



## 研究论文

### Research Article

# 圣罗勒 (*Ocimum sanctum*) 和 薊罂粟 (*Argemone mexicana*) 叶提取物在体内外的抗菌作用

P. Varshney<sup>1</sup>, S. K. Dash<sup>1,2</sup>, A. K. Bhatia<sup>1,3</sup>

1. Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Science and Animal Husbandry, DUVASU, Mathura- 281001, UP, India

2. High Security Animal Disease Laboratory (HSADL), IVRI, Bhopal-462021 MP, India

3. Department of Biotechnology, GLA Institute of Technology and Management NH-2, Mathura-Delhi Highway, P.O. Chaumuhan, Mathura-281406 UP, India

✉ 通讯作者: [sandeepkumar.dash@gmail.com](mailto:sandeepkumar.dash@gmail.com); ✉ 作者

植物药与药理学杂志, 2013 年, 第 2 卷, 第 8 篇 doi: [10.5376/jpmmp.cn.2013.02.0008](https://doi.org/10.5376/jpmmp.cn.2013.02.0008)

收稿日期: 2013 年 08 月 06 日

接受日期: 2013 年 08 月 16 日

发表日期: 2013 年 08 月 27 日

本文首次发表在《Medicinal Plant Research》(2013, Vol.3, No.9)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

P. Varshney 等, 2013, 圣罗勒(*Ocimum sanctum*)和薊罂粟(*Argemone mexicana*)叶提取物在体内外的抗菌作用, 植物药与药理学杂志(online) Vol.2 No.8 pp.1-7 (doi: [10.5376/jpmmp.cn.2013.02.0008](https://doi.org/10.5376/jpmmp.cn.2013.02.0008))

引用格式(英文):

Varshney et al., 2013, In vitro and in vivo Antibacterial Effects of Leaf Extracts of *Ocimum sanctum* and *Argemone mexicana*, *Medicinal Plant Research*, Vol.2, No.8 1-7 (doi: [10.5376/jpmmp.cn.2013.02.0008](https://doi.org/10.5376/jpmmp.cn.2013.02.0008))

**摘要** 本研究的目的是探讨四种不同的圣罗勒(OS)和薊罂粟(AM)叶提取物对鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) O26 的体外抑菌效果。此外, 用鸡做试验, 对圣罗勒(OS)和薊罂粟(AM)的热水提取物(HAE)在体内对上述两种肠道病原菌的抗菌效果进行了评价。体外抗菌活性测定采用纸片扩散法, 且呈浓度依赖性。含 20 毫克浓度的圣罗勒(OS)和薊罂粟(AM)提取物在所有提取物中对鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的生长具有最大抑制效应。在所有提取方法中用甲醇法提取的物质在几种植物中都有较强的抗菌活性。在长期培养细菌菌落中出现抑菌作用比杀菌活性强。用鸡做试验时, 发现 250 毫克/公斤的圣罗勒(OS)和薊罂粟(AM)体重口服剂量都很理想并且无毒, 用此剂量喂鸡 21 天。第 22 天时, 分别对各组的鸡喂食 ID<sub>50</sub> 剂量的鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26, 以此对圣罗勒(OS)和薊罂粟(AM)的体内抗菌效果进行测定。83% 的圣罗勒(OS)喂养组和 66% 的薊罂粟(AM)喂养组经受住了鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的挑战, 没有受到其侵害。与薊罂粟(AM)喂养组相比, 圣罗勒(OS)喂养组将病原菌从血液中清除的效果更好。

**关键词** 抗菌; 薊罂粟(*Argemone mexicana*); 圣罗勒(*Ocimum sanctum*); 叶提取物; 鼠伤寒沙门氏菌(*S. enterica* serovar Typhimurium); 大肠杆菌(*E. coli*) O26

## *In vitro* and *in vivo* Antibacterial Effects of Leaf Extracts of *Ocimum sanctum* and *Argemone mexicana*

P. Varshney<sup>1</sup>, S. K. Dash<sup>1,2</sup>, A. K. Bhatia<sup>1,3</sup>

1. Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Science and Animal Husbandry, DUVASU, Mathura- 281001, UP, India

