

复方中草药及其与抗生素联用对斜带石斑鱼 溶藻弧菌病的治疗效果

徐晓津^{1,2}, 李秀华³, 马一帆⁴, 李慧耀^{1,2}, 祁欣^{1,2},
郑江^{1,2}, 吕海龙^{1,2}, 鄢庆枇^{1,2*}

- 集美大学水产学院, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021;
- 福建天马科技集团股份有限公司, 福建 福州 350308;
- 厦门医学院附属第二医院中医科, 福建 厦门 361021;
- 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过药物体外抑菌效果及对斜带石斑鱼抗病力影响的研究, 筛选有效治疗斜带石斑鱼溶藻弧菌病复方中草药与中西药联用配方。用诃子、白芍、甘草比例分别为0.9 : 1.3 : 0.9、1.2 : 0.9 : 1.0和1 : 1 : 1的复方中草药对溶藻弧菌进行体外抑菌实验; 将质量分数为2.2%的复方中草药与中西药联用添加到基础饲料中设为实验组, 研究中西药对斜带石斑鱼溶藻弧菌病治疗效果。复方中草药实验组 I、II、III为投喂饲料中添加不同比例诃子、白芍、甘草, 中西药联用实验组 IV、V、VI分别为投喂饲料中添加不同比例诃子、白芍、甘草、恩诺沙星。结果显示, 复方中草药配方二药物质量浓度200 mg/mL, 为最佳配方。40 d病鱼死亡数量比较结果为对照组 II > 对照组 IV > 对照组 III > 实验组 III > 实验组 II > 实验组 I > 实验组 V > 实验组 VI > 实验组 IV > 对照组 I。实验组 I 投喂饲料加诃子、白芍、甘草比例为0.9 : 1.3 : 0.9的复方中草药, 实验组 IV 配方为诃子、白芍、甘草、恩诺沙星比例为0.9 : 1.3 : 0.9 : 1.3, 分别为治疗斜带石斑鱼溶藻弧菌病效果最好的复方中草药和中西药联用配方。研究表明, 中西药联用复方药效强于复方中草药, 均能较好治疗斜带石斑鱼溶藻弧菌病。

关键词: 斜带石斑鱼; 溶藻弧菌; 复方中草药; 恩诺沙星

中图分类号: S 943.334.42

文献标志码: A

石斑鱼是海南、福建、广东等中国南方地区的主导优良养殖品种之一。近年来, 随着石斑鱼养殖规模的不断扩大和养殖密度的增加, 各种病害频发^[1], 给石斑鱼养殖业带来严重的经济损失。溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是严重危害鱼、虾、贝等海水养殖动物的致病菌, 已有其对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[2-3]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[4]、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)^[5]等影响的报道, 溶藻弧菌导致的病害发病迅速,

死亡率较高^[10-11]。近年来石斑鱼溶藻弧菌病危害日益严重^[2-3, 5-9], 对其的防治是当前重点。随着抗生素的广泛应用, 耐药性细菌不断出现, 给治疗带来困难, 而且抗生素存在药物残留的问题^[6]。中草药在水产动物疾病防治方面起到良好的作用^[5, 7-9, 12], 研究与开发中草药治疗鱼病具有广阔的前景。复方中草药比单方中药药效更强。黄芩(*Scutellariae radix*)、葛根(*Puerarin radix*)、黄连(*Coptidis rhizoma*)、金银花(*Lonicera*

收稿日期: 2018-12-05 修回日期: 2019-03-26

资助项目: 福建省自然科学基金(2016NZ0001-3, 2018J01455); 国家自然科学基金(31702384); 省高校产学研合作项目(2016N5009); 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金(16PZY002SF18)

通信作者: 鄢庆枇, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

japonica)和板蓝根(*Radix radix*)等复方中草药能提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)免疫和抗病毒功能^[13]。很多学者已将中草药应用到对虾、鳗等病害防治^[14-16]的研究,但中草药治疗石斑鱼病害效果的研究尚未开展。

前期实验中分别将复方中草药和西药对溶藻弧菌进行体外抑菌实验,结果显示,60 mg/mL的诃子(*Chebulae fructus*)、白芍(*Paeoniae radix*)、甘草(*Glycyrrhizae radix*)组成三联复方中草药对溶藻弧菌的抑菌效果明显,抑菌圈直径为(25.822±0.876) mm。恩诺沙星对溶藻弧菌的抑菌圈直径为(30.549±1.576) mm,药物敏感性结果为高敏。本实验将此复方中草药与中西药联用药物拌入饲料,投喂人工攻毒的患有溶藻弧菌病的斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*),进行复方中草药与中西药联用配方治疗效果比较研究,探讨复方中草药、中西药联用合理、有效的使用剂量,为石斑鱼溶藻弧菌病防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 不同配方复方中草药对溶藻弧菌体外抑制效果的比较

