

## 蒙药对牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究

杨斯琴<sup>1</sup> 敖日格乐<sup>1\*</sup> 王纯洁<sup>2</sup> 斯木吉德<sup>1</sup> 包永光<sup>3</sup>

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018;

3. 内蒙古高林屯种畜场, 内蒙古 通辽 028037)

**摘要** 为研究蒙药对牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果, 采用牛津杯法测定 15 种蒙药的抑菌圈直径, 结果表明, 其中朝您·哈日莫各和扫龙·吉木斯两味蒙药对 5 种血清型牛源致病性大肠杆菌抑菌效果较好, 达到极敏和高敏; 通过微量稀释法和平板法测定最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 结果显示, 朱如拉、朝您·哈日莫各、扫龙·吉木斯、浑钦、高勒图·宝日、给喜古纳和阿如拉等 7 种蒙药对 5 种血清型牛源致病性大肠杆菌综合抑菌效果较好, 其 MIC 为 0.063~0.500 g/mL, MBC 为 0.125~0.500 g/mL。

**关键词** 蒙药; 血清型; 致病性大肠杆菌; 抑菌作用

中图分类号 S 853.74

文章编号 1007-4333(2015)01-0124-05

文献标志码 A

## Antibacterial effects of Mongolian medicines on bovine pathogenic *Escherichia coli* in vitro

YANG Si-qin<sup>1</sup>, AO-ri-ge-le<sup>1\*</sup>, WANG Chun-jie<sup>2</sup>, SI-mu-ji-de<sup>1</sup>, BAO Yong-guang<sup>3</sup>

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

3. Inner Mongolia Gao Lin Tun Breeding Farm, Tongliao 028037, China)

**Abstract** The purpose of this paper is to study the effects of Mongolian medicines on the antibacterial effect of bovine pathogenic *Escherichia coli*. The diameter of inhibition zone was determined by Oxford cup method. The Oxford cup test results showed that among 15 Mongolian medicines, the two which had a better inhibitory effect on 5 different serotypes of pathogenic *E. coli* were chaonin Harimog and Solong Gims. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were investigated by the micro dilution method and plate method. The Micro dilution method explained that 7 kinds of Mongolian medicines that had better inhibitory effects on different serotypes from bovine Pathogenic *E. coli* were Zhu Rula, chaonin Harimog, Solong Gims, Hun Qin, Gaoletu · Baori, Geixigune and Arule with 0.063 - 0.500 g/mL of MIC and 0.125 - 0.500 g/mL of MBC.

**Key words** Mongolian medicines; serotypes; Pathogenic *Escherichia coli*; bacteriostasis

大肠杆菌病是感染率很高的人畜共患病且分布范围极广, 它是由致病性大肠杆菌引发的局部或全身性感染性传染病<sup>[1]</sup>。其传染源是体内感染有致病性大肠杆菌的带菌者、病人以及畜禽等。传染源的

排泄物一旦与饲料、水源和草场等接触就会造成交叉污染, 给养殖业造成巨大的经济损失。以牛为例, 家畜当中牛的带菌率最高可达 16%, 而且感染致病菌后, 至少需要 1 年的时间才能将病原菌排出<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2014-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31060318, 31260570); 国家科技支撑项目(20BAD12B09-02); “十二五”国家科技支撑项目(2012BAD12B09-3)

第一作者: 杨斯琴, 博士研究生, E-mail: 736343718@qq.com

通讯作者: 敖日格乐, 教授, 博士生导师, 主要从事牛生产学与产品品质科学, E-mail: geleaoiri6009@126.com

病畜或带菌动物生产的牛肉、牛奶等农副产品往往是动物性食品的污染源<sup>[3]</sup>。虽然国内外对该病的研究取得了显著的成效,但还未达到彻底解决的目标。因此,国内外学者仍在对该病防治进行大量的研究。

目前,治疗大肠杆菌病的常用药物是抗生素,而在使用抗生素类药物过程中,不仅杀灭侵入机体的致病菌,同时一定程度地破坏机体原有的正常菌群,导致机体微生态平衡的失衡,使机体正常生理机能发生紊乱,增加机体对外源感染的敏感性<sup>[4]</sup>。抗生素虽疗效显著,但易产生耐药性、引起动物免疫力低下及畜产品药物残留等问题<sup>[5]</sup>。因此,人们开始关注天然药物和微生态制剂等绿色环保型产品的研究开发,望以其替代抗生素。研究发现蒙药具有抗菌消炎和提高机体免疫力等作用,且通过维持畜体内环境的动态平衡,来达到防治疾病的目的<sup>[6-8]</sup>。因此研究蒙药制剂治疗大肠杆菌病具有实际应用价值。

