

中药石苦秦散及其有效成分对水禽源 细菌的体外抑菌效果

张亚楠¹, 徐景峨¹, 蒲 龄¹, 彭 珊², 田青青², 杨 莉¹, 王 鑫¹, 姜玲玲¹, 余 波¹

(1. 贵州省农业科学院 畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550005; 2. 贵州师范学院, 贵州 贵阳 550000)

摘要: 为研究中药复方制剂石苦秦散及其主要活性成分单体对水禽源多重耐药菌株的体外抑菌效果, 采用 K-B 法对试验菌株进行耐药性检测, 并采用微量肉汤二倍稀释法和琼脂平板培养计数法研究石苦秦散及其 6 种主要活性成分单体对鸭疫里氏杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌 5 种细菌的体外抑菌作用和杀菌作用。结果显示, 90% 的分离株为多重耐药菌株, 肠杆菌属的大肠杆菌和沙门氏菌分离株耐药性最强, 耐药种数均高于 8 种。石苦秦散对 5 种细菌的最小抑菌浓度 (MIC) 介于 1.95~62.50 g/L, 最小杀菌浓度 (MBC) 介于 1.95~125.00 g/L; 其中, 对鸭疫里氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的 MIC 较低, 介于 1.95~15.63 g/L。6 种中药单体中, 抑菌能力最强的为秦皮乙素, 其次为苦参碱、没食子酸; 6 种中药单体杀菌效果存在较大差异, 当质量浓度达到 31.25 g/L 时, 没食子酸能杀死所有供试菌株, 整体杀菌效果优于其他 5 种单体; 6 种中药单体对鸭疫里氏杆菌的 MIC 和 MBC 均小于其他菌株。由此可见, 石苦秦散对供试的 5 种细菌均有抑菌作用和杀菌作用, 其中对鸭疫里氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的效果最好; 6 种中药单体对鸭疫里氏杆菌的抑菌效果和杀菌效果均优于其他菌种。

关键词: 石苦秦散复方制剂; 鸭疫里氏杆菌; 多杀性巴氏杆菌; MIC; MBC

中图分类号: S853.73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2020)01-0128-09

Antibacterial Activity *in Vitro* of Shikuqin Powder and Its Active Ingredients against Waterfowl-origin Bacteria

ZHANG Ya'nan¹, XU Jing'e¹, PU Ling¹, PENG Shan², TIAN Qingqing², YANG Li¹,
WANG Xin¹, JIANG Lingling¹, YU Bo¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guizhou Academy of Agricultural Sciences,
Guiyang 550005, China; 2. Guizhou Education University, Guiyang 550000, China)

Abstract: In order to study the antibacterial activity *in vitro* of Shikuqin powder and its main active component monomers on waterfowl-origin multidrug-resistant strains, in this study, K-B method was used to detect the antibacterial agent resistance of the tested strains. Double dilution method of micro broth and agar plate culture counting method were used to investigate the antibacterial activity or bactericidal activity of Shikuqin powder and its main active component monomers on *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus*. The results showed that 90% of the isolates were multi-drug resistant strains. *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates of *Enterobacter* were the most antibiotic resistant strains, and the number of antibiotic-resistant strains was higher than 8 kinds. The

收稿日期: 2019-06-10

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2019] 2287 号); 贵州省农业科技攻关项目 (黔科合 NY [2015] 3009-2 号); 贵州省重大科技专项 (黔科合重大专项字 [2013] 6014 号); 国家水禽产业技术体系贵阳综合试验站项目 (CARS-42-53); 贵州省农科院创新专项 (黔农科院科技创新 [2017] 03 号)

作者简介: 张亚楠 (1989-), 女, 山东枣庄人, 研究实习员, 硕士, 主要从事兽医微生物耐药性研究。

E-mail: 247057465@qq.com

通信作者: 余 波 (1982-), 男, 四川邻水人, 副研究员, 硕士, 主要从事兽医分子生物学研究。E-mail: yubonky@163.com

MICs of Shikuqin powder for five kinds of bacteria ranged from 1.95 g/L to 62.50 g/L, and MBCs ranged from 1.95 g/L to 125.00 g/L. The MICs of Shikuqin powder for *Riemerella anatipestifer* and *Pasteurella multocida* were lower, ranging from 1.95 g/L to 15.63 g/L. Among the six Chinese herbal monomers, esculetin was the strongest, followed by matrine and gallic acid. The bactericidal efficacy of the six Chinese herbal monomers varied greatly. When the concentration reached 31.25 g/L, gallic acid could kill all the tested strains, and the overall bactericidal efficacy was better than the other five monomers. The MIC and MBC of the six Chinese herbal monomers against *Riemerella anatipestifer* were lower than those of other strains. It can be seen that Shikuqin powder has antibacterial effect on these five kinds of bacteria, among which the bacteriostasis effect on *Riemerella anatipestifer* and *Pasteurella multocida* is the best. The bacteriostatic and bactericidal effects of six Chinese herbal monomers on *Riemerella anatipestifer* were superior to those of other strains.

