

## 抗中华绒螯蟹维氏气单胞菌中草药的筛选及其复方制剂的配伍优化

曹海鹏, 周慧华, 顾颖, 陈百尧, 安健

### Screening and compatibility optimization of herbs against *Aeromonas veronii* pathogenic to *Eriocheir sinensis*

CAO Haipeng, ZHOU Huihua, GU Ying, CHEN Baiyao, AN Jian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211203636>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

##### 蟹源弗氏柠檬酸杆菌拮抗菌PNB3的分离鉴定与安全性分析

Isolation, identification and safety analysis of antagonistic strain PNB3 against crab-pathogenic *Citrobacter freundii*

上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 653 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402988>

##### 乳酸链球菌素与乳酸对维氏气单胞菌的协同抑制和损伤作用

Synergistic inhibition and damage effects of nisin and lactic acid against pathogen *Aeromonas veronii*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 830 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-301>

##### 不同温度对中华绒螯蟹生长及肠道微生物菌群的影响

Effects of different temperatures on growth and gut microbiota of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

上海海洋大学学报. 2022, (2): 384 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303325>

##### 稻田和池塘养殖模式对中华绒螯蟹肠道菌群、免疫酶活及肌肉游离氨基酸的影响

Effects of paddy field and pond culture on intestinal microbiota, immune capacity and muscle free amino acids of *Eriocheir sinensis*

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1404 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210703501>

##### 杀鲑气单胞菌杀藻作用的初步研究

Preliminary study on algacide function of chitinase from *Aeromonas salmonicida*

上海海洋大学学报. 2020, 29(3): 439 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190502666>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1413-10

DOI:10.12024/jsou.20211203636

## 抗中华绒螯蟹维氏气单胞菌中草药的筛选及其复方制剂的配伍优化

曹海鹏<sup>1,2</sup>, 周慧华<sup>1,2</sup>, 顾颖<sup>1,2</sup>, 陈百尧<sup>3</sup>, 安健<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 连云港市海洋与渔业发展促进中心, 江苏 连云港 222000)

**摘要:** 为研制抗中华绒螯蟹维氏气单胞菌中草药复方制剂, 以中华绒螯蟹致病性维氏气单胞菌 HXH1 为筛选指示菌, 在采用试管二倍稀释法筛选出具有良好抑菌活性的抗菌中草药的基础上, 用正交  $t$  值法对各抗菌中草药进行了配伍优化制备中草药复方制剂, 并进一步通过试管二倍稀释法对中草药复方制剂的体外抗菌效果进行评价。结果表明, 黄连、苏木、大黄、乌梅、鸡血藤、石榴皮、香薷等 7 种中草药提取液对维氏气单胞菌的抑菌效果较好, 对维氏气单胞菌 HXH1 的最小抑菌质量浓度范围为 7.81 ~ 31.25 mg/mL, 但因大黄、鸡血藤、乌梅存在负效应, 优选黄连、香薷、苏木、石榴皮作为中草药复方制剂的主要成分, 其最佳配伍比例为 5:4:1:2, 在该配伍比例下对维氏气单胞菌 HXH1 的最小抑菌质量浓度为 5.21 mg/mL。此外, 中草药复方制剂对 HXY1、HXY3、J1Y4、J1Y5、J2Y4、J2Y6、WAB1 等其他中华绒螯蟹源维氏气单胞菌菌株的最小抑菌质量浓度为 3.91 ~ 7.81 mg/mL, 具有良好的体外抗菌效果。本实验确定了抗中华绒螯蟹维氏气单胞菌中草药复方制剂的主要成分和配伍比例, 为维氏气单胞菌引起的中华绒螯蟹病害的中草药控制奠定了基础。

**关键词:** 中草药; 维氏气单胞菌; 配伍; 中华绒螯蟹

**中图分类号:** S 945.6

**文献标志码:** A

维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 是中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 细菌性病害的重要病原菌, 对中华绒螯蟹养殖危害巨大。姜光明等<sup>[1]</sup>研究发现, 维氏气单胞菌能够引起中华绒螯蟹败血症, 对中华绒螯蟹的最低致死剂量为  $2.1 \times 10^4$  CFU/g; 周慧华等<sup>[2]</sup>研究表明, 维氏气单胞菌能够使中华绒螯蟹出现肝胰腺坏死、肠炎等病症, 对中华绒螯蟹的半数致死剂量为  $6.92 \times 10^4$  CFU/mL。因此, 中华绒螯蟹维氏气单胞菌的控制应予以重点关注。中草药资源丰富, 因富含多种抑菌成分而具有良好的杀菌效果, 而且不易产生耐药性, 具有良好的水产绿色抗菌药物开发价值<sup>[3]</sup>。目前, 抗鱼源维氏气单胞菌中草药的筛选工作已经取得了较大进展, 发现了对花鲈 (*Lateolabrax maculatus*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 致病性维氏气单胞菌具有良好抑菌活性的乌梅、苏木、五倍子、丁香、艾叶、石榴皮、地榆、黄芩、五味子等中草

药<sup>[4-7]</sup>, 但从现有文献资料来看, 关于抗中华绒螯蟹维氏气单胞菌中草药的筛选及其组方研究却鲜有报道。鉴此, 本实验通过试管二倍稀释法分析 50 种中草药对中华绒螯蟹致病性维氏气单胞菌的抑菌活性, 在筛选出潜在抗菌中草药的基础上, 采用正交  $t$  值法对中草药复方制剂的组方进行了优化, 并进一步评价了中草药复方制剂的体外抗菌效果, 以期能为抗中华绒螯蟹维氏气单胞菌的中草药复方制剂的开发提供技术支撑。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

50 种中草药 (表 1), 购自宸瑜中药材; 营养琼脂、营养肉汤, 购自国药集团 (上海) 化学试剂有限公司; 0.85% 氯化钠溶液, 由本实验室自制; 维氏气单胞菌 HXH1, 分离自患病中华绒螯蟹肝胰腺<sup>[2]</sup>, 由本实验室保存; 中华绒螯蟹维氏气单胞菌 HXY1、HXY3、J1Y4、J1Y5、J2Y4、J2Y6、

收稿日期: 2021-11-30 修回日期: 2022-01-15

基金项目: 国家虾蟹产业技术体系项目 (CARS-48); 江苏省海洋与渔业科技创新与推广项目 (Y2018-8)

作者简介: 曹海鹏 (1981—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为水产动物医学。E-mail: hpcao@shou.edu.cn