2. High Security Animal Disease Laboratory (HSADL), IVRI, Bhopal-462021 MP, India

3. Department of Biotechnology, GLA Institute of Technology and Management NH-2, Mathura-Delhi Highway, P.O. Chaumuhan, Mathura-281406 UP, India

✉ Corresponding author, [sandeepkumar.dash@gmail.com](mailto:sandeepkumar.dash@gmail.com); ✉ Authors

**Abstract** The present study was undertaken to explore the *in vitro* antibacterial effects of four different leaves extracts of *Ocimum sanctum* (OS) and *Argemone mexicana* (AM) against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* O26. Besides *in vivo* antibacterial effects of the hot aqueous extracts (HAE) of OS and AM against the above said enteric pathogens was evaluated in chicken model. *In vitro* antibacterial activity was determined by disc diffusion and it was concentration dependent. Disc containing 20 mg concentration of all the extracts of OS and AM showed maximum inhibitory effect on the growth of *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* O26. Among all the extracts methanolic extracts of both the plants had stronger antibacterial activity. On prolonged incubation bacterial colonies reappeared within the zone of inhibition indicating bacteriostatic effect than bactericidal activity. 250 mg/kg body weight oral dose of OS and AM was found ideal and nontoxic in chickens and experimental chickens were fed this dose for 21 days for determination of *in vivo* antibacterial effect. On 22<sup>nd</sup> day respective groups of chickens were challenged orally with ID<sub>50</sub> dose of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. 83% chickens of OS fed groups and 66% chickens of AM fed groups were protected from challenge of *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* O26. OS provided better clearance of both the pathogens from blood as compared to AM.

**Keywords** Antibacterial; *Argemone mexicana*; *Ocimum sanctum*; Leaf extract; *S. enterica* serovar Typhimurium; *E. coli* O26



在密集条件下饲养的家禽更容易感染细菌和病毒性疾病。在饲料中肆意添加抗生素导致微生物抗药性的增强。微生物具有转移和获得耐药性的遗传能力, 从而导致微生物菌株能够抗多种药性, 使其抗药性情况进一步恶化。由于肉类和鸡蛋的大量生产, 致使鸟类需要大量繁殖, 从而降低了其免疫力, 因此鸟类很容易感染疾病。这对家禽养殖业的发展带来了非常不利的影响, 需要投入很高的成本来解决这一问题(Tamara et al., 2009)。为了保持家禽业的增长速度, 让其继续支持农村生计, 有必要消除该行业所面临的限制。其中一个措施可能是适当地应用经科学验证的药用植物作为抗生素的替代品。药用植物可以作为新抗菌剂的潜在资源(Ahmad et al., 1998)。植物疗法已被应用于对抗某些病原体, 因为其易得性、更少的副作用和较低的毒性(Lee et al., 2007)。

在这些植物中圣罗勒(OS)在许多亚洲、非洲和南美洲国家的本土的医学体系中占重要地位。此前, 已有许多学者报道了圣罗勒(OS)的抗菌性能(Ahmad et al., 1998; Ahmad and Beg, 2001; Mishra and Mishra, 2011)。植物化学分析显示, 圣罗勒(OS)的抗菌性能是由于其体内含有苷类、酚类和鞣质物质(Ahmad and Beg, 2001)。

除了这些行之有效的药材, 还有一些野草因其毒性而出名, 如薊罌粟(AM)。有少量报告表示, 薊罌粟(AM)的种子和叶子也有抗菌活性(Kempraj and Bhat, 2010)。

基于以上原因, 本研究欲探索不同圣罗勒(OS)和薊罌粟(Am)叶提取物对两种常见家禽病原体的体内外抗菌活性, 即, 鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26。

## 1 结果与分析

### 1.1 纸片扩散法测定不同圣罗勒(OS)叶提取物的体外抗菌效果

检测了圣罗勒(OS)叶提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 两种细菌的抗菌活性。应用 4 种不同的制剂提取圣罗勒(OS)叶中的物质, 分别是冷水、热水、甲醇和甲醛; 每种提取物分别设置成 4 种浓度, 即 2 mg/片、5 mg/片、10 mg/片和 20 mg/片。试验重复三次, 取平均值(表 1、表 2)。抗菌活性呈浓度依赖性。所有 2 mg/片浓度的提取物对分离的细菌都无显著的抗菌效果, 然而所有 20 mg/片浓度的提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 两种细菌菌落的生长都有最大的抑制作用。在所有的提取物中甲醇提取物表现出最好的抗菌效果, 对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 分别产生了 20 mm 和 18 mm 的抗菌区域。所有提取物对大肠杆菌 O26 的抗菌作用都比对鼠伤寒沙门菌的小(图 1)。试验显示, 在 10 mg/片浓度提取物的抑制作用区域内, 存在有抗性的细菌菌落。且, 在长时间的抑制作用下, 提取物的抑制作用逐渐减小。