Key words: Shikuqin powder; *Riemerella anatipestifer*; *Pasteurella multocida*; MIC; MBC

鸭疫里氏杆菌、大肠杆菌、多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌是引起水禽细菌性疾病的常见致病菌^[1-4]。由于致病菌往往具有较多的血清型,且各血清型间无明显的交叉保护现象,导致疫苗在预防细菌性疾病上效果欠佳^[1,5-6]。抗菌药物治疗是控制细菌病的常用方法,同时也是控制细菌病流行性暴发的重要途径。但是,由于细菌病发病时间不固定、频率高,养殖场往往擅自使用高浓度抗菌药物进行预防和治疗细菌性疾病,导致细菌产生严重的耐药性和抗菌药物残留,给养殖业和人类健康带来危害^[7-8]。

目前,中药制剂作为抗生素替代品的研发成为研究热点。中药制剂具有广谱抗菌抗病毒、提高机体免疫力、不易产生耐药性、残留小等方面的特点^[9-10]。中药五倍子及单体没食子酸(即五倍子酸)对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌均有较好的抑制作用^[10-11]。鞣花酸对大肠杆菌、沙门氏菌有较好的抑制作用^[12],秦皮乙素对产KPC型碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌具有一定的抑制作用^[13]。鉴于此,将石榴皮、苦参、秦皮配伍使用,经提取和喷雾干燥制得的中药复方制剂石苦秦散,对猪源大肠杆菌具有较好的抑菌效果, MIC 和 MBC 分别介于 7.81~15.63 g/L 和 15.63~31.25 g/L^[9]。但是,中药制剂对水禽源多重耐药菌株的抑菌效果及杀菌效果研究相对较少。为此,探究石苦秦散及其6种主要活性成分(苦参碱、氧化苦参碱、秦皮甲素、秦皮乙素、鞣花酸、没食子酸)单体对引起水禽疾病的常见菌种(鸭疫里氏杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌)的抑菌作用,综合评价中药复方制剂石苦秦散对水禽源细菌病治疗效果,为石苦秦散治疗畜禽常见细菌性疾病提供理论依据,以期“减抗化”生态养殖的发展提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 大肠杆菌 ATCC[®] 25922 标准株、沙门氏菌 ATCC[®] 13076 标准株、金黄色葡萄球菌 ATCC[®] 6538 标准株均由贵州省畜牧兽医研究所兽用中草药研究室保存。5株鸭疫里氏杆菌、5株鸭源大肠杆菌、2株鸭源多杀性巴氏杆菌、2株鸭源沙门氏菌均由贵州省畜牧兽医研究所畜禽疫病研究室分离保存。菌株具体信息见表1。

1.1.2 试剂与培养基 21种细菌药敏纸片均购自杭州滨和微生物试剂有限公司。二甲基亚砜(DMSO)、无水乙醇、甲醇等购自广州化学试剂厂。秦皮甲素、秦皮乙素、没食子酸、鞣花酸、苦参碱、氧化苦参碱均购自西安开来生物工程有限公司。石苦秦散(包装规格:100 g/袋;由石榴皮、苦参、秦皮经水提后喷雾干燥制得,批号:20180520)由贵州省农业科学院畜牧兽医研究所、成都乾坤动物药业有限公司合作提供。

水解酪蛋白肉汤(MH broth)、水解酪蛋白琼脂(MH agar)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD)、沙门氏菌显色培养基(CHRO magar *Salmonella* agar)、麦康凯琼脂(Mac conkey agar)、甘露醇琼脂、胰蛋白胍大豆琼脂培养基(Tryptic soy agar, TSA)、胰蛋白胍大豆肉汤(Tryptic soy broth, TSB)等均购自广州环凯微生物科技有限公司。酵母提取粉(Yeast extract)购自英国OXOID公司。新生牛血清购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 药液制备 将每种中药单体及石苦秦散复方制剂用相应的溶剂溶解,再加灭菌超纯水定容,配制成一定质量浓度的母液,灭菌后置4℃冰箱保存备用。药物配制所用溶剂和稀释剂见表2。

表 1 14 株鸭源分离株的信息
Tab.1 Information of 14 isolates from duck farms

菌种	菌株编号	分离时间/(年-月-日)	分离部位
Bacteria name	Strain number	Separation time/(Year-month-day)	Separation location
鸭疫里氏杆菌	RASS1	2019-03-29	三穗鸭脑
<i>Riemerella anatipestifer</i>	RASS3	2019-03-29	三穗鸭肝
	RAGY04	2017-06-01	贵阳鸭脑
	RAGY06	2017-06-01	贵阳鸭脑
	RAHS01	2018-04-27	惠水鸭脑
	EC5	2018-11-13	长顺鸭脑
大肠杆菌	EC9	2018-11-13	长顺鸭肝
<i>Escherichia coli</i>	EC28	2018-04-27	惠水鸭脑
	EC32	2018-04-27	惠水鸭脑
	ECSS7	2019-03-29	三穗鸭肝
巴氏杆菌	PmSS2	2019-03-07	三穗鸭心
<i>Pasteurella multocida</i>	PmSS5	2019-03-07	三穗鸭肝
沙门氏菌	SA1	2019-03-29	三穗鸭肛拭子
<i>Salmonella</i>	SA4	2019-04-15	鹅肛拭子