供试菌种 溶藻弧菌菌液由集美大学水产学院国家海洋局渔用疫苗工程中心实验室自患病石斑鱼分离保存^[9]。将保存的溶藻弧菌分别用LB液体培养基于28℃下恒温培养8~12 h,取对数生长期的菌液。用磷酸盐缓冲液(PBS)调整菌液OD值为0.5(含菌量约为10⁸ CFU/mL),置于4℃冰箱保存备用。

体外抑菌实验复方三联中草药的制备 采用本实验室筛选的中草药三联配方诃子、白芍、甘草,中西药联用配方诃子、白芍、甘草、恩诺沙星。复方中草药配方一的诃子、白芍、甘草比例为0.9:1.3:0.9,复方中草药配方二的诃子、白芍、甘草比例为1.2:0.9:1.0,复方中草药配方三的诃子、白芍、甘草比例为1:1:1。诃子、白芍、甘草购于江阴天江药业有限公司。将中草药配方颗粒溶解于无菌蒸馏水中,置于玻璃小管中,再置于盛有沸水的烧杯,并隔水加热0.5 h,使中草药充分溶解。中草药颗粒剂溶液相当于生药的质量浓度为200、220和240 mg/mL。

复方三联中草药对溶藻弧菌体外抑菌活性测定 采用牛津杯法,在平板中倒入10 mL

灭菌后的LB固体培养基,待凝固后,用镊子轻轻在每个培养皿中等距离放入4个牛津杯,浸入培养基中。取15 mL的LB液体培养基混匀,并倒入平板,凝固后取出牛津杯,将溶藻弧菌稀释至10⁸ CFU/mL,用移液枪吸取0.1 mL菌悬液,滴入平板,用涂布器涂匀,用移液枪在1个孔中加入200 μL的无菌水为对照组,在另3个孔中用移液枪加入含生药240 mg/mL的3种不同药液200 μL,置于28℃条件下恒温培养18~24 h,观察抑菌圈,并用SupcreG1菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪(杭州迅数科技有限公司)测量抑菌圈大小,每个实验3次重复。计算平均值,进行统计分析,根据抑菌圈直径大小判定其抑菌能力的强弱。结果判定标准:抑菌直径≥20 mm为极敏感“+++”,15 mm≤抑菌直径<20 mm为高敏“++”,10 mm≤抑菌直径<15 mm为中敏“+”,抑菌直径<10 mm为低敏或无效“-”。

1.2 不同配方复方中草药与中西药联用药物治疗斜带石斑鱼溶藻弧菌病比较

实验药材 诃子、白芍、甘草购于厦门连福堂药店,将中草药用中草药粉碎机粉碎(FW177,天津市泰斯特仪器有限公司)至约150 μm,然后放入超微粉碎机(三清振动微粉机,SQW-60,山东三清不锈钢设备有限公司)中进一步粉碎,直至颗粒粒径大小为5~10 μm,收集超微药粉备用。组成诃子、白芍、甘草三联中草药复方与诃子、白芍、甘草、恩诺沙星中西药联用复方。实验基础饲料由福建天马科技集团股份有限公司提供。实验饲料分别添加复方中草药、中西药联用药物,对照组饲料中不添加。将复方中草药制剂中的3种中草药,于65℃烘箱中烘干24 h,将超微粉用孔径96 μm筛绢过筛。复方中草药按比例添加到斜带石斑鱼基础饲料中做成颗粒料,使其质量分数为2.2%。具体做法:将粉碎后饲料原料用孔径180 μm筛绢过筛,将各饲料成分混匀,用SLX-80型挤压机制作颗粒饲料,直径1.0 mm,于45℃下烘干,装袋且密封,在-18℃冰箱中保存。

攻毒实验及不同配药方案治疗石斑鱼溶藻弧菌病 人工感染。开始前先进行攻毒预实验,通过对斜带石斑鱼胸腔注射溶藻弧菌,以80%鱼发生病症但没有鱼死亡为实验菌液浓度。从福建漳浦某养殖场购买斜带石斑鱼,鱼体长(11±2) cm,在1 t循环水养殖系统中暂养1周,待

鱼体稳定后用于实验。将体质量相当的健康斜带石斑鱼随机分成实验组和对照组, 每组各20尾, 分别在18 °C的循环水养殖系统内适应性饲养1周。用 10^3 CFU/g的溶藻弧菌菌悬液对受试鱼进行攻毒。对照组斜带石斑鱼则用PBS缓冲液注射。然后分别把多组鱼转入养殖水体中进行饲养。实验设对照组 I (投喂饲料, 健康鱼)、对照组 II (投喂饲料, 病鱼组)。