通信作者: 安健, E-mail: anjian520@sohu.com

WAB1,由国家水生动物病原库提供。

表 1 实验用中草药  
Tab.1 Experimental herbs

中草药 Herb	供试部位 Test part	中草药 Herb	供试部位 Test part	中草药 Herb	供试部位 Test part
黄连 <i>Rhizoma coptidis</i>	根茎	穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i>	干燥地上部分	杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	皮、叶
苏木 <i>Caesalpinia sappan</i>	干燥心材	玉竹 <i>Polygonatum odoratum</i>	根茎	茉莉 <i>Jasminum sambac</i>	根、茎、叶、花
大黄 <i>Radix et rhizoma rhei</i>	根、茎	丁香 <i>Syzygium aromaticum</i>	成熟果实	苦参 <i>Radix sophorae</i>	根
石榴皮 <i>Punica granatum</i>	果皮	茵陈 <i>Artemisia scopariae</i>	干燥地上部分	芦根 <i>Rhizoma phragmitis</i>	根茎
五倍子 <i>Rhus chinensis</i>	叶上虫瘿	白头翁 <i>Pulsatilla chinensis</i>	根	熟地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i>	根茎
乌梅 <i>Fructus mume</i>	成熟果实	肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i>	干燥树皮	牡丹皮 <i>Moutan cortex</i>	干燥根皮
赤芍 <i>Radix paeoniae rubra</i>	根	金樱子 <i>Rosa laevigata</i>	成熟果实	黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>	干燥根
青蒿 <i>Artemisia caruifolia</i>	茎、叶	连翘 <i>Forsythia suspensa</i>	成熟果实	夏枯球 <i>Prunella vulgaris</i>	果穗
香薷 <i>Moslae herba</i>	干燥地上部分	广藿香 <i>Herba pogostemonis</i>	干燥地上部分	合欢皮 <i>Cortex albiziae</i>	干燥树皮
鸡血藤 <i>Spatholobi caulis</i>	藤茎	车前草 <i>Plantago asiatica</i>	干燥全草	石菖蒲 <i>Acorus tatarinowii</i>	干燥根茎
虎杖 <i>Reynoutria japonica</i>	根、根茎	大青叶 <i>Isatidis folium</i>	叶	薄荷 <i>Mentha piperita</i>	全草
黄柏 <i>Cortex phellodendri chinensis</i>	树皮	当归 <i>Angelica sinensis</i>	根	槟榔片 <i>Arecae semen</i>	成熟种子
女贞子 <i>Ligustri lucidi fructus</i>	成熟果实	青皮 <i>Pericarpium citri</i>	干燥幼果	黄芪 <i>Astragali radix</i>	根
地锦草 <i>Euphorbia humifusa</i>	全草	川楝子 <i>Toosendan fructus</i>	干燥成熟果实	篇蓄 <i>Polygonum aviculare</i>	干燥地上部分
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	根、根茎	板蓝根 <i>Radix isatidis</i>	根、茎	三七 <i>Panax notoginseng</i>	根、茎
艾叶 <i>Artemisia argyi</i>	全草	小蓟 <i>Cephalanoptos segetum</i>	干燥地上部分	苦楝 <i>Melia azedarach</i>	干燥树皮
地榆 <i>Sanguisorba officinalis</i>	根	贯众 <i>Dryopteris bissetiaha</i>	根茎		

## 1.2 中草药提取液的制备

参照马秀慧等<sup>[7]</sup>的方法制备中草药提取液。将供试中草药于 60 ℃ 恒温干燥箱中烘至恒重,各取 50 g 放进药壶,加 500 mL 自来水,浸泡 30 min 后煎煮。其间武火煎煮 30 min,过滤第 1 道药液;药渣加 500 mL 自来水,文火煎煮 60 min,过滤第 2 道药液;药渣加 500 mL 自来水,武火煎煮 30 min,过滤第 3 道药液,将 3 次药液合并后浓缩至 50 mL 使总药质量浓度达到 1 g/mL,121 ℃ 高压灭菌后,置于 4 ℃ 冰箱保存待用。

## 1.3 维氏气单胞菌菌悬液的制备

参照李春涛等<sup>[8]</sup>的方法进行维氏气单胞菌菌悬液的制备。将斜面保藏的维氏气单胞菌 HXH1、HXY1、HXY3、J1Y4、J1Y5、J2Y4、J2Y6、WAB1 用接种环接种到营养琼脂平板上,置于 37 ℃ 恒温培养 24 h 后,取单菌落接种于无菌营养肉汤中,于 180 r/min、37 ℃ 恒温振荡培养 18 h,然后无菌操作取培养液 100 μL 均匀涂布于营养琼脂平板上,置于 37 ℃ 恒温培养 24 h 后用 0.85% 氯化钠溶液洗下菌苔制成菌悬液,采用稀释涂布平板法<sup>[9]</sup>测定菌悬液的含量,并将菌悬液含量稀释成  $1 \times 10^7$  CFU/mL。

## 1.4 优良抗菌中草药的筛选

以维氏气单胞菌 HXH1 为优良抗菌中草药

筛选用目的菌株,采用试管二倍稀释法<sup>[10]</sup>分别测定各中草药提取液对维氏气单胞菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。即取 10 支含 2.0 mL 无菌营养肉汤的带帽试管,无菌操作于第 1 支试管中加入 2.0 mL 中草药提取液使药液质量浓度为 1 000 mg/mL,混匀后从中取出 2.0 mL 加入第 2 支试管中使药液质量浓度为 500 mg/mL,然后依次相同操作稀释至第 9 支试管使药液质量浓度分别为 250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 mg/mL,并从第 9 支试管取出 2.0 mL 弃去,然后在 9 支试管中分别加入维氏气单胞菌菌悬液使菌含量为  $1 \times 10^6$  CFU/mL,第 10 支试管作空白对照,不加药液和菌悬液。将 10 支试管置于 28 ℃ 恒温静置培养 24 h 后,把无菌生长、稀释度最高的试管中的药液质量浓度作为最小抑菌质量浓度<sup>[11]</sup>,每个处理 3 个平行。

## 1.5 中草药复方制剂的配伍优化分析

以维氏气单胞菌 HXH1 为目的菌株,采用正交 *t* 值法<sup>[12]</sup>对 1.4 节筛选的 7 种优良抗菌中草药进行配伍优化,分别进行主药分析、辅药交互分析、剂量优化分析。