表 2 石苦秦散及其主要活性成分单体的配制
Tab.2 The preparation of Shikuqin powder and its main active component monomers

中药	溶剂	稀释剂
Chinese medicine	Solvent	Diluent
秦皮甲素 Esculin	DMSO(最终体积分数<10%)	无菌水或肉汤
秦皮乙素 Esculetin	DMSO(最终体积分数<10%)	无菌水或肉汤
苦参碱 Matrine	甲醇(最终体积分数<10%)	无菌水或肉汤
氧化苦参碱 Oxymatrine	甲醇(最终体积分数<10%)	无菌水或肉汤
没食子酸 Gallie acid	乙醇(最终体积分数<10%)	无菌水或肉汤
鞣花酸 Ellagic acid	0.2 mol/L NaOH 溶液	无菌水或肉汤
石苦秦散 Shikuqin powder	甲醇(最终体积分数<10%)	无菌水或肉汤

1.2.2 菌液制备 将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌接种于含 MH 液体培养基的试管中,置于 37℃、200 r/min 条件下培养 12 h。将多杀性巴氏杆菌接种于含 MH 液体培养基(含 5%血清)的试管中,置于 37℃、200 r/min 条件下培养 18 h。将鸭疫里氏杆菌接种于含 TSB 液体培养基(含 0.5%酵母提取物、5%血清)的试管中,置于 37℃、200 r/min 条件下培养 18 h。分别用其相应的液体培养基调整菌液的 OD₆₀₀ 为 0.8,再用培养基稀释 1 000 倍,相当于菌液浓度为 10⁵~10⁶ cfu/mL,备用。

1.2.3 耐药表型的测定 参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and laboratory standards institute, CLSI)的指导原则,采用药敏纸片法检测本研究中所用的 3 株标准株和 14 株分离株对 21 种抗菌药物的敏感性。其中,以大肠杆菌 ATCC[®] 25922 作为质控菌株。大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌所用培养基为 MH 琼脂平板;多杀性巴氏杆菌所用培养基为加 5%新生牛血清的 MH 琼脂平板;鸭疫里氏杆菌所用培养基为加 5%新生牛血清的 TSA 琼脂平板。

由于缺少 CLSI 批准的适合鸭疫里氏杆菌的药

物敏感折点值,受试药物的质控范围及敏感折点值判断标准主要参考 CLSI 动物源细菌药敏试验标准和人医 CLSI 细菌药敏试验标准规定的适用于大肠杆菌的判定标准。药敏试验结果参考 CLSI 规定的敏感(Susceptible, S)、中介(Intermediate, I)、耐药(Resistance, R)折点值范围判断结果。

1.2.4 最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用微量肉汤二倍稀释法,于无菌 96 孔板每一孔中均加入 100 μL 肉汤,再分别向第一孔中加入 100 μL 配备好的药液,混匀后依次倍比稀释,直到最后一孔混匀后弃去 100 μL 混合液。每孔加入配备好的 100 μL 细菌稀释液。同时设置阳性对照组(加菌不加药)和阴性对照组(不加菌不加药)。此外,在正式试验之前还需设置有机溶剂对照组,即对每株菌进行有机溶剂的对照试验,将药液换成有机溶剂(甲醇、乙醇和 DMSO),从而测定能保证所有供试菌株存活的最大溶剂含量,以便制备药液所用的溶剂含量远低于此值。37℃恒温培养 24 h 后取出,观察细菌生长情况。每组试验至少重复 3 次。

采用 TTC 法对 MIC 结果进行判定。向上述培养 24 h 后的 96 孔板每孔分别加入 20 μL 0.5%的

2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC), 37 ℃ 避光培养 2 h, 观察菌液的颜色变化。试验组眼观溶液澄清、颜色未发生变化的最低药物质量浓度则作为该药的 MIC。

1.2.5 最小杀菌浓度 (MBC) 的测定 将上述试验组澄清的各孔中液体取 100 μL 涂布于相应的营养培养基上, 于 37 ℃ 培养 48 h 观察结果。以肉眼观察无菌落生长的最低药物质量浓度为其 MBC。

2 结果与分析

2.1 临床分离株耐药表型

以大肠杆菌 ATCC® 25922 作为质控菌株, 选用的药敏纸片均在质控范围内。沙门氏菌 ATCC® 13076 除对林可胺类抗生素克林霉素耐药外, 对其余 20 种药均敏感; 金黄色葡萄球菌 ATCC® 6538 对

所选用的 21 种药物均敏感, 沙门氏菌 ATCC® 13076 和金黄色葡萄球菌 ATCC® 6538 作为敏感对照组。检测到 14 株临床分离株除 PmSS5 外, 其余均为多重耐药株。肠杆菌属的大肠杆菌和沙门氏菌分离株耐药性较强, 耐药种数最多, 均高于 8 种, 其中 EC-SS7 耐药种数高达 13 种; 其次是鸭疫里氏杆菌, 耐药种数介于 5~8 种, 主要是对氨基糖苷类耐药严重。2 株水禽源多杀性巴氏杆菌较为敏感, PmSS5 仅对克林霉素和人工合成的抗菌药磺胺异恶唑耐药。克林霉素适用于革兰氏阳性菌引起的各种感染性疾病, 对革兰氏阴性菌作用效果差, 通常用于治疗厌氧细菌以及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的感染。磺胺类药物为比较老的人工合成抗菌药物, 14 株分离株均对其耐药 (表 3、4)。