表 1 圣罗勒(OS)叶热水、冷水提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的体外抗菌效果

Table 1 Effects of cold and hot aqueous extract of OS leaves against *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* O26

Quantity of Extract mg/disc	Zone of inhibition (mm) <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium						Zone of inhibition (mm) <i>E. coli</i> O26					
	24 h		36 h		48 h		24 h		36 h		48 h	
	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE
2	6	6	5	5	4	4	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
5	11	12	11	11	10	10	8	8	6	6	4	4
10	14	14	12	12	11	11	12	12	11	10	9	8
20	16	16	15	15	14	14	14	16	13	13	12	12

注: CAE 表示冷水提取物; HAE 表示热水提取物

Note: CAE: Cold aqueous extract; HAE: Hot aqueous extract

### 1.2 纸片扩散法测定不同薊罌粟(Am)叶提取物的体外抗菌效果

也对薊罌粟(AM)叶提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 两种细菌的抗菌活性进行了检测。用冷水、热水、甲醇和甲醛 4 种不同的制剂提取薊罌粟(AM)叶中的物质, 检测每种提取物在 2 mg/片、5 mg/片、10 mg/片和 20 mg/片四种浓度下的抗菌活性, 试验重复三次, 取平均值(表 3、表 4)。2 mg/片浓度的冷水和热水提取物对两种细菌都没有任何抗性。5 mg/片浓度的薊罌粟(AM)叶提取物对两种细菌只有非常狭窄的抑制区, 只持续了 24~36 小时, 然后就在之前的抑制区域出现了鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的菌落。20 mg/片浓度的薊罌粟(AM)叶提取物对两种细菌表现出了最大的抑制区域。本试验也表明甲醇提取物对两种细菌有最好的抗菌作用(图 2)。



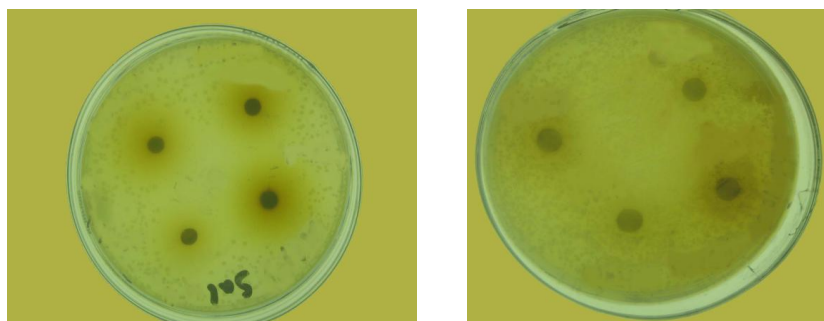
表 2 圣罗勒(OS)叶甲醇、甲醛提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的体外抗菌效果

Table 2 Effects of methanolic and hydromethanolic extracts of OS leaves against *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* O26

Quantity of Extract mg/disc	Zone of inhibition (mm)						Zone of inhibition (mm)					
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium						<i>E. coli</i> O26					
	24 h		36 h		48 h		24 h		36 h		48 h	
	ME	HME	ME	HME	ME	HME	ME	HME	ME	HME	ME	HME
2	8	6	6	4	6	3	7	5	6	4	6	4
5	16	10	14	9	12	7	13	8	12	6	10	6
10	18	14	16	13	14	11	15	12	14	11	11	10
20	20	16	18	15	16	12	20	14	17	12	14	10

注: ME: 甲醇提取物; HME: 甲醛提取物

Note: ME: Methanolic extract; HME: Hydromethanolic extract



(a) *S. enterica* serovar Typhimurium

(b) *E. coli* O26

图 1 圣罗勒(OS)叶甲醇提取物对两种细菌的体外抗菌效果

Figure 1 In vitro Antibacterial effects of methanolic extract of *O. sanctum* leaves against two bacterial species