### 1.5.1 主药分析

根据正交 *t* 值法组方原则<sup>[12]</sup>设计  $L_{12}(2^7)$  正

交试验因素水平表(表2),并按照各组合水平将各中草药复配并参照1.2节的方法制成质量浓度为1 g/mL的中草药复方制剂,采用试管二倍

稀释法<sup>[10]</sup>测定各组合水平下制备的中草药复方制剂对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC,确定中草药复方制剂的主药组成。每个处理3个平行。

表2  $L_{12}(2^7)$  正交试验分析主药Tab.2  $L_{12}(2^7)$  orthogonal test for primary herb analysis

处理 Test	因素水平 Levels of factors						
	A	B	C	D	E	F	G
1	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)
2	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)
3	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)
4	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)
5	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)
6	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)
7	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)
8	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)
9	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)
10	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)
11	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)
12	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)

注:A为黄连;B为苏木;C为大黄;D为乌梅;E为鸡血藤;F为香薷;G为石榴皮。

Notes: A. *R. coptidis*; B. *C. sappan*; C. *R. et rhizoma rhei*; D. *F. mume*; E. *S. caulis*; F. *P. granatum*; G. *M. herba*.

### 1.5.2 辅药交互作用分析

根据1.5.1节筛选的中草药复方制剂的主药组成(黄连20 g+香薷20 g)的基础上,设计分析辅药(苏木、乌梅、石榴皮)交互作用的 $L_8(2^3)$ 正交试验因素水平表(表3),并按照各组合水平将各中草药复配并参照1.2节的方法制成质量浓度为1 g/mL的中草药复方制剂,采用试管二倍稀释法<sup>[10]</sup>测定各组合水平下制备的中草药复方制剂对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC,分析中草药复方制剂中辅药之间的交互作用。每个处理3个平行。

表3  $L_8(2^3)$  正交试验分析辅药交互作用Tab.3  $L_8(2^3)$  orthogonal test for adjuvant herb interaction

处理 Test	因素水平 Levels of factors		
	A	B	C
1	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)
2	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)
3	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)
4	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)
5	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)
6	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)
7	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)
8	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)

注:A为苏木;B为乌梅;C为石榴皮。

Notes: A. *C. sappan*; B. *F. mume*; C. *M. herba*.

### 1.5.3 剂量优化分析

根据1.5.1节和1.5.2节进一步确定的中草药复方制剂的主药(黄连、香薷)和辅药(苏木、石榴皮)设计 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表(表4),并按照各组合水平将各中草药复配并参照1.2节的方法制成质量浓度为1 g/mL的中草药复方制剂,采用试管二倍稀释法<sup>[10]</sup>测定各组合水平下制备的中草药复方制剂对维氏气单胞 HXH1 的 MIC,确定中草药复方制剂中主药与辅药的最佳配伍剂量。每个处理3个平行。

表4  $L_9(3^4)$  正交试验分析主药和辅药的最佳配伍剂量Tab.4  $L_9(3^4)$  orthogonal test for the optimal doses of primary and adjuvant herbs

处理 Test	因素水平 Levels of factors			
	A	B	C	D
1	1(60 g)	1(50 g)	1(20 g)	1(20 g)
2	1(60 g)	2(40 g)	2(15 g)	2(15 g)
3	1(60 g)	3(30 g)	3(10 g)	3(10 g)
4	2(50 g)	1(50 g)	2(15 g)	3(10 g)
5	2(50 g)	2(40 g)	3(10 g)	1(20 g)
6	2(50 g)	3(30 g)	1(20 g)	2(15 g)
7	3(40 g)	1(50 g)	3(10 g)	2(15 g)
8	3(40 g)	2(40 g)	1(20 g)	3(10 g)
9	3(40 g)	3(30 g)	2(15 g)	1(20 g)

注:A为黄连;B为香薷;C为苏木;D为石榴皮。

Notes: A. *R. coptidis*; B. *P. granatum*; C. *C. sappan*; D. *M. herba*.

## 1.6 中草药复方制剂对中华绒螯蟹维氏气单胞菌的体外抗菌效果分析

根据 1.5 节确定的最佳组合及配伍比例将各中草药复配并参照 1.2 节的方法制成质量浓度为 1 g/mL 的中草药复方制剂,并采用试管二倍稀释法<sup>[10]</sup>测定中草药复方制剂对维氏气单胞菌 HXY1、HXY3、J1Y4、J1Y5、J2Y4、J2Y6、WAB1 的 MIC。每个处理 3 个平行。

## 1.7 数据处理与分析

所有试验数据采用 SPSS 11.0 软件进行处理分析,以平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 优良抗菌中草药的筛选

由表 5 可知:黄连、苏木对维氏气单胞菌的

抑菌活性最高,其提取液对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC 为 7.81 mg/mL,其次为大黄、乌梅、鸡血藤、石榴皮、香薷,其提取液对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC 均为 15.63 mg/mL。五倍子、赤芍、青蒿、虎杖、黄柏、女贞子、地锦草、丹参等 8 种中草药的提取液对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC 为 31.25 ~ 62.5 mg/mL,地榆、广藿香、玉竹、金樱子、连翘等 10 种中草药的提取液对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC 为 62.5 ~ 125 mg/mL,苦参、车前草、大青叶、当归、青皮、川楝子等 25 种中草药的提取液对维氏气单胞菌 HXH1 的 MIC 为 125 ~ 500 mg/mL。因此,优选黄连、苏木、大黄、乌梅、鸡血藤、石榴皮、香薷作为中草药复方制剂配伍优化的候选中草药。