目前,蒙药对大肠杆菌病的治疗作用研究较少。为此,本研究从15种具有清热解毒、抗菌消炎及提高机体免疫力等作用的蒙药中筛选对5种血清型致病性大肠杆菌(O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>8</sub>、O<sub>78</sub>和O<sub>86</sub>)具有较强体外抑菌作用的单味蒙药,旨在为蒙医药学理论、临床应用和组方研究提供有益的参考依据。

## 1 材料

### 1.1 菌株

O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>8</sub>、O<sub>78</sub>和O<sub>86</sub>5种血清型牛源野生致病性大肠杆菌由内蒙古农业大学动物科学学院动物生产组实验室从奶牛直肠粪样中分离提取,并提供。

### 1.2 药材

15种蒙药分别为巴如拉(川楝子)、如达(木香)、阿如拉(诃子)、扫龙·吉木斯(连翘)、浑钦(黄芩)、道古勒·乌布斯(苦参)、朝您·哈日莫各(枸杞)、古日古木(红花)、哈敦·海鲁木勒(五灵脂)、给喜古纳(大黄)、当棍(当归)、朱如拉(栀子)、高勒图·宝日(丁香)、洪林(胡黄连)和沙日嘎(姜黄)等,购自内蒙古京远大药房。

### 1.3 主要仪器

生化培养箱(型号为JC-SPJ-480),济南精诚实验仪器有限公司;全自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;净化工作台,上海新苗医疗器械制造有限公司;电子分析天平(型号为CP224C),上海奥豪斯仪器有限公司;微量移液器、电炉、漏斗、牛津杯和96孔培养板均为实验室常

用设备。

### 1.4 试剂

麦康凯培养基、伊红美蓝琼脂培养基、普通营养琼脂培养基和普通肉汤培养基等均购自广东环凯微生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 蒙药药液的制备

取各单味蒙药50g分别放入滤药袋,加入500mL水,室温浸泡过夜,煮沸1.5h,过滤药液;滤渣加250mL水,煮沸1h,合并2次药液,小火浓缩至50mL(即药液中所含生药量为1g/mL)。121℃高压灭菌,放入4℃冰箱保存<sup>[9]</sup>。

### 2.2 菌株的复苏及纯化

菌株使用前依次经麦康凯、伊红美兰培养后经营养琼脂纯化3次,使得菌落生长状况及菌落形态特征趋于一致,并与典型的描述特征相符合,即为纯培养物。将获得的纯培养物接种于普通营养琼脂斜面上,37℃培养24h,4℃冰箱保存备用<sup>[10]</sup>。使用时用麦氏比浊法将菌液配成 $1 \times 10^8$  cfu/mL。

### 2.3 牛津杯法抑菌试验

取比浊后的致病性大肠杆菌100μL,均匀涂布于琼脂平板上,无菌操作将牛津杯放入带有菌层的平皿内,将200μL药液加入牛津杯中,于4℃冰箱中过夜(使药液在琼脂上充分扩散),37℃培养24h。游标卡尺测量抑菌圈直径<sup>[11]</sup>。每种药物设3个平行试验,结果取平均值。

### 2.4 最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC)的测定

采用微量稀释法和平板法。取96孔板,每排1~8孔加入肉汤2倍梯度稀释药液,每孔200μL,共8种不同浓度。第9和10孔为阳性对照组(不加药物)和阴性对照组(不加病原菌)。孔1~9加入50μL菌液。轻轻震荡混匀,37℃培养24h,观察培养结果。在阳性对照组中细菌生长呈混浊状,而阴性对照管中无细菌生长呈透明状的前提下,观察其他孔内的混浊情况。若孔内混浊,说明细菌生长;若孔内澄清透明,说明无细菌生长。无细菌生长而药液浓度最低者,即为该味蒙药对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)。从未见细菌生长的各孔培养物中取100μL,接种于营养琼脂上,37℃培养24h。生长的菌落数小于5~10个的最低药液浓度为最低杀菌浓度(MBC)<sup>[12-16]</sup>。