表 3 薊罂粟(AM)叶热水、冷水提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的体外抗菌效果

Table 3 Effects of cold and hot aqueous extract of AM leaves against *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* O26

Quantity of Extract mg/disc	Zone of inhibition (mm)						Zone of inhibition (mm)					
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium						<i>E. coli</i> O26					
	24 h		36 h		48 h		24 h		36 h		48 h	
	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE	CAE	HAE
2	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
5	8	8	8	8	7	7	8	8	7	7	7	7
10	12	12	12	11	11	10	12	12	11	12	10	10
20	14	14	14	14	12	12	14	14	14	12	12	10

注: CAE 表示冷水提取物; HAE 表示热水提取物

Note: CAE: Cold aqueous extract; HAE: Hot aqueous extract

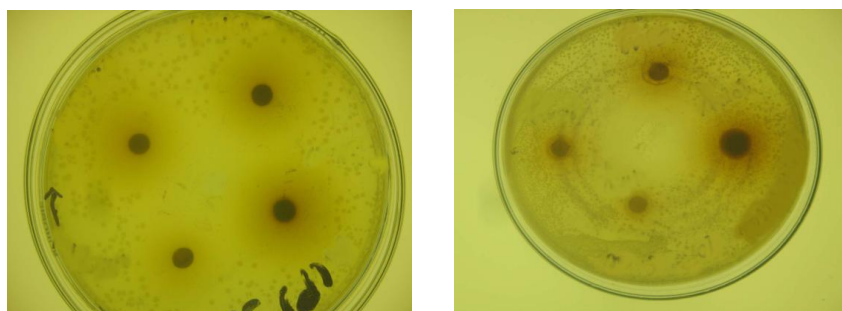
表 4 薊罂粟(AM)叶甲醇、甲醛提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的体外抗菌效果

Table 4 Effects of methanolic and hydromethanolic extracts of AM leaves against *S. enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* O26

Quantity of Extract mg/disc	Zone of inhibition (mm)						Zone of inhibition (mm)					
	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium						<i>E. coli</i> O26					
	24 h		36 h		48 h		24 h		36 h		48 h	
	ME	HME	ME	HME	ME	HME	ME	HME	ME	HME	ME	HME
2	6	6	4	4	4	4	5	4	4	3	4	3
5	12	10	11	10	10	9	10	9	9	8	8	6
10	15	14	14	14	13	12	13	11	12	10	12	9
20	18	16	17	15	14	14	16	12	14	11	12	11

注: ME: 甲醇提取物; HME: 甲醛提取物

Note: ME: Methanolic extract; HME: Hydromethanolic extract



(a) *S. enterica* serovar Typhimurium (b) *E. coli* O26  
 图 2 蓍罂粟(AM)叶甲醇提取物对两种细菌的体外抗菌效果

Figure 2 *In vitro* Antibacterial effects of methanolic extract of *A. mexicana* leaves against two bacterial species

### 1.3 圣罗勒(OS)和蓍罂粟(AM)热水叶提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的体内抗菌作用

#### 1.3.1 测定 ID<sub>50</sub> 剂量的鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 对鸡的影响

ID<sub>50</sub> 剂量的鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 分别为 1.68×10<sup>9</sup> CFU/ml 和 6.75×10<sup>9</sup> CFU/ml。当鸡表现出发热、迟钝、抑郁、腹泻、羽毛凌乱、拒绝喂养和死亡时被认为是受感染的。从感染鸟和死鸟内分离、验证两种细菌。

#### 1.3.2 向被 ID<sub>50</sub> 剂量的鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 感染了试验鸡喂食圣罗勒(OS)和蓍罂粟(AM)热水叶提取物, 试验鸡的变化情况

圣罗勒(OS)喂养组有 83%的试验鸡免于被鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 感染, 而蓍罂粟(AM)喂养组有 66%的试验鸡免于被感染, 因为它们没有表现出疾病症状(表 5)。

圣罗勒(OS)热水提取物能更好地清除、抑制鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26, 蓍罂粟(AM)热水提取物抑菌效果没有圣罗勒(OS)好, 但优于对照组(表 6、图 3、图 4)。