复方中草药治疗方案。实验组 I (投喂饲料中加诃子、白芍、甘草比例为0.9 : 1.3 : 0.9)、实验组 II (投喂饲料中加诃子、白芍、甘草比例为1.2 : 0.9 : 1.0)、实验组 III (投喂饲料中诃子、白芍、甘草比例为1.0 : 1.0 : 1.0), 实验组均为溶藻弧菌攻毒鱼。

中西药联用治疗方案。实验组 IV (投喂饲料中加诃子、白芍、甘草、恩诺沙星比例为0.9 : 1.3 : 0.9 : 1.3), 实验组 V (投喂饲料中加诃子、白芍、甘草、恩诺沙星比例为1.2 : 0.9 : 1.0 : 0.9), 实验组 VI (投喂饲料中加诃子、白芍、甘草、恩诺沙星比例为1.0 : 1.0 : 1.0 : 1.0)。另与生产中常用药物进行治疗效果对比, 设对照组 III (投喂饲料中加2.2%板黄散, 购自无锡中水渔药有限公司)、对照组 IV (投喂饲料加质量分数为2.2%大黄五倍子散, 购自厦门市海约生物有限公司), 每个实验组和对照组均设置3个重复。实验开始后, 每日于8:00、17:00各投喂1次, 投饵量为鱼体体质量的2%~3%, 并根据生长、摄食情况作调整。待鱼饱食后吸出残饵。日换水1次, 换水量为总体积的1/3。实验饲料中分别添加复方中草药制剂、中西药联用制剂, 对照组饲料中不添加。

每天观察并记录斜带石斑鱼存活情况(观察40 d), 记录发病症状及死亡情况, 解剖检查死亡鱼, 计算累积死亡率(cumulative mortality rate, RCM, %)

$$RCM(\%) = [(N_0 - N_t)/N_0] \times 100\%$$

式中, N_0 为实验初鱼数, N_t 为实验结束鱼数, 进行相关指标检测。每一组鱼如仍有存活则继续以上方式投喂至鱼全部死亡。记录第1尾死亡天数、50%死亡天数、100%死亡天数)。

1.3 数据分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计与分析, 先对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 数据以平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果

2.1 复方中草药体外抑菌比较

复方中草药配方一、二、三的抑菌直径均为极敏感。相同药物水溶液浓度下, 复方中草药配方二治疗斜带石斑鱼溶藻弧菌病的药效比配方三、配方一的药效强。从减少药物用量且能达到较强抑菌效果方面评估, 复方中草药配方二中200 mg/mL的药物水溶液是最佳治疗石斑鱼溶藻弧菌病配方(表1)。

2.2 药饵组和对照组鱼的成活率

饲料中分别添加质量分数为2.2%复方中草药或中西药联用药物。攻毒实验6 d后, 各组斜带石斑鱼陆续出现发病、死亡现象(表2)。患病鱼有腹水, 腹腔内有淡黄色的液体, 腹部膨大, 脾脏出血、坏死; 肝脏肿大, 有出血点或呈苍白色, 肠壁充血, 肠内食物少。少数鱼死亡但未出现上述症状。攻毒后40 d内各组鱼的死亡数趋于稳定, 对攻毒后40 d各组的死亡率进行比较, 统计各组鱼全部死亡的时间。攻毒后40 d各组病鱼死亡数量比较: 对照组 II > 对照组 IV > 对照组 III > 实验组 III > 实验组 II > 实验组 I > 实验组 V > 实验组 VI > 实验组 IV > 对照组 I。实验结束时对照组 I (投饲料、健康鱼)均健康存活, 成活率为100%, 活动和摄食正常、无病症。对照组 II 在菌悬液注射后6 d, 死亡1尾, 7~25 d为死亡高峰期, 死亡20尾(图1)。

复方中草药投喂组 实验组 I、II、III 在菌悬液注射后8~12 d有1尾鱼死亡, 26~32 d为死亡高峰期, 44~51 d死亡率为100%。3组鱼40 d的死亡率分别为30.00%、32.00%和35.00%。病鱼死亡数量为实验组 I > 实验组 III > 实验组 II, 实验组 II 投喂饲料加诃子、白芍、甘草比例为0.9 : 1.3 : 0.9的复方中草药治疗溶藻弧菌病效果最好。而生产常用药治疗组对照组 III、对照组 IV 40 d死亡率分别为85.00%、95.00%, 死亡率高于本组配方用药。