### 3 结果与分析

#### 3.1 体外抑菌结果

体外抑菌结果见表1。由表1可知, O<sub>1</sub>血清型致病性大肠杆菌对朝您·哈日莫各极敏,其直径达24.42 mm;对洪林等11味蒙药高敏,效果最好的为沙日嘎与浑钦,抑菌直径分别为14.07和14.06 mm;对道古勒·乌布斯等3味蒙药低敏或不敏感;O<sub>2</sub>血清型致病性大肠杆菌对朝您·哈日莫各极敏,其抑菌直径为20.79 mm;对朱如拉等9味蒙药高度敏感,效果最好的为扫龙·吉木斯与给喜古讷,抑菌直径分别为14.76和14.78 mm;对洪林等5味蒙药不敏感;O<sub>8</sub>血清型致病性大肠杆菌对朝

您·哈日莫各、哈敦·海鲁木勒、扫龙·吉木斯和浑钦等4味蒙药极敏,其效果最好的为朝您·哈日莫各25.75 mm;对高勒图·宝日等11味蒙药低敏或不敏感;O<sub>78</sub>血清型致病性大肠杆菌对朝您·哈日莫各极度敏感,其抑菌直径为23.06 mm;对扫龙·吉木斯、给喜古讷、阿如拉等3味蒙药高敏,效果最好的为给喜古讷14.01 mm;对洪林等10种蒙药不敏感;O<sub>86</sub>血清型致病性大肠杆菌对朝您·哈日莫各极敏,抑菌直径为23.44 mm;对朱如拉等5味蒙药高敏,效果最好的是浑钦直径为14.44 mm;对洪林等9味蒙药不敏感;从以上可知15味蒙药中对5种血清型致病性大肠杆菌均有抑菌作用的蒙药有2种即为:朝您·哈日莫各与扫龙·吉木斯。

表1 15种蒙药对5种血清型致病性大肠杆菌的体外抑菌直径

Table 1 Diameter of the inhibition zone of 15 Mongolian herbs against 5 serotypes of pathogenic *Escherichia coli* *in vitro* mm

蒙药名称 Mongolian herbs	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>				
	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>8</sub>	O <sub>78</sub>	O <sub>86</sub>
洪林	11.12	—	—	—	—
朱如拉	12.11	13.37	—	—	10.45
朝您·哈日莫各	24.42	20.79	25.75	23.06	23.44
沙日嘎	14.07	—	—	—	—
哈敦·海鲁木勒	11.73	14.00	16.07	9.81	—
如达	—	—	—	—	—
当棍	12.80	11.74	—	—	10.81
扫龙·吉木斯	13.78	14.76	16.08	13.72	11.12
古日古木	10.06	12.11	—	—	—
浑钦	14.06	12.72	17.75	—	14.44
道古勒·乌布斯	9.09	—	—	—	—
高勒图·宝日	10.40	13.10	9.36	—	11.46
给喜古讷	13.06	14.78	—	14.01	—
巴如拉	—	—	—	—	—
阿如拉	10.14	14.43	—	13.11	—

注:“—”代表未产生抑菌圈或不敏感,抑菌圈直径  $R \geq 15$  mm 为极敏;  $10 \text{ mm} \leq R < 15 \text{ mm}$  为高敏;  $8 \text{ mm} \leq R < 10 \text{ mm}$  为低敏;  $R < 8 \text{ mm}$  为不敏感<sup>[10]</sup>。

Note: “—” is not emerge inhibition zone or insensitive, inhibition zone,  $R \geq 15$  mm is significantly sensitive,  $10 \text{ mm} \leq R < 15 \text{ mm}$  is highly sensitive,  $8 \text{ mm} \leq R < 10 \text{ mm}$  is low sensitive and  $R < 8 \text{ mm}$  is dull.