表 5 50 种中草药提取液对维氏气单胞菌 HXH1 的抑菌活性

Tab.5 Inhibitory activities of 50 kinds of herbs against *A. veronii* HXH1

中草药 Herb	MIC/(mg/mL)	中草药 Herb	MIC/(mg/mL)
黄连 <i>R. coptidis</i>	7.81 ± 0	苦参 <i>R. Sophorae</i>	125.00 ± 0
苏木 <i>C. sappan</i>	7.81 ± 0	车前草 <i>P. asiatica</i>	125.00 ± 0
大黄 <i>R. et rhizoma rhei</i>	15.63 ± 0	大青叶 <i>I. folium</i>	125.00 ± 0
乌梅 <i>F. mume</i>	15.63 ± 0	当归 <i>A. sinensis</i>	125.00 ± 0
鸡血藤 <i>S. caulis</i>	15.63 ± 0	青皮 <i>P. citri</i>	125.00 ± 0
石榴皮 <i>P. granatum</i>	15.63 ± 0	川楝子 <i>T. fuctus</i>	125.00 ± 0
香薷 <i>M. herba</i>	15.63 ± 0	板蓝根 <i>R. isatidis</i>	125.00 ± 0
五倍子 <i>R. chinensis</i>	31.25 ± 0	小蓟 <i>C. segetum</i>	125.00 ± 0
丹参 <i>S. miltiorrhiza</i>	31.25 ± 0	贯众 <i>D. bissetiaha</i>	125.00 ± 0
黄柏 <i>C. phellodendri chinsis</i>	31.25 ± 0	杜仲 <i>E. ulmoides</i>	125.00 ± 0
虎杖 <i>R. japonica</i>	31.25 ± 0	茉莉 <i>J. sambac</i>	125.00 ± 0
青蒿 <i>A. caruifolia</i>	31.25 ± 0	石菖蒲 <i>A. tatarinowii</i>	250.00 ± 0
女贞子 <i>L. lucidi fructus</i>	62.50 ± 0	芦根 <i>R. phragmitis</i>	250.00 ± 0
地锦草 <i>E. humifusa</i>	31.25 ± 0	熟地黄 <i>R. glutinosa</i>	250.00 ± 0
赤芍 <i>R. paeoniae rubra</i>	31.25 ± 0	牡丹皮 <i>M. cortex</i>	250.00 ± 0
艾叶 <i>A. argyi</i>	62.50 ± 0	黄芩 <i>S. baicalensis</i>	250.00 ± 0
地榆 <i>S. officinalis</i>	62.50 ± 0	夏枯球 <i>P. vulgaris</i>	250.00 ± 0
广藿香 <i>H. pogostemonis</i>	62.50 ± 0	合欢皮 <i>C. albiziae</i>	250.00 ± 0
玉竹 <i>P. odoratum</i>	62.50 ± 0	穿心莲 <i>A. paniculata</i>	500.00 ± 0
丁香 <i>S. aromaticum</i>	62.50 ± 0	薄荷 <i>M. piperita</i>	500.00 ± 0
茵陈 <i>A. scopariae</i>	125.00 ± 0	槟榔片 <i>A. semen</i>	500.00 ± 0
白头翁 <i>P. chinensis</i>	62.50 ± 0	黄芪 <i>A. radix</i>	500.00 ± 0
肉桂 <i>C. cassia</i>	125.00 ± 0	蒿薷 <i>P. aviculare</i>	500.00 ± 0
金樱子 <i>R. laevigata</i>	62.05 ± 0	三七 <i>P. notoginseng</i>	500.00 ± 0
连翘 <i>F. suspensa</i>	62.50 ± 0	苦楝 <i>M. azedarach</i>	500.00 ± 0

### 2.2 中草药复方制剂的配伍优化

#### 2.2.1 主药分析

由表 6 可知:大黄、鸡血藤的 M1 > M2,说明中草药复方制剂中加入大黄、鸡血藤对维氏气单

胞菌 HXH1 的 MIC 大于不加大黄、鸡血藤的 MIC,因此中草药复方制剂中舍去大黄、鸡血藤,最佳组合优选为黄连、苏木、乌梅、香薷、石榴皮。此外,由于中草药复方制剂中加入黄连、香薷对

维氏气单胞菌 HXH1 的抑菌活性较加入苏木、乌梅、石榴皮为辅料。乌梅、石榴皮更高,故将黄连、香薷作为主药,苏木、

表 6  $L_{12}(2^7)$  正交试验分析主药  
Tab. 6  $L_{12}(2^7)$  orthogonal test analysis for primary herbs

处理 Test	因素水平 Level of factors							MIC/ (mg/mL)	s	s <sup>2</sup>
	A	B	C	D	E	F	G			
1	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	7.81 ± 0	0	0
2	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	15.63 ± 0	0	0
3	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	7.81 ± 0	0	0
4	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	3.91 ± 0	0	0
5	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	7.81 ± 0	0	0
6	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	13.02 ± 4.51	4.51	20.38
7	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	15.63 ± 0	0	0
8	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	7.81 ± 0	0	0
9	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	13.02 ± 4.51	4.51	20.38
10	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	20.84 ± 9.02	9.02	81.33
11	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	15.63 ± 0	0	0
12	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	15.63 ± 0	0	0
M <sub>1</sub>	55.99	67.71	88.56	66.41	72.92	58.60	71.63	$n = 3 \quad \sum s^2 = 122.10$		
M <sub>2</sub>	88.56	76.84	55.99	78.14	71.63	85.95	72.93	$Se = (\sum s^2/n)^{1/2} = 6.38 \quad M_m = 12.05$		
$\bar{D}$	32.57	9.13	-32.57	11.73	-1.29	27.35	1.30	$t =  \bar{D} /Se \quad f = 12 \times (3-1) = 24$		
$\bar{t}$	5.10	1.43	5.10	1.84	0.20	4.29	0.20	$t_{0.05} = 1.958 + 2.45/(f-1) = 2.06$		
P	**	-	**	-	-	**	-	$t_{0.01} = 2.58 + 4.8/(f-2) = 2.80$		
								$M_M = M_m + \sum  \bar{D} /G = 21.71$		

注:A为黄连;B为苏木;C为大黄;D为乌梅;E为鸡血藤;F为香薷;G为石榴皮; \*\*表示显著, -表示不显著; s为标准差; f为自由度; G为分组组数; n为组内试验数; M<sub>m</sub>为各试验组均数之平均值; M<sub>1</sub>为1水平平均数之和; M<sub>2</sub>为2水平平均数之和;  $\bar{D} = M_2 - M_1$ ; M<sub>M</sub>为预期药效。

Notes: A. *R. coptidis*; B. *C. sappan*; C. *R. et rhizoma rhei*; D. *F. mume*; E. *S. caulis*; F. *P. granatum*; G. *M. herba*; \*\* . Significant difference; - . No significant difference; s. Standard deviation; f. Degree of freedom; G. Group number; n. Experiment number within group; M<sub>m</sub>. Mean of each experimental group; M<sub>1</sub>. Sum of means at level 1; M<sub>2</sub>. Sum of means at level 2;  $\bar{D} = M_2 - M_1$ ; M<sub>M</sub>. Expected drug effect.