中西药联用投喂组 实验组 IV、VI、V 40 d鱼死亡率分别为15.00%、28.00%、25.00%, 实验组 IV 鱼死亡率最低, 说明其药物治疗鱼病效果最好。而生产常用药治疗组对照组 III、对照组 IV 40 d鱼死亡率分别为85.00%、95.00%, 死亡率高于本组配方用药。

表1 三种复方中草药配方制备的组合物不同浓度溶液的抑菌情况

Tab. 1 *In vitro* bacteriostatic effect of different concentrations of traditional Chinese medicines I, II, III on *V. alginolyticus*

中药配方 Chinese herbal medicine	药物水溶液的浓度/(mg/mL) the concentration of Chinese medicines in water	抑菌圈直径/mm bacteriostatic circle(value)	相对敏感度 relative sensitivity
复方中草药配方一 Chinese medicines I	200	27.570±1.012	+++
	220	29.481±1.312	+++
	240	30.664±1.812	+++
复方中草药配方二 Chinese medicines II	200	32.370±1.512	+++
	220	34.711±1.517	+++
	240	36.688±2.712	+++
复方中草药配方三 Chinese medicines III	200	30.670±1.362	+++
	220	32.281±1.812	+++
	240	33.584±2.012	+++
对照组(无菌水) control group	0	0	-

注: “+++” 抑菌直径 ≥ 20 mm为极敏感, “++”.15 mm \leq 抑菌直径 < 20 mm为高敏, “+”.10 mm \leq 抑菌直径 < 15 mm为中敏, “-”.抑菌直径 < 10 mm为低敏或无效

Notes: sensibility of bacteriostatic activity according to the diameter of inhibition; diameter of inhibition is superior or equal to 20 mm, the sensibility is extremesensitivity(+++); diameter of inhibition is from 15 mm to 20 mm, the sensibility is high sensitivity(++); diameter of inhibition is from 10 mm to 15 mm, the sensibility is medium sensitivity "+". "-" diameter of inhibition is smaller than 10 mm, the sensibility is insensitivity

表2 投喂复方中草药与中西药75 d后实验组和对照组的成活率比较

Tab. 2 Comparison of survival of poison bait group and non-poison bait group after 75 days' feeding with compound Chinese medicine and western medicine (n=3)

处理组 treatment group	第1尾死亡天数/d days of the first death	50%死亡天数/d days of median lethal time	100%死亡天数/d days of 100% death	40 d累计死亡率/% cumulative mortality rate
对照组 I control group I			>75	0
对照组 II control group II	5.67±0.58	6.33±0.58	24.00±0.00	98.33±1.53
实验组 I test fish group I	7.33±0.58	25.00±1.00	42.67±1.15	29.00±1.00
实验组 II test fish group II	12.00±0.00	31.00±1.00	50.00±1.00	31.33±1.15
实验组 III test fish group III	8.67±1.15	29.00±1.00	47.33±0.58	32.33±2.52
实验组 IV test fish group IV	14.33±1.15	58.33±1.53	74.00±1.00	15.33±0.58
实验组 V test fish group V	12.67±0.58	53.67±1.53	63.67±1.53	27.00±1.00
实验组 VI test fish group VI	9.67±1.53	49.00±1.00	60.00±0.00	24.00±1.00
对照组 III control group III	5.33±1.53	7.00±0.00	40.67±1.15	85.00±0.00
对照组 IV control group IV	6.00±1.00	8.33±0.58	40.33±0.58	94.67±0.58

Notes: the different lowercase letters represent the significant difference ($P < 0.05$). Control I (basal feed healthy fish). The test fish groups containing the drugs feed additives at 2.2% respectively, were fed to *E. colioides*. Positive group II (basal feed diseased fish), test fish group I (the ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese medicines formulas I is 0.9 : 1.3 : 0.9), test fish group II (the ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese medicines formulas II is 1.2 : 0.9 : 1.0), test fish group III (the ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese medicines formulas III is 1 : 1 : 1), test fish group IV (the ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese and western medicines formulas IV is 0.9 : 1.3 : 0.9 : 1.3), test fish group V (the ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese and western medicines formulas V is 1.2 : 0.9 : 1.0 : 0.9), test fish group VI (the ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese and western medicines formulas VI is 1 : 1 : 1 : 1), control III (containing Banhuang San feed additives at 2.2%), control IV (containing rhubarb and *G. chinensis* feed additives at 2.2%)