表 5 试验鸡体内测定圣罗勒(OS)和蓍罂粟(AM)叶热水提取物对鼠伤寒沙门菌和大肠杆菌 O26 的体内抗菌效果  
 Table 5 *In vivo* antibacterial effects of HAE of OS and AM leaves against *S. enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* O26 infection in chickens

Groups	Number	Challenged with ID <sub>50</sub> dose (CFU/ml)	Infected (Clinical sign present)	Infectivity rate (%)	Prevention rate (%)
Unfed (Control)(GI)	6	1.68x10 <sup>9</sup> <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	3	50.00	50.00
<i>O. sanctum</i> fed (GII)	6	do	1	16.66	83.34
<i>A. mexicana</i> fed (G III)	6	do	2	33.33	66.67
Unfed (Control)(GIV)	6	6.75 x10 <sup>9</sup> <i>E. coli</i> O26	3	50.00	50.00
<i>O. sanctum</i> fed (GV)	6	do	1	16.66	83.34
<i>A. mexicana</i> fed (GVI)	6	do	2	33.33	66.67

表 6 试验鸡喂食圣罗勒(OS)和蓍罂粟(AM)叶提取物后血液细菌负载量的检测

Table 6 Determination of bacterial load in blood of OS and AM fed chickens

Experimental groups	Number of bacterial colonies (CFU) recorded on		
	23 <sup>rd</sup> day	24 <sup>th</sup> day	25 <sup>th</sup> day
Unfed infected with <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium (GI)	132.66	230.66	387.33
OS fed infected with <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium (GII)	76.33	113.33	91.33
AM fed infected with <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium (GIII)	105.33	135.33	107.66
Unfed infected with <i>E. coli</i> O26 (IV)	180.33	290.66	397.33
OS fed infected with <i>E. coli</i> O26 (GV)	107.66	160.66	115.33
AM fed infected with <i>E. coli</i> O26 (GVI)	127.66	186.33	135.66



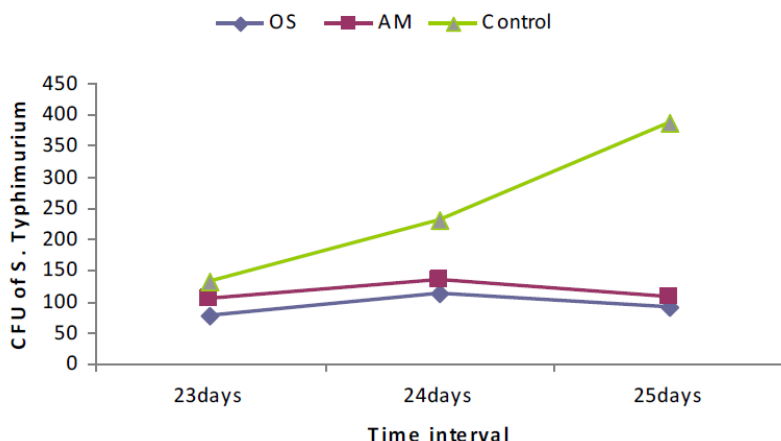


图 3 圣罗勒(OS)、蓟罂粟(AM)叶热水提取物在试验鸡体内对鼠伤寒沙门菌的抗菌效果(血液载菌量)比较  
Figure 3 Line diagram showing the antibacterial effect of HAE of OS and AM leaves against *S. enterica* serovar Typhimurium in blood of fed and unfed chickens