### 2.2.2 辅药交互作用分析

由表7可知:苏木+乌梅,苏木+石榴皮,乌梅+石榴皮3个中草药组合中{11}<{12}<{21},说明苏木与乌梅、苏木与石榴皮、乌梅与石榴皮3个组合之间存在协同效应。然而,由于乌梅的M<sub>1</sub>>M<sub>2</sub>,说明中草药复方制剂中不加乌梅对维氏气单胞菌 HXH1 的抑菌效果更好。因此,优选苏木、石榴皮作为中草药复方制剂的辅药。

### 2.2.3 剂量优化分析

由表8可知:中草药复方制剂的最佳组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,即黄连50g、香薷40g、苏木10g、石榴

皮20g,最佳配伍比例为5:4:1:2。在该配伍比例下制备的中草药复方制剂对维氏气单胞菌 HXH1 的最小抑菌质量浓度分别为5.21 mg/mL。

### 2.2.4 中草药复方制剂对中华绒螯蟹维氏气单胞菌的体外抗菌效果

由表9可知:中草药复方制剂对中华绒螯蟹维氏气单胞菌具有良好的体外抗菌效果。具体表现在:中草药复方制剂对维氏气单胞菌 J1Y4、J2Y4 的 MIC 均为 3.91 mg/mL,对维氏气单胞菌 J1Y5、HXY1、HXY3、J2Y6、WAB1 的 MIC 均为 7.81 mg/mL。

表 7 辅药交互作用分析结果  
Tab.7 Analysis of adjuvant interaction

处理 Test	因素水平 Level of factors			交互作用 Adjuvant inteaction			MIC/ (mg/mL)	s	s <sup>2</sup>
	A	B	C	A + B	A + C	B + C			
1	1(20 g)	1(20 g)	1(20 g)	{11}	{11}	{11}	10.42 ± 4.51	4.51	20.38
2	1(20 g)	1(20 g)	2(0 g)	23.44 <sup>^</sup>	26.05 <sup>^</sup>	23.44 <sup>^</sup>	13.02 ± 4.51	4.51	20.38
3	1(20 g)	2(0 g)	1(20 g)	{12}	{12}	{12}	15.63 ± 0	0	0
4	1(20 g)	2(0 g)	2(0 g)	31.26	28.65	39.07	15.63 ± 0	0	0
5	2(0 g)	1(20 g)	1(20 g)	{21}	{21}	{21}	13.02 ± 4.51	4.51	20.38
6	2(0 g)	1(20 g)	2(0 g)	39.07	33.86	36.47	26.04 ± 9.02	9.02	81.33
7	2(0 g)	2(0 g)	1(20 g)	{22}	{22}	{22}	20.84 ± 9.02	9.02	81.33
8	2(0 g)	2(0 g)	2(0 g)	28.65	33.85	23.44	7.81 ± 0	0	0
M <sub>1</sub>	54.70	62.51	59.91	52.09	59.90	46.88	$n = 3 \quad \sum s^2 = 223.81$		
M <sub>2</sub>	67.71	59.91	62.51	70.33	62.51	75.53	$Se = (\sum s^2/n)1/2 = 8.64 \quad M_m = 15.30$		
D	13.01	-2.60	2.60	18.24	2.61	28.65	$f = 8 \times (3 - 1) = 16$		
t	1.51	0.30	0.30	2.11	0.30	3.32	$t =  D /Se$		
P	-	-	-	-	-	* *	$t_{0.05} = 1.958 + 2.45/(f-1) = 2.12$		
							$t_{0.01} = 2.58 + 4.8/(f-2) = 2.92$		
							$M_M = M_m + \sum  D /G = 23.77$		

注:A 为苏木;B 为乌梅;C 为石榴皮; \* \* 表示显著; - 表示不显著; ^ 表示存在协同效应;s 为标准差;f 为自由度;G 为分组组数;n 为组内试验数;M<sub>M</sub> 为预期药效;M<sub>m</sub> 为各实验组均数之平均值;D = M<sub>2</sub> - M<sub>1</sub>;M<sub>1</sub> 为 1 水平平均数之和;M<sub>2</sub> 为 2 水平平均数之和;{XX} 表示两种辅药取水平 X 时的 MIC 之和。

Notes: A. *C. sappan*; B. *F. mume*; C. *M. herba*; \* \*. Significant difference; -. No significant difference; ^ . There is synergy effect; s. Standard deriation; f. Degree of freedom; G. Group number; n. Experiment number within group; M<sub>M</sub>. Expected drug effect; M<sub>m</sub>. Mean of each experimental group; D = M<sub>2</sub> - M<sub>1</sub>; M<sub>1</sub>. Sum of means at level 1; M<sub>2</sub>. Sum of means at level 2; {XX}. Sum of MICs of two adjuvants at level X.

表 8 剂量优化分析结果  
Tab. 8 The dose optimization analysis results

处理 Test	因素水平 Level of factors				MIC/(mg/mL)	s	s <sup>2</sup>
	A	B	C	D			
1	1(60 g)	1(50 g)	1(20 g)	1(20 g)	15.63 ± 0	0	0
2	1(60 g)	2(40 g)	2(15 g)	2(15 g)	15.63 ± 0	0	0
3	1(60 g)	3(30 g)	3(10 g)	3(10 g)	20.84 ± 9.02	9.02	81.33
4	2(50 g)	1(50 g)	2(15 g)	3(10 g)	15.63 ± 0	0	0
5	2(50 g)	2(40 g)	3(10 g)	1(20 g)	5.21 ± 2.25	2.25	5.07
6	2(50 g)	3(30 g)	1(20 g)	2(15 g)	20.84 ± 9.02	9.02	81.33
7	3(40 g)	1(50 g)	3(10 g)	2(15 g)	15.63 ± 0	0	0
8	3(40 g)	2(40 g)	1(20 g)	3(10 g)	15.63 ± 0	0	0
9	3(40 g)	3(30 g)	2(15 g)	1(20 g)	13.02 ± 4.51	4.51	20.38
M <sub>1</sub>	52.10	46.89	52.10	33.86	$n = 3 \quad \sum s^2 = 188.11$		
M <sub>2</sub>	41.68	36.47	44.28	52.10	$Se = (\sum s^2/n)^{1/2} = 7.92$		
M <sub>3</sub>	44.28	54.70	41.68	52.10	$M_m = 15.34 \quad G = 9 \quad L = 3 \quad f = 9 \times (3 - 1) = 18$		
Sa	5.42	9.14	5.42	10.53	$t = L^{1/2} \times Sa/Se$		
t	1.19	2.00	1.19	2.30	$t_{0.05} = 1.73 + 2.66/(f-1) = 1.89$		
P	-	* *	-	* *	$t_{0.01} = 2.147 + 4.88/(f-2) = 2.45$		