饲料中添加中西药联用药物的斜带石斑鱼抵抗力明显高于对照组。投喂的饲料添加诃子、白芍、甘草中草药复方能较好治疗斜带石斑鱼溶藻

弧菌病。治疗效果优于生产常用药板黄散、大黄五倍子散。而诃子、白芍、甘草和恩诺沙星组成的中西药联用药物治疗病效果比复方中草药更好。

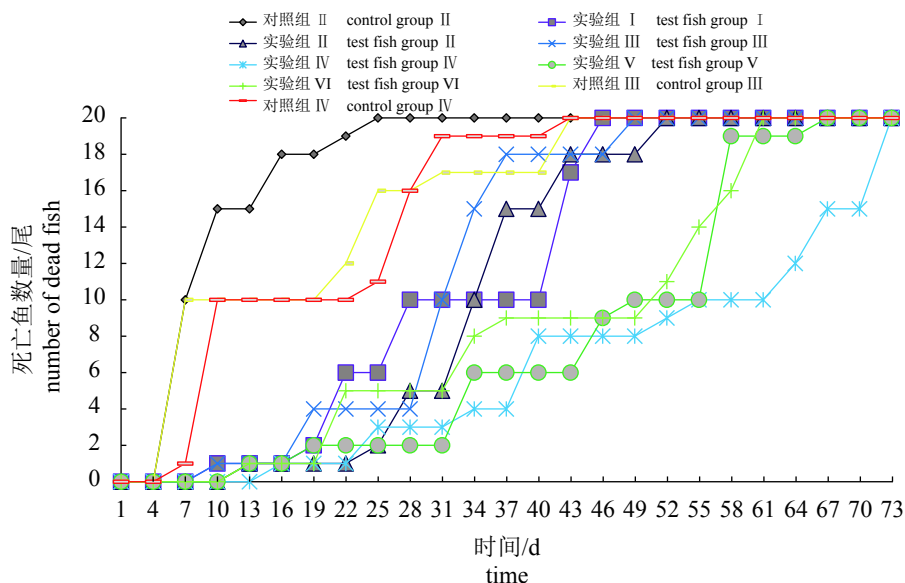


图 1 投喂复方中草药药饵不同时间段实验组与对照组死亡情况

Fig. 1 Mortality of fish fed with Chinese herbal formula bait for different time in experimental and control groups

3 讨论

多年以来,在海南等地的养殖石斑鱼陆续暴发较严重疾病,导致巨大经济损失,细菌性疾病限制了石斑鱼养殖业可持续发展^[17]。国内外学者与养殖业者已将中草药作为抗菌药物用于鱼类细菌疾病治疗,中草药无毒副作用,抑菌、杀菌效果明显^[18],鱼体无药物残留,达到水产健康养殖要求,抗生素治疗易产生病原菌抗性。复方中草药或中西药联用治疗鱼病已成为当前热点。复方中草药的体外抑菌作用测定结果对病害治疗用药剂量有参考作用,本研究首先进行体外细菌抑制实验,发现诃子、白芍、甘草比例为1:1:1,药物水溶液的质量浓度200 mg/mL为最佳配方,杀灭溶藻弧菌效果最好。但体外抗菌实验主要是体现所试中草药杀灭细菌的直接效果,而患细菌疾病鱼治疗效果的评估,还应进行养殖现场病鱼体内实验才能得以证实。复方中草药添加剂对南方鲇(*Silurus meridionalis*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、高体革鲷(*Scortum barcoo*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)均具有抗病促生长效果^[20-22]。复方中草药具有降低尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)死亡率,促进生长和提高免疫力等作用^[18-19]。中草药能治疗凡纳滨对虾哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)病^[23-24]。复方中草药(葛根、黄连、金银花、板蓝

根、黄芪、甘草、柴胡、当归、山楂、陈皮和茯苓)能提高凡纳滨对虾抗WSSV的性能,饲料中添加0.8%和1.2%药物的疗效最好^[13]。麻黄等6味中草药可增强鲫(*Carassius auratus*)免疫力^[25],复方中草药治疗黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)病疗效好^[26]。复方中草药药剂之间有协同作用,能较好地治疗鱼、虾等的病害。投喂的饲料添加诃子、白芍、甘草中草药复方能较好治疗斜带石斑鱼溶藻弧菌病,治疗效果优于生产常用药板黄散、大黄五倍子散。