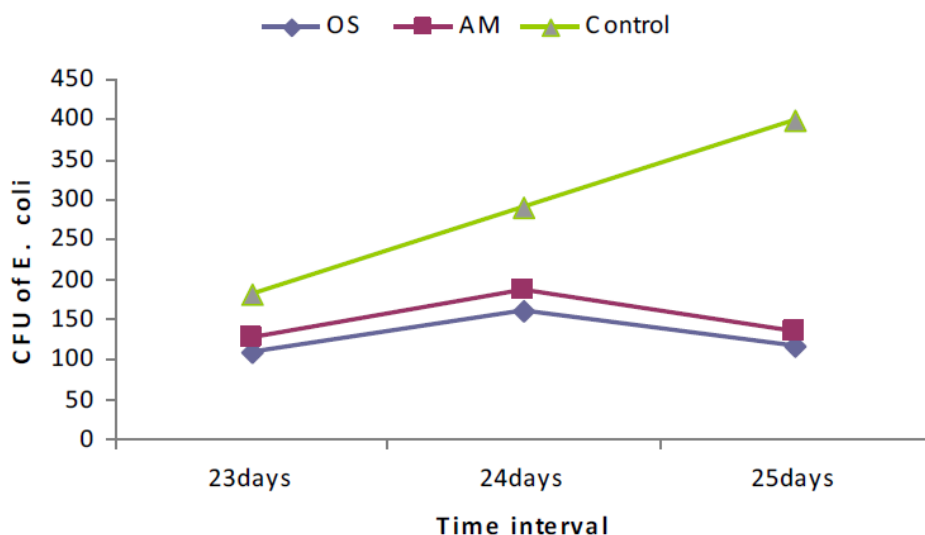


图 4 圣罗勒(OS)、蓟罂粟(AM)叶热水提取物在试验鸡体内对大肠杆菌 O26 的抗菌效果(血液载菌量)比较  
Figure 4 Line diagram showing the antibacterial effect of HAE of OS and AM leaves against *E. coli* O26 in blood of fed and unfed chickens

用被喂食了 ID50 剂量  $1.68 \times 10^9$  CFU/mL 的鼠伤寒沙门氏菌和  $6.75 \times 10^9$  CFU/ml 的大肠杆菌的试验鸡对圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物的体内抗菌活性进行检测(表 5)。发现被喂食了圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物的鸡得到了更多的保护, 与对照组相比没有出现临床症状。被喂食了提取物的试验鸡与对照组的鸡体内血液的鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌含量每到第 24、48、72 小时要进行对比。被喂食了圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)的试验鸡血液中鼠伤寒沙门氏菌的浓度在所有试验阶段中都比没喂食的鸡浓度低(表 6, 图 3)。大肠杆菌 O26 的试验结果与此相似。这说明用圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物喂食的鸡对细菌有更好的抵抗作用。

以上试验结果表明圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶对鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌有抗菌活性。

### 3 材料与方法

#### 3.1 用索氏提取器制备热水、甲醇和甲醛提取物

印度马图拉的 BSA 大学植物系对圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)两种植物进行了鉴定。在马图拉大学校园及周边地区收集圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶片。鲜叶在树荫下阴干后用于制备热水提取物(HAE)、冷水提取物(CAE)、甲醇提取物(ME)和甲醛提取物(HME)。体外抗菌性能的测定需要做所有的准备工作, 而体内抗菌试验只需要用热水提取圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)的叶片。

将 59g 圣罗勒(OS)/蓟罂粟(AM)叶的干粉放置在萃取器的多孔渗透滤纸筒上, 下面放置一个装有 750 毫升



溶剂 (TDW/甲醇/甲醛) 的烧瓶。烧瓶被加热, 溶剂被蒸发掉。温度是根据各自的溶剂 (TDW/甲醇/甲醛) 的沸点调节的。提取过程需要持续 15~20 个循环, 并取出含有溶剂和提取物的烧瓶。将烧瓶中的溶剂蒸发掉, 并测定剩余物质。

### 3.2 用干燥叶制备圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)的冷水提取物

在室温下, 将 150 g 干叶粉浸泡在 750 毫升的三重蒸馏水四天。添加 2 至 4 滴的氯仿, 以防止真菌的生长。将浸泡的混合液每天摇晃 3 次, 4 天后先后用棉布、1 张定性滤纸和 0.45  $\mu\text{m}$  的膜滤器对其进行过滤。将滤液中的水份蒸发掉, 然后冻干; 将提取出来的物质称重, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存以备后用。

### 3.3 菌株

由印度马图拉 DUVASU 的微生物学和免疫学系提供鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26。这两种细菌被用于检测圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物的体内/外抗菌活性。

### 3.4 试验鸡

由马图拉 Uday 孵化场购买均一的、无病的、一天大的小鸡, 并饲养在 DUVASU 的家禽饲养场。所有的鸡都在标准统一的条件下被安置和喂养。为了防止环境污染, 采取了预防措施。在每个试验组内, 用翼标签帮助识别各个鸡个体。本试验采用七日龄雏鸡。所有试验均通过了“实验动物伦理委员会 (IAEC)”的批准, 并在他们的指导下进行试验。每个试验组合对照组均用 6 只试验鸡。