表 3 14 株分离株对 21 种抗菌药物的耐药情况

Tab. 3 Resistance of 14 isolates to 21 antibiotics

药敏纸片 Drug sensitive slip	菌株编号 Strain number							
	RASS1	RASS3	RAGY04	RAGY06	RAHS01	EC5	EC9	EC28
氨苄西林 Ampicillin	S	R	S	S	S	R	R	R
头孢噻肟 Cefotaxime	S	S	S	R	S	R	S	S
头孢他啶 Ceftazidime	S	S	I	S	S	S	S	S
头孢西丁 Cefoxitin	S	S	S	S	S	S	S	S
阿莫西林 Amoxicillin	S	R	S	S	S	R	R	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	I	S	R	S	R	I	S	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	S	S	R	R	I	S	S
左氟沙星 Levofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S
阿米卡星 Amikacin	I	S	R	R	R	S	S	S
庆大霉素 Gentamicin	R	S	R	R	I	S	S	S
卡那霉素 Kanamycin	R	I	R	R	R	R	S	S
新霉素 Neomycin	R	R	R	I	I	R	S	S
链霉素 Streptomycin	S	S	I	S	S	I	R	I
四环素 Tetracycline	I	S	I	I	I	R	R	R
强力霉素 Doxycycline	I	I	S	I	I	R	R	R
氯霉素 Chloramphenicol	S	S	S	S	S	R	R	R
氟苯尼考 Florfenicol	S	S	S	S	S	R	R	R
红霉素 Erythromycin	I	I	I	I	I	R	I	S
克林霉素 Clindamycin	R	R	R	R	R	S	I	R
多黏菌素 B Polymyxin B	R	S	R	R	R	S	S	S
磺胺异恶唑 Sulfamethoxazole	R	R	R	R	R	R	R	R

药敏纸片 Drug sensitive slip	菌株编号 Strain number							
	EC32	ECSS7	PmSS2	PmSS5	SA1	SA4	13076	6538
氨苄西林 Ampicillin	R	R	S	S	R	R	S	S
头孢噻肟 Cefotaxime	S	R	S	S	S	R	S	S
头孢他啶 Ceftazidime	S	S	S	S	S	R	S	S
头孢西丁 Cefoxitin	S	S	S	S	S	S	S	S
阿莫西林 Amoxicillin	R	R	S	S	R	R	S	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	S	R	S	S	I	I	S	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	R	S	S	S	S	S	S
左氟沙星 Levofloxacin	S	I	R	S	S	S	S	S
阿米卡星 Amikacin	S	S	S	S	I	S	S	S
庆大霉素 Gentamicin	S	S	S	S	I	S	S	S
卡那霉素 Kanamycin	S	R	S	S	R	S	S	S

续表 3 14 株分离株对 21 种抗菌药物的耐药情况

Tab. 3(Continued) Resistance of 14 isolates to 21 antibiotics

药敏纸片 Drug sensitive slip	菌株编号 Strain number							
	EC32	ECSS7	PmSS2	PmSS5	SA1	SA4	13076	6538
新霉素 Neomycin	I	R	R	I	R	S	S	S
链霉素 Streptomycin	R	I	S	S	S	S	S	S
四环素 Tetracycline	R	R	S	S	R	R	S	S
强力霉素 Doxycycline	R	R	S	I	R	R	S	S
氯霉素 Chloramphenicol	R	R	S	S	I	S	S	S
氟苯尼考 Florfenicol	R	R	S	S	R	S	S	S
红霉素 Erythromycin	I	I	S	S	I	I	S	S
克林霉素 Clindamycin	S	R	R	R	R	R	R	S
多黏菌素 B Polymyxin B	S	S	S	S	S	S	S	S
磺胺异恶唑 Sulfamethoxazole	R	R	R	R	R	R	S	S

注:S 为敏感,I 为中介,R 为耐药。
Note:S is susceptible,I is intermediate and R is resistance.