恩诺沙星是畜禽和水产动物病害防治中常用抗菌药物,对多种细菌性疾病有较好疗效。恩诺沙星属喹诺酮类药物,广谱、低毒,对水产革兰氏阴性菌、阳性菌均具有良好杀灭作用,广泛用于养殖场病害防治,恩诺沙星联合用药后其在福瑞鲤(*Cyprinus carpio*)肌肉、肝脏、肾脏中的抗生素浓度呈先升高再降低的特点^[27]。不同水温(16 °C、25 °C)、不同给药剂量(10、20 mg/kg)和不同给药方式(肌注、口灌)等条件下,恩诺沙星的活性代谢产物环丙沙星在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血淋巴中均能检出,但含量均处于较低值^[28]。但在养殖生产中,抗生素的长期滥用易导致主要病原菌出现耐药性。中草药与抗生素类联用有一定的协同作用,可弥补中草药和抗菌素分别使用的不足^[27]。五倍子与恩诺沙星联

用对巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)病有防治效果,西药主治祛除病邪、消除病因,中草药主要提高机体的抗病能力^[19]。由黄连、黄柏等中药和盐酸环丙沙星组成的中西药复方,对肉鸽巴氏杆菌病的治愈率达到96.6%。中西药联用可提高疗效^[29]。以上学者研究结果与本研究结果相似,中西药联用投喂组配方为诃子、白芍、甘草、恩诺沙星比例为0.9:1.3:0.9:1.3治疗鱼病效果好,饲料中添加中西药联用药物组的斜带石斑鱼抵抗力明显高于对照组,而诃子、白芍、甘草和恩诺沙星组成的中西药联用治病效果比复方中草药更强。复方中草药与中西药联用防治细菌性疾病有较大的应用优势,开展其对抗细菌性鱼病的治疗具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 陈刚,黄建盛,张健东,等. 杂交石斑鱼(褐点石斑鱼♀×清水石斑鱼♂)仔、稚鱼的摄食与生长特性[J]. 水产学报, 2018, 42(11): 1766-1777.
Chen G, Huang J S, Zhang J D, et al. Feeding habits and growth characteristics of larvae and juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. polyphemus*♂)[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(11): 1766-1777(in Chinese).
- [2] 张燕飞,庞欢瑛,简纪常,等. 溶藻弧菌双组分调控系统KdpDE减毒活疫苗的构建及其免疫效果评价[J]. 水产学报, 2015, 39(10): 1558-1568.
Zhang Y F, Pang H Y, Jian J C, et al. Construction of an attenuated two-component regulatory system KdpDE strain of *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its immunogenic and protective effects as a vaccine[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(10): 1558-1568(in Chinese).
- [3] 余庆,李菲,王一兵,等. 广西北部湾大宗海水养殖鱼类卵形鲳鲹感染溶藻弧菌及其致病性研究[J]. 广西科学, 2018, 25(1): 68-73.
Yu Q, Li F, Wang Y B, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from marine cultured *Trachinotus ovatus* in Beibu gulf, Guangxi[J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(1): 68-73(in Chinese).
- [4] 曹际,马林,张文畅,等. 大黄鱼源溶藻弧菌的鉴定及其菌蜕制备[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 129-137.
Cao J, Ma L, Zhang W C, et al. Identification of *Vibrio alginolyticus* isolated from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and generation of *V. alginolyticus* ghosts[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 129-137(in Chinese).
- [5] 黄郁葱,蔡双虎,蔡佳,等. 红笛鯛*IRAK-1*基因克隆及哈维弧菌感染后的组织表达[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(3): 29-37.
Huang Y C, Cai S H, Cai J, et al. Cloning and tissue expression of *IRAK-1* gene from *Lutjanus sanguineus* in response to *Vibrio harveyi* infection[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(3): 29-37(in Chinese).
- [6] 徐先栋,谢珍玉,王世锋,等. 致病溶藻弧菌脂多糖对点带石斑鱼毒性和免疫原性的影响[J]. 海洋科学, 2010, 34(3): 47-51.
Xu X D, Xie Z Y, Wang S F, et al. Toxicity and immunogenicity of LPS from pathogenic *Vibrio alginolyticus* to grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. Marine Sciences, 2010, 34(3): 47-51(in Chinese).
- [7] Su B C, Lin W C, Chen J Y. Recombinant *Epinephelus lanceolatus* serum amyloid a as a feed additive: effects on immune gene expression and resistance to *Vibrio alginolyticus* infection in *Epinephelus lanceolatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 233-239.
- [8] Pang H Y, Qiu M S, Zhao J M, et al. Construction of a *Vibrio alginolyticus* *hopPmaJ* (*hop*) mutant and evaluation of its potential as a live attenuated vaccine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 76: 93-100.
- [9] 林桂芳,陈文博,苏永全,等. γ -干扰素对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)巨噬细胞胞内存活的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1241-1248.
Lin G F, Chen W B, Su Y Q, et al. Effects of IFN- γ on intracellular survival of *Vibrio alginolyticus* in macrophages of *Epinephelus awoara*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1241-1248(in Chinese).
- [10] 胡梦华,马立才,赵姝,等. 一株致病性溶藻弧菌的多重耐药与毒力基因分子分析[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 557-564.
Hu M H, Ma L C, Zhao S, et al. Molecular analysis of multi-drug resistance and virulence genes in a pathogenic *Vibrio alginolyticus*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 557-564(in Chinese).