### 3.5 确定圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物 (HAE) 的无毒剂量

圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物 (HAE) 的无毒剂量从三个口服剂量 250 mg/kg、500 mg/kg 和 1000 mg/kg 中选择。在体内抗菌活性试验中, 250 mg/kg 的剂量是圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物 (HAE) 使用的最佳剂量 (Varshney et al., 2013)。

### 3.6 制备包含不同浓度的圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物的草药纸片/草药盘

采用直径为 6 mm 的 Whatman 1 号滤纸, 将其于 160 $^{\circ}\text{C}$  高温的空气中灭菌 60 分钟。然后用滤纸片沾染不同浓度的圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物, 将其干燥后即可成为备用的草药纸片/盘。制备分别含有由冷水、热水、甲醇和甲醛溶液提取的圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物的草药纸片, 每种提取液又分别包含 2 mg、5 mg、10 mg 和 20 mg 四种浓度。这些草药纸片/盘将用于测试圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物对鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的抗菌活性。

### 3.7 测定不同叶提取物的体外抗菌活性

采用纸片扩散法 (Bauer et al., 1966)。0.5 ml 的分离后的菌落培养液均匀地分布于板中, 菌液浓度为  $3 \times 10^4$  CFU/ml。包含有 2 mg、5 mg、10 mg 和 20 mg 浓度的圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物草药纸片被放置于 8~10cm 的已接种菌落的营养琼脂板上, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 小时。测定草药纸片上抑菌区域的直径大小来表示提取物的抗菌活性, 其测定单位为 mm。每个试验重复 3 次。

### 3.8 测定圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶提取物对鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的体内抗菌活性

#### 3.8.1 探索圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物喂食试验鸡的无毒剂量

用口服的方法喂食试验鸡圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物。圣罗勒(OS)和蓟罂粟(AM)叶热水提取物都设置 250 mg/kg(试验鸡体重)、500 mg/kg(试验鸡体重)和 1000 mg/kg(试验鸡体重)三个喂食剂量, 再设置一个喂食三重蒸馏水做安慰剂的对照组, 喂食 21 天。结果发现, 3 种剂量中 250 mg/kg 是最理性的 (Varshney et al., 2013), 将其用于体内抗菌活性的研究。

#### 3.8.2 确定鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的试验鸡喂食剂量 ID50

将生长于贝尔塔尼(LB)琼脂板上纯的鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的光滑菌落接种于 LB 肉汤中。接种后的 LB 肉汤放置于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 然后于 3000 rpm 的转速下离心 10 分钟。舍弃上清, 用 PBS 洗涤细胞沉淀 3 次, 并最终重新悬浮在 PBS 溶液中, 用 McFarland 的浊度计分别配制浓度为  $9 \times 10^9$  细胞/ml 的鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 PBS 悬浮液。稀释两次, 然后将 1ml 稀释了 4 倍的悬浮液喂食给试验鸡, 每组包含 6 只鸡。口服接种所有的试验鸡后, 观察 10 天, 每天观察 2 次, 监测其临床症状如发热、迟钝、抑郁、腹泻、羽毛褶皱、和拒食而死亡。从受感染者和死鸡中分离并确认了各自的细菌。ID50 的剂量用 Reed and Muench (1938) 的方法计算得来。



### 3.8.3 圣罗勒(OS)和藜蓍粟(AM)叶热水提取物对感染 ID<sub>50</sub> 剂量的鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 O26 的试验鸡的影响

圣罗勒(OS)和藜蓍粟(AM)叶热水提取物对剂量为ID<sub>50</sub>的鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌O26的体内抗菌效果由临床症状和血液细菌负荷量确定。设置了6组试验鸡, 组1~组6 (GI~VI), 每组6只鸡。GII和GIII喂食剂量为250 mg/kg的圣罗勒(OS)热水提取物21天; GV和GVI喂食剂量为250 mg/kg的藜蓍粟(AM)热水提取物21天; GI和GIV喂食安慰剂(三重蒸馏水), 做对照。第22天, GI、GII和GIII接种 $1.68 \times 10^9$  CFU/ml (ID<sub>50</sub>剂量)的鼠伤寒沙门氏菌; GIV、GV和GVI接种 $6.75 \times 10^9$  CFU/MI (ID<sub>50</sub> 剂量)的大肠杆菌O26, 接种方式为口服。检测临床感染症状10天, 每天观察2次。