表 4 14 株分离株的耐药表型及耐药种数

Tab. 4 Resistant phenotype and Resistant species of 14 isolates

菌株编号 Strain number	耐药种数 Resistant species	药物 Drug
EC5	11	氨苄西林、头孢噻肟、阿莫西林、卡那霉素、新霉素、四环素、强力霉素、氯霉素、氟苯尼考、红霉素、磺胺异恶唑
EC9	8	氨苄西林、阿莫西林、链霉素、四环素、强力霉素、氯霉素、氟苯尼考、磺胺异恶唑
EC28	8	氨苄西林、阿莫西林、四环素、强力霉素、氯霉素、氟苯尼考、克林霉素、磺胺异恶唑
EC32	8	氨苄西林、阿莫西林、链霉素、四环素、强力霉素、氯霉素、氟苯尼考、磺胺异恶唑
ECSS7	13	氨苄西林、头孢噻肟、阿莫西林、恩诺沙星、环丙沙星、卡那霉素、新霉素、四环素、强力霉素、氯霉素、氟苯尼考、克林霉素、磺胺异恶唑
SA1	9	氨苄西林、阿莫西林、卡那霉素、新霉素、四环素、强力霉素、氟苯尼考、克林霉素、磺胺异恶唑
SA4	8	氨苄西林、头孢噻肟、头孢他啶、阿莫西林、四环素、强力霉素、克林霉素、磺胺异恶唑
RASS1	6	庆大霉素、卡那霉素、新霉素、克林霉素、多黏菌素 B、磺胺异恶唑
RASS3	5	氨苄西林、阿莫西林、新霉素、克林霉素、磺胺异恶唑
RAGY04	8	恩诺沙星、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、克林霉素、多黏菌素 B、磺胺异恶唑
RAGY06	8	头孢噻肟、环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、克林霉素、多黏菌素 B、磺胺异恶唑
RAHS01	7	恩诺沙星、环丙沙星、阿米卡星、卡那霉素、克林霉素、多黏菌素 B、磺胺异恶唑
PmSS2	4	左氟沙星、新霉素、克林霉素、磺胺异恶唑
PmSS5	2	克林霉素、磺胺异恶唑

2.2 石苦秦散及 6 种主要活性成分单体的抑菌作用

由表 5 可知,石苦秦散及 6 种单体对 17 株细菌均有抑菌作用。石苦秦散对 17 株细菌的 MIC 介于 1.95~62.50 g/L;其中,对鸭疫里氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的 MIC 介于 1.95~15.63 g/L;对大肠杆菌、沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌的抑菌效果相对弱一些,MIC 介于 15.63~62.50 g/L。

由图 1 可看出,6 种单体抑菌能力最强的为秦皮乙素,其次为苦参碱、没食子酸。苦参碱除对金黄色葡萄球菌 6538 的 MIC(15.63 g/L)较高外,其余均低于 7.81 g/L。氧化苦参碱除对鸭疫里氏杆菌的 MIC 相对较低,介于 3.91~15.63 g/L,对其余 4 种细菌的 MIC 均大于 31.25 g/L。可见,氧化苦参碱的抑菌作用明显弱于苦参碱。秦皮甲素对革兰氏阳

性菌金黄色葡萄球菌的 MIC 高于另外 4 种革兰氏阴性菌,且对鸭疫里氏杆菌的抑菌作用最强,MIC 介于 3.91~7.81 g/L。秦皮乙素对革兰氏阴性菌的抑菌效果也强于革兰氏阳性菌,且对 4 种革兰氏阴性菌的 MIC 均小于 1.95 g/L。没食子酸对鸭疫里氏杆菌和多杀性巴氏杆菌表现出较强的抑菌效果,对鸭疫里氏杆菌的 MIC 介于 0.03~0.98 g/L,对多杀性巴氏杆菌的 MIC 为 1.95 g/L。鞣花酸对不同种属菌株的抑菌作用存在较大差异,对鸭疫里氏杆菌的抑菌效果最好,MIC 介于 0.49~1.95 g/L;鞣花酸对同种菌属的不同细菌也存在差异,如大肠杆菌 25922、ECSS7 的 MIC 分别为 0.98 g/L 和 0.49 g/L,而其他 4 株大肠杆菌的 MIC 均高于 31.25 g/L。

大肠杆菌 ATCC® 25922 标准株为敏感株,和其他多重耐药大肠杆菌相比 MIC 区别不大,说

明石苦秦散及 6 种单体的抑菌作用与菌株的敏感程度无关。沙门氏菌 ATCC[®] 13076、金黄色葡萄球菌 ATCC[®] 6538、多杀性巴氏杆菌分离株 PmSS5 均为敏感株,和其他耐药菌株相比未表现出较低的 MIC。

2.3 石苦秦散及其 6 种主要活性成分单体的杀菌作用

由表 5 可知,石苦秦散及其 6 种单体对 17 株细菌均有杀菌效果。石苦秦散对 17 株菌的 MBC 介于 1.95~125.00 g/L。6 种单体体外杀菌试验结果表明,当质量浓度达到 31.25 g/L 时,没食子酸能杀死

所有供试菌株,整体杀菌效果优于其他 5 种单体(图 2)。氧化苦参碱、鞣花酸、秦皮甲素、秦皮乙素 4 种单体对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌杀菌效果相对弱一些,MBC 为 125.00 g/L。秦皮乙素、没食子酸对多杀性巴氏杆菌的 MBC 和 MIC 相等,分别为 0.12 g/L 和 1.95 g/L,说明这 2 种中药单体对多杀性巴氏杆菌的抑菌效果和杀菌效果相同。石苦秦散复方制剂和 6 种中药单体对 5 株鸭疫里氏杆菌的 MBC 和 MIC 均相差不大,且均低于其他菌株,说明这些中药对鸭疫里氏杆菌的抑菌效果和杀菌效果相对较好。