### 3.2 微量稀释法及平板法测定结果

敏感蒙药对致病性大肠杆菌的最小抑菌质量浓度(MIC)和最小杀菌质量浓度(MBC)试验结果见表 2。由表 2 可知,对 O<sub>1</sub> 血清型致病性大肠杆菌抑菌作用最好的蒙药为朝您·哈日莫各、浑钦、阿如拉,其 MIC 为 0.063 g/mL, MBC 为 0.125~0.250 g/mL;对 O<sub>2</sub> 血清型致病性大肠杆菌抑菌作用最好的蒙药为朱如拉、阿如拉,其 MIC 均为 0.125 g/mL, MBC 为 0.125~0.500 g/mL;对 O<sub>8</sub> 血清型致病性大肠杆菌抑菌作用最好的蒙药为朝您·哈日莫

各, MIC 为 0.63 g/mL, MBC 均为 0.250 g/mL;对 O<sub>78</sub> 血清型致病性大肠杆菌抑菌作用最好的蒙药为阿如拉, MIC 为 0.063 g/mL, MBC 为 0.250 g/mL;对 O<sub>86</sub> 血清型致病性大肠杆菌抑菌作用最好的蒙药为朱如拉, MIC 和 MBC 都为 0.125 g/mL, 说明当该药质量浓度达到 0.125 g/mL 时能够完全杀灭大肠杆菌;从以上可知朝您·哈日莫各与扫龙·吉木斯的牛津杯法和微量稀释法试验结果一致;但阿如拉在较低药物浓度下对致病性大肠杆菌即可起抑菌或杀菌作用。

表 2 敏感蒙药对 5 种血清型致病性大肠杆菌的 MIC 及 MBC

Table 2 MIC and MBC of the sensitive Mongolian herbs against 5 serotypes of pathogenic *Escherichia coli* g/mL

蒙药名称 Mongolian herbs	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>									
	O <sub>1</sub>		O <sub>2</sub>		O <sub>8</sub>		O <sub>78</sub>		O <sub>86</sub>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
洪林	0.125	0.500	*	*	*	*	*	*	*	*
朱如拉	0.125	0.250	0.125	0.500	*	*	*	*	0.125	0.125
朝您·哈日莫各	0.063	0.250	0.250	0.500	0.063	0.250	0.250	0.500	0.250	0.500
沙日嘎	0.250	0.250	*	*	*	*	*	*	*	*
哈敦·海鲁木勒	0.125	0.500	0.500	—	0.125	0.500	0.250	—	*	*
如达	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
当棍	0.500	—	0.250	—	*	*	*	*	0.500	0.500
扫龙·吉木斯	0.125	0.250	0.500	0.500	0.125	0.250	0.125	0.500	0.125	0.500
古日古木	0.250	0.500	0.250	—	*	*	*	*	*	*
浑钦	0.063	0.250	0.250	0.500	0.125	0.500	*	*	0.125	0.500
道古勒·乌布斯	—	—	*	*	*	*	*	*	*	*
高勒图·宝日	0.125	0.500	0.500	0.500	0.250	0.500	*	*	0.125	0.500
给喜古讷	0.125	0.500	0.250	0.500	*	*	0.125	0.500	*	*
巴如拉	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
阿如拉	0.063	0.125	0.125	0.125	*	*	0.063	0.250	*	*

注：“—”为该药物浓度内未测出。“\*”为不是敏感蒙药。

Note: “—” is not detected in the drug concentration. “\*” is not a sensitive drug.

## 4 讨论

蒙药一直致力于人类疾病防治,关于蒙兽药的报道极其罕见。关于蒙药对奶牛野生大肠杆菌的体外抑菌研究更是极少报道。具有鲜明民族特色和神奇功效的蒙药,由于缺乏资金和人才,长期以来一直处于低级开发状态<sup>[17]</sup>。

本研究参考中草药的体外抑菌试验方法,采用定性分析的牛津杯法和定量分析的微量稀释法检测 15 味蒙药对 5 种血清型致病性大肠杆菌的体外抑菌效果。牛津杯法可定性反映致病菌对药物的敏感程度,而微量稀释法不但能定量测定药物对致病菌的最小抑菌浓度,还可以直观反映细菌在药物作用下的生长情况。2 种抑菌试验方法相结合,避免了