- [11] 周维, 汤菊芬, 甘楨, 等. 溶藻弧菌耐药基因*qnr*的克隆及生物信息学分析[J]. 生物技术, 2015, 25(5): 414-419.
Zhou W, Tang J F, Gan Z, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of quinolone resistance gene from *Vibrio alginolyticus*[J]. Biotechnology, 2015, 25(5): 414-419(in Chinese).
- [12] 李睿, 翟华强, 田伟兰, 等. 中药煮散的历史源流及其与现代配方颗粒的对比性分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 965-969.
Li R, Zhai H Q, Tian W L, *et al.* Comparative analysis between origin of cooked traditional Chinese medicine powder and modern formula granules[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(5): 965-969(in Chinese).
- [13] 陈辉辉, 涂晨凌, 唐杨, 等. 复方中草药对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫因子活性及抗WSSV的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(11): 1766-1778.
Chen H H, Tu C L, Tang Y, *et al.* Effects of compound Chinese herbs on growth, digestive enzyme, immunologic factors and WSSV-resistant capacity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(11): 1766-1778(in Chinese).
- [14] 黄永春, 陈辉辉, 涂晨凌, 等. 5种中草药对凡纳滨对虾生长和抗病力的影响[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(1): 86-90.
Huang Y C, Chen H H, Tu C L, *et al.* Effects of five species of Chinese herbs on the growth and disease-resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2016, 44(1): 86-90(in Chinese).
- [15] 李忠琴, 关瑞章, 汪黎虹, 等. 中药对鳗鲡病原菌的体外抑制作用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(3): 306-311.
Li Z Q, Guan R Z, Wang L H, *et al.* Antibacterial activity of Chinese herbs against pathogenic bacteria from eels *in vitro*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition), 2011, 37(3): 306-311(in Chinese).
- [16] 朱苏琴, 纪荣兴, 苏永全, 等. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)鳃粘液粘附特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 389-393.
Zhu S Q, Ji R X, Su Y Q, *et al.* Study on adhesion characteristics of *Vibrio fluvialis* to the gill mucus of *Pseudosciaena crocea*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 389-393(in Chinese).
- [17] 孙晓飞, 郭伟良, 谢珍玉, 等. 棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的快速筛选[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 54-60.
Sun X F, Guo W L, Xie Z Y, *et al.* Rapid screening of Chinese herbal immunostimulants for *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(1): 54-60(in Chinese).
- [18] 巩华, 刘春花, 赵长臣, 等. 中草药预混料对罗非鱼生长性能和免疫抗病力的影响[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(2): 43-49.
Gong H, Liu C H, Zhao C C, *et al.* Effects of herbal premix on the growth performance and immune function of tilapia (*Oreochromis spp.*)[J]. China Fishery Quality and Standard, 2017, 7(2): 43-49(in Chinese).
- [19] 马驿, 陈均玉, 陈钦旭, 等. 中西药联合对人工诱发鸡霍乱的防治效果[J]. 中国兽医杂志, 2012(7): 69-71.
Ma Y, Chen J Y, Chen Q Y, *et al.* Chinese and western medicine combined control effect of artificial induced chicken cholera[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2012(7): 69-71(in Chinese).
- [20] 李霞, 马驰原, 李雅娟, 等. 中草药对牙鲆免疫力的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(3): 60-67.
Li X, Ma C Y, Li Y J, *et al.* Effect of Chinese herbal medicine on immunity of flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(3): 60-67(in Chinese).
- [21] 梁拥军, 孙向军, 孙砚胜, 等. 复方中草药对宝石鲈抗氧化能力及免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 7026-7029.
Liang Y J, Sun X J, Sun Y S, *et al.* Effect of the compound Chinese herbal medicine on the antioxidant capacity and immune function of perch[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(15): 7026-7029(in Chinese).
- [22] 李超, 张其中, 杨莹莹, 等. 不同剂量复方中草药免疫增强剂对草鱼生长性能和免疫功能的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 534-540.
Li C, Zhang Q Z, Yang Y Y, *et al.* Effect of different doses of compound Chinese herbal immunostimulant in feed on the growth and immune function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(4): 534-540(in Chinese).
- [23] 董晓慧, 李明, 叶继丹. 复方中草药对凡纳滨对虾生长