表 5 石苦秦散及其 6 种主要活性成分单体的抑菌/杀菌效果

Tab. 5 Antibacterial/Bactericidal activity of Shikuqin powder and monomers of six main active components g/L

菌株编号 Strain number	石苦秦散 Shikuqin powder		苦参碱 Matrine		氧化苦参碱 Oxymatrine		鞣花酸 Ellagic acid	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
25922	15.63	15.63	3.91	15.63	31.25	125.00	0.98	125.00
EC5	31.25	62.50	7.81	15.63	62.50	125.00	62.50	125.00
EC9	31.25	62.50	7.81	15.63	62.50	125.00	62.50	125.00
EC28	31.25	31.25	3.91	62.50	62.50	125.00	31.25	125.00
EC32	31.25	62.50	7.81	15.63	62.50	125.00	62.50	125.00
ECSS7	15.63	15.63	3.91	31.25	31.25	125.00	0.49	125.00
13076	31.25	31.25	3.91	7.81	31.25	62.50	1.25	125.00
SA1	31.25	125.00	3.91	15.63	62.50	125.00	31.25	125.00
SA4	62.50	62.50	3.91	31.25	62.50	125.00	62.50	125.00
6538	31.25	125.00	15.63	62.50	62.50	125.00	15.63	125.00
RASS1	15.63	15.63	3.91	15.63	15.63	31.25	51.95	1.95
RASS3	3.91	3.91	3.91	3.91	7.81	7.81	1.95	1.95
RAGY04	1.95	1.95	3.91	3.91	7.81	7.81	0.49	0.49
RAGY06	1.95	1.95	3.91	3.91	3.91	3.91	0.98	1.95
RAHS01	3.91	7.81	7.81	7.81	15.63	15.63	31.95	1.95
PmSS2	15.63	31.25	7.81	7.81	31.25	31.25	31.25	31.25
PmSS5	7.81	62.50	7.81	31.25	31.25	125.00	15.63	125.00
菌株编号 Strain number	秦皮甲素 Esculin hydrate		秦皮乙素 Esculetin		没食子酸 Gallic acid			
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC		
25922	15.63	125.00	0.49	125.00	7.81	15.63		
EC5	15.63	125.00	0.98	62.50	7.81	15.63		
EC9	15.63	125.00	0.98	125.00	7.81	15.63		
EC28	15.63	125.00	0.49	125.00	7.81	31.25		
EC32	15.63	125.00	0.49	125.00	7.81	15.63		
ECSS7	15.63	125.00	0.98	62.50	7.81	15.63		
13076	15.63	125.00	1.95	125.00	7.81	15.63		
SA1	15.63	125.00	0.98	125.00	7.81	15.63		
SA4	15.63	125.00	0.98	125.00	7.81	15.63		
6538	31.25	125.00	15.63	125.00	7.81	31.25		
RASS1	7.81	7.81	0.12	0.12	0.24	15.63		
RASS3	3.91	3.91	0.12	0.12	0.98	0.98		
RAGY04	7.81	7.81	0.06	0.06	0.03	0.03		
RAGY06	1.95	1.95	0.03	0.03	0.24	0.24		
RAHS01	7.81	62.50	0.06	0.49	0.49	0.98		
PmSS2	15.63	31.25	0.12	0.12	1.95	1.95		
PmSS5	15.63	125.00	0.12	0.12	1.95	1.95		