注:A 为黄连;B 为香薷;C 为苏木;D 为石榴皮。 \* \* 表示显著, - 表示不显著;s 为标准差;f 为自由度,G 为分组组数,n 为组内试验数, M<sub>m</sub> 为各实验组均数之平均值, M<sub>1</sub> 为 1 水平平均数之和, M<sub>2</sub> 为 2 水平平均数之和, M<sub>3</sub> 为 3 水平平均数之和, Sa 为各因素中 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub> 的标准差。

. Notes: A. *R. coptidis*; B. *P. granatum*; C. *C. sappan*; D. *M. herba*; \* \*. Significant difference; -. No significant difference; s. Standard deriation; f. Degree of freedom; G. Group number; n. Experiment number within group; M<sub>m</sub>. Mean of each experimental group; M<sub>1</sub>. Sum of means at level 1; M<sub>2</sub>. Sum of means at level 2; M<sub>3</sub>. Sum of means at level 3; Sa. Standard deviation of M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> in each factor

表9 中草药复方制剂对  
中华绒螯蟹维氏气单胞菌的体外抗菌效果  
Tab.9 The *in vitro* antibacterial effect of Chinese  
herbal compound preparation against *A. veronii*

菌株 Strain	MIC/(mg/mL)
HXY1	7.81 ± 0
HXY3	7.81 ± 0
J1Y4	3.91 ± 0
J1Y5	7.81 ± 0
J2Y4	3.91 ± 0
J2Y6	7.81 ± 0
WAB1	7.81 ± 0

### 3 讨论

#### 3.1 中华绒螯蟹养殖用抗菌中草药的筛选

中华绒螯蟹是我国重要的名特优水产养殖品种,已经成为江苏、湖北、安徽、辽宁等省实施精准扶贫、拉动经济增长、促进农民增收的重要突破口。中草药含有多糖、生物碱、有机酸等活性成分,能够通过抑制细菌细胞壁的合成、破坏细胞膜的完整性和通透性、影响蛋白质和核酸的合成而发挥抑菌杀菌的作用<sup>[13]</sup>。因此,利用中草药替代抗生素控制中华绒螯蟹致病菌具有广阔的应用价值和发展前景。目前,我国已经开展了针对中华绒螯蟹腐败希瓦菌(*Shewanella putrefaciens*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)等致病菌的抗菌中草药的筛选工作<sup>[14-16]</sup>,但针对中华绒螯蟹维氏气单胞菌的抗菌中草药的筛选却极为薄弱。本研究分析了50种中草药对中华绒螯蟹维氏气单胞菌的抑菌活性,发现黄连、苏木的提取液对中华绒螯蟹维氏气单胞菌的抑菌活性最高,这与夏与晴等<sup>[3]</sup>、王洪彬等<sup>[17]</sup>的研究观点相同,但对维氏气单胞菌的MIC却与夏与晴等<sup>[3]</sup>、王洪彬等<sup>[17]</sup>的报道存在差异,可能与菌种来源、中草药产地不同有关<sup>[18]</sup>。

#### 3.2 中草药煎煮方法与体外抑菌评价方法的选择

中草药有效成分的提取方法主要有煎煮法、半仿生提取法、超临界萃取法和酶提取法等<sup>[19]</sup>。其中,煎煮法是我国最早使用的中草药有效成分的提取方法,因其不需要特殊仪器,简便易行,广泛应用于水产用中草药提取液的制备。夏与晴等<sup>[3]</sup>、王宝屯等<sup>[4]</sup>、朱成科等<sup>[5]</sup>、杨移斌等<sup>[10]</sup>、华亚南等<sup>[20]</sup>采用煎煮法制备了上百种中草药提取

液,在成功评价了中草药对水产动物病原菌的体外抑菌效果的同时,也证实了煎煮法适用于本实验中所有中草药的提取液的制备。因此,本研究选用煎煮法进行了中草药有效成分的提取。此外,中草药体外抑菌活性评价的方法主要有纸片法、平板扩散法和试管二倍稀释法<sup>[21]</sup>。其中,试管二倍稀释法不仅可较精细地测定某种药物的药性强弱,还可以观察到同种药物在不同质量浓度下对维氏气单胞菌的抑制和杀伤作用,是分析中草药对维氏气单胞菌抑菌活性的常用方法<sup>[6]</sup>。夏与晴等<sup>[3]</sup>通过试管二倍稀释法分析了中草药对4种水产养殖致病菌的抑菌作用,证实黄连提取液具有良好的抑菌效果,对嗜水气单胞菌、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的MIC分别为31.25、15.63、31.25和31.25 mg/mL;王洪彬等<sup>[17]</sup>采用试管二倍稀释法测定了中草药对3种水产动物致病菌体外抑菌效果,发现苏木提取液具有良好的抑菌活性,对美人鱼发光杆菌(*Phowbacterium damsela*)、嗜水气单胞菌、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)的MIC分别为62.50、62.50、31.25和7.81 mg/mL。因此,本实验选择试管二倍稀释法测定中草药对维氏气单胞菌的抑菌活性。

#### 3.3 中草药的联合配伍

加强中草药间的协同抗菌研究是提升水产用抗菌中草药制剂应用水平的重要突破口。夏与晴等<sup>[3]</sup>将乌梅和石榴皮进行配伍制成复方制剂,发现该复方制剂对嗜水气单胞菌、副溶血弧菌、弗氏柠檬酸杆菌的MIC降低至7.81 mg/mL,较乌梅和石榴皮单用时的MIC(15.63~31.25 mg/mL)显著减少;张文青等<sup>[22]</sup>将儿茶、五倍子、五味子、乌梅以4:2:4:1混合制成复方制剂,发现该复方制剂对嗜水气单胞菌的MIC降低至5.86 mg/mL,显著低于儿茶、五倍子、五味子、乌梅单用时的MIC(12.5 mg/mL)。这些研究均揭示了不同中草药之间的适当配伍具有显著的协同抗菌作用<sup>[6]</sup>。本实验发现将黄连、香薷、苏木、石榴皮以5:4:1:2配伍制成的复方制剂对维氏气单胞菌HXH1的MIC(5.21 mg/mL)显著低于黄连、香薷、苏木、石榴皮单用时的MIC(7.81~31.25 mg/mL),而且对其他中华绒螯蟹源维氏气单胞菌