单独采用一种方法造成试验结果的片面性<sup>[16]</sup>。

关于蒙药对致病性大肠杆菌的抑菌作用国内外报道非常少见。斯木吉德等<sup>[9]</sup>报道,蒙药浑钦对致病性大肠杆菌在较低药物浓度下就可抗菌。战永波等<sup>[18]</sup>报道,致病性大肠杆菌对扫龙·吉木斯(连翘)和朝您·哈日莫各(枸杞)极度敏感,对浑钦(黄芩)、高勒图·宝日(丁香)、阿如拉(诃子)、给喜古讷(大黄)高度敏感,对巴如拉(川楝子)、沙日嘎(姜黄)、洪林(胡黄连)、古日古木(红花)、当棍(当归)、朱如拉(栀子)、哈敦·海鲁木勒(五灵脂)不敏感。本试验结果与以上报道基本相似,但也有一定的差异。结果的差异性可能与菌种来源、中草药产地、采收季节及中草药品质有关及药物的煎煮时间有关。

本研究中15种蒙药对5种血清型野生致病性大肠杆菌存在不同程度的敏感性,其中朱如拉、朝您·哈日莫各、扫龙·吉木斯、浑钦、高勒图·宝日、给喜古讷、阿如拉对不同血清型牛源致病性大肠杆菌综合抑菌效果较好,达到了极敏和高敏,7种蒙药MIC(最小抑菌质量浓度)为0.063~0.500 g/mL, MBC(最小杀菌质量浓度)为0.125~0.500 g/mL。从2种方法可知以上7味药对5种血清型致病性大肠杆菌抑制作用较强,组方时可优先考虑。但试验中不难发现某些药物通过2种方法得到抑菌结果并不一致,这可能因中草药成分复杂,离子强度、pH和有效成分的溶解情况等对试验结果产生影响,有待于进一步研究。

研究发现同种药物对不同血清型致病性大肠杆菌的抑菌作用不同,可能与不同血清型致病性大肠杆菌含有的致病性毒力因子不同有关,大肠杆菌的毒力基因携带情况可以反映出其致病力的高低。致病力的高低可反映对药物的敏感性。

## 参 考 文 献

[1] 张越男,张彦明,张怀喜. 大肠杆菌毒力因子研究概况[J]. 动物

医学进展,2003,4(24):26-29

- [2] 朱蓓. 肠出血性大肠杆菌感染的流行病学及临床医学资料概述[J]. 解放军预防医学杂志,2011,4:309-311
- [3] 徐建国. O157:H7 大肠杆菌的传染源和传播途径[J]. 疾病监测,1997,12(11):439
- [4] 王箭. 中药制剂对牛大肠杆菌病的治疗试验[J]. 畜牧兽医科技信息,2008(9):43
- [5] 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
- [6] 松林,乌云斯日古楞. 试论中国蒙药的研究概况[J]. 中国民族医药杂志,2006(1):26-29
- [7] 巴音木仁. 蒙古兽医学[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1996
- [8] 宋立人,胡烈,王额尔敦,等. 中华本草蒙药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004
- [9] 斯木吉德,敖日格乐,王纯洁,等. 6种血清型牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2009(9):69-70
- [10] 韩梅红. 10味中草药对金黄色葡萄球菌的体外抑菌试验[J]. 长江大学学报,2011,8(10):240-243
- [11] 战永波,王纯洁,包金荣,等. 利用体外抑菌试验确立奶牛乳腺炎抗菌蒙药组方[J]. 动物医学进展,2009,30(9):34-37
- [12] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):110-111
- [13] 范国英,钟华,刘俊伟,等. 黄芩、黄连等对猪致病性大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 湖北农业科学,2010,49(5):1155-1157
- [14] 李国旺,苗志国,陈俊杰. 6种中药对猪伤寒杆菌的体外抑菌试验[J]. 贵州农业科学,2011,39(1):184-185
- [15] 曹志,何生虎,郭磊,等. 16种中草药对奶牛乳房炎3种病原菌体外抑菌试验[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011,(12):116-117
- [16] 刘澜,周德刚,莫云,等. 26种中草药对奶牛隐性乳房炎病原菌体外抗菌作用的研究[J]. 中国农业大学学报,2009,14(3):83-85
- [17] 柴海亮,阿斯钢. 处于低级开发状态的蒙药蕴藏巨大商机[N]. 中国乡镇企业报,2001-10-09(7)
- [18] 战永波,王纯洁,包金荣,等. 蒙药对奶牛乳房炎中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 黑龙江畜牧兽医·科技版,2010(2):134-135

责任编辑:苏燕