### 3.8.4 测定血液中的细菌负荷量

于第23、24和25天分别从每组中选取3只试验鸡放血。将收集的血连续稀释10倍, 每组稀释后的血液命名为 $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ 。将0.5 mL  $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ 的血液稀释液接种于LB琼脂板上, 每份血液稀释液接种3板, 接种时采用无菌的接种环/棒, 接种后于37℃培养。24 h后记录细菌菌落数量(CFU)并求平均值。

## 作者的贡献

所有作者对这项研究都做出了同样的贡献。所有的作者阅读并同意了文章的最终版本。

## 致谢

本人对于本校能提供开展这项研究工作的必要设施非常感谢。

## 参考文献

- Ahmad I., Mehmood Z., and Mohammad F., 1998, Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J Ethnopharmacol*, 62:183-193  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00055-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00055-5)
- Ahmad I. and Beg A.Z., 2001, Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi drug resistance human pathogens. *J. Ethnopharmacol*, 74 (2): 113-123 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00335-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00335-4)
- Bauer A.W., Kirby W.M.N., and Sherris J.C., 1966, Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *American Journal of clinical pathology*, 45:493-496
- Chattopadhyay R.R., Bhattacharya S.K., Medda C., Chanda S., and Bag A., 2009, A comparative evaluation of antibacterial potential of some plants used in Indian traditional medicine for the treatment of microbial infections. *Brazil. Archives of bio. and Technol*, 52(5):1123-1128
- Geeta, Vasudevan D.M., Kedlaya R., Deepa S, and Ballal M., 2001, Activity of *Ocimum sanctum* (the traditional Indian medicinal plant) against the enteric bacteria, *Indian J. Med. Sci.*, 55:534-538
- Goyal P. and Kaushik P., 2011, *In vitro* evaluation of antibacterial activity of various crude leaf extracts of Indian sacred plant, *Ocimum sanctum* L. *British Microbiology Research Journal*, 1(3): 70-8
- Joshi B., Sah G.P., Basnet B.B., Bhatt M.R., Sharma D., and ubedi K., 2011, Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Eugenia caryophyllata* (Clove), *Achyranthes bidentata* (Datiwan) and *Azadirachta indica* (Neem) *J Microbiol Antimicrob*, 3(1):1-7
- Kempuraj V. and Bhat S.K., 2010, Bacteriostatic potential of *Argemone mexicana* Linn. against Enteropathogenic Bacteria. *Indian J. Nat. Product and Res*, 1(3):338-41
- Lee S.B., Cha K.H., and Kim S.N. 2007, The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against Pathogenic Microorganisms *J. Microbiol*, 45:53-57
- Mandal, S., Mandal M.D., and Pal N.K., 2012, Enhancing chloramphenicol and trimethoprim *in vitro* activity by *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae) leaf extract against *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(3): 220-224
- Mishra P. and Mishra S., 2011, Study of antibacterial activity of *Ocimum sanctum* extract against gram positive and gram negative bacteria, *Am. J. Food Technol*, 6: 336-341 <http://dx.doi.org/10.3923/ajft.2011.336.341>
- Mohamed L.E.T., El Nur E.B.E.S. and Abdelrahman M.E.N., 2010, The antibacterial, antiviral activities and phytochemical screening of some Sudanese medicinal plants, *EurAsia J. BioSci*, (4)8-16
- Reed L. J. and Muench H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3): 493-497
- Tamara F., Mojca V., Janez S. and Vida R. 2009, Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition, *Acta Agriculturae Slovenica*, 94 (2): 95-102
- Varshney P., Dash S., Goel A., and Bhatia A., 2013, Immuno modulatory effects of hot aqueous extract of *Ocimum sanctum* and *Argemone mexicana* Leaves in Chicken Model, *Medicinal Plant Research*, 3(8): 57-62 (doi: 10.5376/mpr.2013.03.0008) <http://dx.doi.org/10.5376/mpr.2013.03.0008>