株也具有良好的体外抗菌效果。究其原因,可能是因为黄连的主要抑菌活性成分是小檗碱<sup>[23]</sup>,香薷的主要抑菌活性成分是百里香酚、香荆芥酚<sup>[24]</sup>,苏木的主要抑菌活性成分是巴西苏木素<sup>[25]</sup>,石榴皮含量最高的抑菌活性成分是鞣质<sup>[26]</sup>,四者按适当比例配伍在一定程度上弥补了各自抑菌活性成分单一的缺陷,从而达到了相互补充且协同抗菌作用<sup>[27]</sup>。然而,本实验也发现黄连、香薷、苏木、石榴皮在配伍比例不当时的抑菌作用不如黄连单用时明显,这与童国忠等<sup>[28]</sup>的研究发现一致。因此,中草药复方制剂在组方设计时要按科学比例严格配伍,以增强其应用的有效性和实用性。

### 参考文献:

- [1] 姜光明, 钱彩源, 顾雪林, 等. 中华绒螯蟹和克氏原螯虾细菌性败血症病原学研究[J]. 水产养殖, 2016, 37(4): 46-51.
- JIANG G M, QIAN C Y, GU X L, et al. The etiological agents of bacterial septicemia in *Eriocheir sinensis* and *Procambarus clarkia*[J]. Journal of Aquaculture, 2016, 37(4): 46-51.
- [2] 周慧华, 黄晓东, 安健, 等. 中华绒螯蟹致病性维氏气单胞菌的分离鉴定、药敏特性及其组织病理学观察[J]. 南方农业学报, 2019, 50(8): 1851-1859.
- ZHOU H H, HUANG X D, AN J, et al. Isolation, identification and antibiotic susceptibility of pathogenic *Aeromonas veronii* in *Eriocheir sinensis* and its histopathological observations [J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(8): 1851-1859.
- [3] 夏与晴, 刘文珍, 傅松哲, 等. 25种中草药及其联合用药配伍对5种水产养殖常见致病菌的抑菌作用[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 7-14.
- XIA Y Q, LIU W Z, FU S Z, et al. Antimicrobial effects of 25 kinds of Chinese herbal medicines and their combinations on five routine pathogenic bacteria in aquaculture [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(1): 7-14.
- [4] 王宝屯, 颜远义, 毛灿, 等. 82种中草药及其复方对花鲈源维氏气单胞菌的体外抑菌效果[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2021, 53(3): 64-72.
- WANG B T, YAN Y Y, MAO C, et al. The antibacterial effect of 82 kinds of Chinese herbal medicines and their compounds on *Aeromonas veronii* from *Lateolabrax maculatus* *in vitro* [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2021, 53(3): 64-72.
- [5] 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.
- ZHU C K, WANG J, ZHOU Y, et al. Antimicrobial activities for 150 kinds of Chinese herbal medicines against *Aeromonas veronii in vitro*[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(1): 80-85, 96.
- [6] 马志宏, 李铁梁, 姜娜, 等. 中草药对致病性维氏气单胞菌体外抑菌活性及最优组方研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(6): 155-159.
- MA Z H, LI T L, JIANG N, et al. Study on the bacteriostatic activity and the best combination of Chinese herbs against pathogenic *Aeromonas veronii in vitro* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2011, 38(6): 155-159.
- [7] 马秀慧, 姜海波, 罗学评, 等. 中草药对罗非鱼源维氏气单胞菌体外抑菌效果研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(16): 174-176, 179.
- MA X H, JIANG H B, LUO X P, et al. Study on the *in vitro* antibacterial effect of Chinese herbal medicine on *Aeromonas veronii* from tilapia [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(16): 174-176, 179.
- [8] 李春涛, 陈霞, 张其中, 等. 100种中草药体外抑杀嗜水气单胞菌的药效研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(2): 27-34.
- LI C T, CHEN X, ZHANG Q Z, et al. Study on antibacterial effect of 100 Chinese herbal medicines on *Aeromonas hydrophila in vitro* [J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(2): 27-34.
- [9] 龚军辉, 王晶. 稀释涂布平板法计数活菌的方法简介[J]. 生物学教学, 2018, 43(2): 70-71.
- GONG J H, WANG J. Introduction to the method of counting viable bacteria by the dilution coating plate method [J]. Biology Teaching, 2018, 43(2): 70-71.
- [10] 杨移斌, 曹海鹏, 夏永涛, 等. 41种中草药对3种鲟源病原菌的体外抑菌效果[J]. 淡水渔业, 2013, 43(4): 80-84.
- YANG Y B, CAO H P, XIA Y T, et al. *In vitro* inhibitory effect of 41 Chinese herbs on three sturgeon-pathogenic bacteria[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(4): 80-84.
- [11] 周德庆. 微生物学教程[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2011: 176.
- ZHOU D Q. Microbiology course [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2011: 176.
- [12] 孙卫民, 孙瑞元. 中药方剂研究的正交  $t$  值法[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(1): 41-45.
- SUN W M, SUN R Y. Orthogonal  $t$ -value method in the study of Chinese medicine prescriptions [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 1992, 8(1): 41-45.
- [13] 梁利国, 阎斌伦, 张晓君, 等. 常用中草药对4种病原弧菌体外抗菌效果的研究[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 114-119.
- LIANG L G, YAN B L, ZHANG X J, et al. Study on the antibacterial effects of common Chinese herbs against four pathogenic *Vibrio sp. in vitro* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2010, 31(2): 114-119.