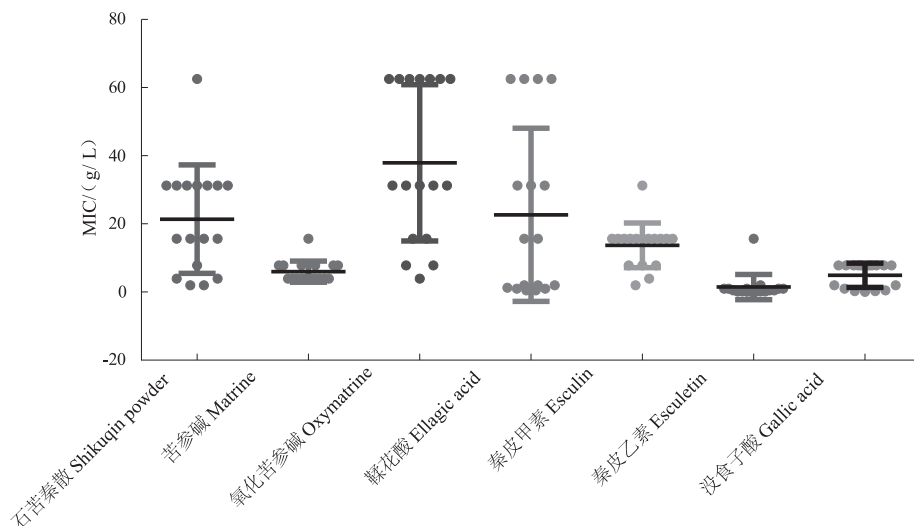


图 1 石苦秦散及 6 种有效成分单体对 17 株细菌的 MIC 分布

Fig. 1 MIC of Shikuqin powder and monomers of six main active components

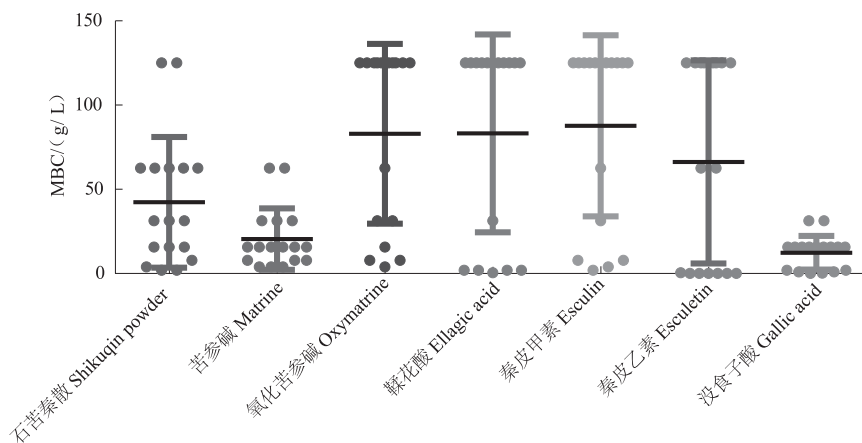


图 2 石苦秦散及 6 种有效成分单体对 17 株细菌的 MBC 分布

Fig. 2 MBC of Shikuqin powder and monomers of six main active components

3 结论与讨论

目前,治疗水禽细菌性疾病主要是使用抗生素,然而不合理的使用加剧了多重耐药菌株的出现^[14-15]。本研究所用的 14 株分离株,90%为多重耐药菌株,肠杆菌属的大肠杆菌和沙门氏菌分离株最为耐药,耐药种数最多,均高于 8 种,其中大肠杆菌 ECSS7 耐药种数高达 13 种,鸭疫里氏杆菌的耐药种数介于 5~8 种,可见水禽源细菌耐药性普遍严重,为水禽源细菌病的治疗带来很大难题。当前我国正在实施退出行动、减抗行动。减抗初期会导致治疗抗菌药用量增加、养殖生产性能下降以及食品动物感染性疾病发病率增加^[16],如何安全度过减抗期,发挥我国传统中药的优势,寻找新的抗生素替代物且不产生耐药成为防治细菌性疾病的新途径。

本研究发现,中药复方制剂石苦秦散对鸭疫里

氏杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌均有抑菌作用和杀菌作用,MIC 介于 1.95~62.50 g/L,MBC 介于 1.95~125.00 g/L。YU 等^[9]报道的石苦秦散对仔猪腹泻型大肠杆菌的 MIC 与 MBC 分别为 7.81~15.63 g/L、15.63~31.25 g/L,与本研究,石苦秦散对多重耐药的大肠杆菌的 MIC 和 MBC 较为接近,说明石苦秦散对大肠杆菌普遍具有良好的抗菌效果。此外,石苦秦散对鸭疫里氏杆菌抑菌效果和杀菌效果明显优于其他菌株,MIC 与 MBC 较低,且均介于 1.95~15.63 g/L,在临床上具有很高的应用价值^[17]。由于鸭疫里氏杆菌极易产生耐药性,寻求新的、安全可靠的治疗方法是必要的。

6 种中药单体中,抑菌能力最强的为秦皮乙素,除对金黄色葡萄球菌 6538 的 MIC 较高(15.63 g/L),对其余 16 株菌的 MIC 介于 0.03~1.95 g/L。但是,秦

皮乙素的杀菌效果因菌种不同而存在差异,其对鸭疫里氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的杀菌效果较好, MBC 介于 0.03~0.49 g/L;而对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的 MBC 均高于 62.50 g/L。值得注意的是,秦皮甲素和秦皮乙素对大肠杆菌都具有较好抑菌作用, MIC 分别为 15.63 g/L 和 0.49~0.98 g/L,这和 DUNCAN 等^[18]报道的秦皮甲素和秦皮乙素能够减少动物肠道中大肠杆菌数量相符。但是秦皮甲素和秦皮乙素对大肠杆菌的 MBC 分别为 125.00 g/L 和 62.50~125.00 g/L,说明杀菌效果欠佳,这可能与大肠杆菌某些血清型有一定的关系。在 6 种中药单体杀菌效果试验中,对 5 种供试菌杀菌效果最好的为没食子酸,当浓度达到 31.25 g/L 时,没食子酸能杀死所有供试菌株,整体杀菌效果优于其他 5 种单体。其中,没食子酸对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 分别为 7.81 g/L 和 31.25 g/L,这与 LIU 等^[19]的报道相符。

