267x.2015.02.037.
- [17] 张海涛. 锌源、锌水平对凡纳滨对虾生长性能、生化免疫指标及组织锌含量的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.
- [18] 宋理平, 胡斌, 王爱英, 等. 抗菌肽对凡纳滨对虾生长和机体免疫的影响[J]. 湛江: 广东海洋大学学报, 2010, 30(3): 28–32. DOI:10.3969/j.issn.1673–9159.2010.03.006.
- [19] COSTERTON J W, STEWART P S, GREENBERG E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
- [20] 向丽, 周铁军, 叶迎春, 等. 诃子鞣质对白色念珠菌及其生物被膜的影响[J]. 重庆医学, 2013, 42(2): 133–136. DOI:10.3969/j.issn.1671–8348.2013.02.005.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库