- [14] 徐欣,陈军昌. 五种中草药对河蟹腐败假单胞菌的抑菌作用[J]. 水产科学, 2002, 21(2): 24-25.  
XU X, CHEN J C. Inhibitbacteria effect of five kinds of herbs on *Pseudomonas putrefaciens* of *Eriocheir sinensis* [J]. Fisheries Science, 2002, 21(2): 24-25.
- [15] 吴惠仙,薛俊增. 中华绒螯蟹与日本沼虾对两菌株的中草药筛选[J]. 水利渔业, 2005, 25(3): 84-85.  
WU H X, XUE J Z. Screening of Chinese herbal medicine on two strains of *Eriocheir sinensis* and *Macrobrachium nipponense* [J]. Reservoir Fisheries, 2005, 25(3): 84-85.
- [16] 朱越雄,曹广力,刁慧勋,等. 蟹源温和气单胞菌的体外中药药敏试验[J]. 饲料工业, 2004, 25(2): 55-56.  
ZHU Y X, CAO G L, DIAO H X, et al. *In vitro* drug susceptibility test of *Aeromonas sobria* from crab [J]. Feed Industry, 2004, 25(2): 55-56.
- [17] 王洪彬,朱利霞,杨楠,等. 常用中草药对水产动物致病细菌体外抑菌效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(5): 1357-1366.  
WANG H B, ZHU L X, YANG N, et al. Study on antibacterial effects of common Chinese herbs against aquatic animal pathogens *in vitro* [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(5): 1357-1366.
- [18] 田甜. 鱼源嗜水气单胞菌的分离鉴定及耐药性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.  
TIAN T. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* strains from freshwater fish and their antibacterial resistance [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [19] 夏委. 中药有效成分提取方法研究进展[J]. 中国药业, 2016, 25(9): 94-97.  
XIA W. Research progress on extraction technology for effective components from Chinese medicine [J]. China Pharmaceuticals, 2016, 25(9): 94-97.
- [20] 华亚南,陈辉,张其中. 100种中草药水提物体外抑杀无乳链球菌的药效研究[J]. 生态科学, 2015, 34(3): 26-30.  
HUA Y N, CHEN H, ZHANG Q Z. *In vitro* efficacy of aqueous extracts of 100 Chinese herbal medicines against *Streptococcus agalactiae* from tilapia [J]. Ecological Science, 2015, 34(3): 26-30.
- [21] 王瑞旋,方伟彬,郭志勋,等. 苍术和番石榴的不同炮制方法及部位对水产病原菌抑制效果的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 132-136.  
WANG R X, FANG W B, GUO Z X, et al. Inhibitory effects of *Psidium guajava* and *Atractylodes lancea* on aquatic pathogenic bacteria [J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(5): 132-136.
- [22] 张文青,龚一富,金思,等. 中草药及其配伍对嗜水气单胞菌的抑菌作用[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 114-121.  
ZHANG W Q, GONG Y F, JIN S, et al. Antimicrobial tests of Chinese herbal medicines and their mixtures on *Aeromonas hydrophila* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 114-121.
- [23] 王荣. 不同炮制方法对黄连主成分含量及抗菌活性的影响[J]. 中国医药导报, 2012, 9(1): 58-60.  
WANG R. Influences of different processing methods on the content and the bacteriostasis effect in major constituent of *Coptis chinensis* [J]. China Medical Herald, 2012, 9(1): 58-60.
- [24] 胡浩斌,曹宏,简毓峰,等. 香薷有效成分提取与抑菌活性的研究[J]. 草业科学, 2007, 24(8): 36-39.  
HU H B, CAO H, JIAN Y F, et al. Study on extraction and antibacterial activity of active constituents of *Elsholtzia ciliata* Hyland [J]. Pratacultural Science, 2007, 24(8): 36-39.
- [25] 蒲荣,郭永灿,区敬华,等. 苏木对甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌抗菌活性研究及其活性成分分离[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(11): 1358-1359, 1361.  
PU R, GUO Y C, OU J H, et al. Study on antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* and active component against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2013, 10(11): 1358-1359, 1361.
- [26] 周梦宇,周本宏,郭咸希. 石榴皮鞣质作为天然抑菌剂的研究进展[J]. 中国药师, 2018, 21(11): 2037-2040, 2044.  
ZHOU M Y, ZHOU B H, GUO X X. Study advances in tannins from pomegranate rind as a natural antimicrobial agent [J]. China Pharmacist, 2018, 21(11): 2037-2040, 2044.
- [27] 李华,李强,付雷. 几种中草药对海水养殖中常见病原菌的抗菌作用[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(1): 6-11.  
LI H, LI Q, FU L. Antibacterial action of several Chinese herbal medicines to major marine pathogenic bacteria [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(1): 6-11.
- [28] 童国忠,石亚素,马剑茵,等. 中草药对海水养殖黄鱼病原弧菌抑菌效果研究[J]. 水产科学, 2007, 26(8): 436-439.  
TONG G Z, SHI Y S, MA J Y, et al. Antibacterial effect of Chinese herbal medicines on pathogenic bacteria in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* in marine cage culture [J]. Fisheries Science, 2007, 26(8): 436-439.

## Screening and compatibility optimization of herbs against *Aeromonas veronii* pathogenic to *Eriocheir sinensis*

CAO Haipeng<sup>1,2</sup>, ZHOU Huihua<sup>1,2</sup>, GU Ying<sup>1,2</sup>, CHEN Baiyao<sup>3</sup>, AN Jian<sup>3</sup>

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center for Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Lianyungang Marine and Fisheries Development Promotion Center, Lianyungang 222000, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to develop herb compound preparation against *Aeromonas veronii* pathogenic to *Eriocheir sinensis*, the present study used *A. veronii* HXH1 as the indicator strain to screen herbs with good inhibitory activities by tube dilution method, and on this basis, the compatibility of these herbs was optimized by orthogonal *t* design to make Chinese herbal compound preparation, and the *in vitro* antibacterial effect of the Chinese herbal compound preparation was further evaluated using tube dilution method. The results indicated that *Rhizoma coptidis*, *Caesalpinia sappan*, *Radix et rhizoma rhei*, *Fructus mume*, *Spatholobi caulis*, *Punica granatum*, and *Moslæ herba* showed highly inhibitory activities against *A. veronii*, with the minimum inhibitory mass concentrations (MICs) ranging from 7.81 to 31.25 mg/mL against *A. veronii* HXH1. However, *R. et rhizoma rhei*, *C. sappan* and *F. mume* were found to have negative effects. Thus, *R. coptidis*, *M. herba*, *C. sappan*, *P. granatum* were chosen as main components of the Chinese herbal compound preparation, and the best compatibility proportion was determined as 5:4:1:2, under which the MIC of the compound preparation was 5.21 mg/mL against *A. veronii* HXH1. In addition, the Chinese herbal compound preparation exhibited good activities against other *A. veronii* isolates from *E. sinensis*, showing the MICs of 3.91 to 7.81 mg/mL against strains HXY1, HXY3, J1Y4, J1Y5, J2Y4, J2Y6, WAB1. This study determined the main components and the best compatibility proportion of herb compound preparation against *A. veronii* pathogenic to *E. sinensis*, and can provide a basis for the herb control of diseases in *E. sinensis*.

**Key words:** herb; *Aeromonas veronii*; compatibility; *Eriocheir sinensis*