本研究中,中药单体秦皮乙素、没食子酸以及鞣花酸对鸭疫里氏杆菌均表现出良好的抑菌效果和杀菌效果, MIC 为 0.03~0.12 g/L、0.03~0.98 g/L 和 0.49~1.95 g/L, MBC 与 MIC 相差不大,这些中药单体为开发治疗传染性浆膜炎药品提供了一个新的思路。鸭疫里氏杆菌本身具有产膜能力,而没食子酸通过抑制细菌生物膜主要成分多糖的合成来抑制其形成,从而起到杀菌的效果^[20]。同时,中药单体秦皮乙素、没食子酸对多杀性巴氏杆菌的 MBC 和 MIC 相同且较低,分别为 0.12 g/L 和 1.95 g/L,在临床上具有一定的使用价值,也为禽霍乱的治疗提供了新的思路。

此外,本研究还表明,石苦秦散复方制剂和 6 种中药单体的抑菌作用或杀菌作用,均与菌株对抗生素的敏感程度无关,这对中药制剂控制细菌耐药性提供了可能。

参考文献:

- [1] PATHANASOPHON P, SAWADA T, TANTICHAROENYOS T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand[J]. Avian Pathol, 1995, 24(1):195-199.
- [2] 杨泽晓,周香,王印,等.肉鹅巴氏杆菌病的诊治[J]. 动物医学进展, 2013, 34(1):119-122.
YANG Z X, ZHOU X, WANG Y, et al. Diagnosis and treatment of goose *Pasteurellosis* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(1):119-122.
- [3] 齐静,王守荣,李兰波,等.山东省肉鸭沙门氏菌的分

离鉴定及敏感抗菌药物的筛选[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(7):216-220.

- QI J, WANG S R, LI L B, et al. Isolation and identification of duck *Salmonella* and screening of sensitive antimicrobials in Shandong Province[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 41(7):216-220.
- [4] CHEN Y P, LEE S H, CHOU C H, et al. Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158:325-331.
- [5] RUBBENSTROTH D, RYLL M, HOTZEL H, et al. Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica), and emended descriptions of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina* [J]. International Journal of Systemtic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63:280-287.
- [6] 熊文广. 抗生素耐药基因在动物肠道中的排布和在微环境中的消减规律[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
XIONG W G. Arrangement and distribution of antibiotic resistance genes in animal intestine and its dissipation in microcosm environment[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [7] HUIJBERS P M, BLAAK H, DEJONG M C, et al. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: A review[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20):11993-12004.
- [8] YU B, CHEN X X, JIANG L L, et al. Acute and subchronic toxicity and the evaluation of safety pharmacology of Chinese herbal compound preparation "Shikuqin" [J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31(6):2855-2862.
- [9] YU B, YU J K, JIANG L L, et al. Antibacterial, antidiarrheal, anti-inflammatory and analgesic activities of compound Shikuqin powder[J]. Pak J Pharm Sci, 2019, 32(3):1333-1342.
- [10] 杨林花,陈胜昌,乔艳龙,等.苗药对 3 种常见致病菌体外抑菌效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(10):2910-2917.
YANG L H, CHEN S C, QIAO Y L, et al. Bacteriostasis in vitro of Miao national herbs against three common pathogens[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 45(10):2910-2917.
- [11] 许维国,刘洋,刘多见,等.没食子酸抑菌活性分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(10):1329-1331.
XU W G, LIU Y, LIU D J, et al. Antimicrobial activity of galic acid [J]. Chin J Public Health, 2012, 28(10):1329-1331.

- [12] 李小萍. 红树莓果中鞣花酸的提取、纯化及抗氧化性和抑菌活性的初步研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- LI X P. Study on extraction, refining and oxidation-resistant and antimicrobial effects of ellagic acid from red raspberry [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2010.
- [13] 王蕾, 刘志远, 潘健, 等. 秦皮乙素对产 KPC 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌效果 [J]. 检验医学与临床, 2017, 14(23): 3483-3486.
- WANG L, LIU Z Y, PAN J, *et al.* Effect of esculetin inhibiting for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* [J]. Lab Med Clin, 2017, 14(23): 3483-3486.
- [14] HOLMES A H, MOORE L S, SUNDSFJORD A, *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance [J]. The Lancet, 2016, 387: 176-187.
- [15] CASEWELL M, FRIIS C, MARCO E, *et al.* The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(2): 159-166.
- [16] 李莉, 殷中琼, 贾仁勇, 等. 16 种中药提取物对副猪嗜血杆菌的体外抗菌活性分析 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(8): 1324-1327.
- LI L, YIN Z Q, JIA R Y, *et al.* Atimicrobial activity *in vitro* of 16 kinds of traditional Chinese medicine extracts against *Haemophilus parasuis* [J]. Chin J Vet Sci, 2014, 34(8): 1324-1327.
- [17] SUN N, LIU J H, YANG F, *et al.* Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 158: 376-383.
- [18] DUNCAN S H, LEITCH E C, STANLEY K N, *et al.* Effects of esculin and esculetin on the survival of *Escherichia coli* O157 in human faecal slurries, continuous-flow simulations of the rumen and colon and in calves [J]. British Journal of Nutrition, 2004, 91(5): 749-755.
- [19] LIU M H, WU X X, LI J K, *et al.* The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon [J]. Food Control, 2016, 73: 613-618.
- [20] HU Q, HAN X, ZHOU X, *et al.* Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer* [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 156: 429-436.