- 性能和血清非特异免疫因子的影响[J]. [大连水产学院学报](#), 2009, 24(2): 162-165.
- Dong X H, Li M, Ye J D. Effect of Chinese herbal medicines on growth and non-specific immunity in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. [Journal of Dalian Fisheries University](#), 2009, 24(2): 162-165(in Chinese).
- [24] 汤菊芬, 黄瑜, 蔡佳, 等. 中草药复合益生菌制剂对凡纳滨对虾生长、抗病力及水质的影响[J]. [广东海洋大学学报](#), 2015, 35(6): 47-52.
- Tang J F, Huang Y, Cai J, *et al.* Effects of a probiotics combined with Chinese herbal medicine on growth performance, water quality and resistance to diseases for *Litopenaeus vannamei*[J]. [Journal of Guangdong Ocean University](#), 2015, 35(6): 47-52(in Chinese).
- [25] 盛竹梅, 马志宏, 黄文, 等. 复方中草药对鲫鱼免疫力的影响[J]. [四川农业大学学报](#), 2012, 30(4): 463-467.
- Sheng Z M, Ma Z H, Huang W, *et al.* Effect of Chinese herbal compounds on immunity of crucian[J]. [Journal of Sichuan Agricultural University](#), 2012, 30(4): 463-467(in Chinese).
- [26] 苟小兰, 王利. 复方中药对黄颡鱼小肠结肠炎耶尔森氏菌病的防治[J]. [科学养鱼](#), 2013, 29(8): 59-60.
- Gou X L, Wang L. Disease prevention of compound Chinese herbal medicine on *Pelteobagrus fulvidraco* infection with *Yersinia enterocolitica*[J]. [Scientific Fish Farming](#), 2013, 29(8): 59-60.
- [27] 李改娟, 刘艳辉, 戴欣, 等. 不同水温联合用药中恩诺沙星在鲤体内的药代动力学及残留的影响[J]. [吉林农业大学学报](#), 2017, 39(4): 471-476.
- Li G J, Liu Y H, Dai X, *et al.* Effects of combined drug administration at different water temperature on pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in carp[J]. [Journal of Jilin Agricultural University](#), 2017, 39(4): 471-476(in Chinese).
- [28] 郑宗林, 叶金明, 李代金, 等. 恩诺沙星及其代谢产物在中华绒螯蟹血淋巴中的比较药代动力学[J]. [海洋渔业](#), 2011, 33(1): 74-82.
- Zheng Z L, Ye J M, Li D J, *et al.* On comparative pharmacokinetic of enrofloxacin in hemolymph of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*[J]. [Marine Fisheries](#), 2011, 33(1): 74-82(in Chinese).
- [29] 舒刚, 唐力, 赵小玲, 等. 陈白散对肉鸡生长性能与胴体性能的影响[J]. [中国兽医杂志](#), 2012(7): 71-73.
- Shu G, Tang L, Zhao X L, *et al.* Effects of Chen Baisan on growth performance and carcass performance of Chinese broilers[J]. [Journal of Veterinary Medicine](#), 2012(7): 71-73(in Chinese).

Effects of traditional Chinese compound prescription and antibiotics treating in *Vibrio alginolyticus* diseases of *Epinephelus coioides*

XU Xiaojin^{1,2}, LI Xiuhua³, MA Yifan⁴, LI Huiyao^{1,2}, QI Xin^{1,2},
ZHENG Jiang^{1,2}, LÜ Hailong^{1,2}, YAN Qingpi^{1,2*}

(1. Fisheries College, Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Tianma Science and Technology Group Co., Ltd., Fuzhou 350308, China;

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361021, China;

4. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The antibacterial effect of the drugs against *Vibrio alginolyticus* *in vitro* and the drugs on the resistance to diseases of *Epinephelus coioides* were studied. This study aimed to screen traditional Chinese medicines formulas and Chinese and western medicines formulas which can prevent *V. alginolyticus* diseases of *E. coioides*. We had the bacteriostatic test on traditional Chinese medicines formulas against *V. alginolyticus* *in vitro*. The ratios of *Terminalia chebula*, *Radix paeoniae* and *Glycyrrhiza uralensis* of Chinese medicines formulas I, II, III were 0.9 : 1.3 : 0.9, 1.2 : 0.9 : 1.0, and 1 : 1 : 1, respectively. The groups with 3 replicates per treatment of feed containing the drugs feed additives at 2.2% respectively, were fed to *E. coioides*. The ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* were different in Chinese medicines formulas trial group I, II, III. The ratios of *T. chebula*, *R. paeoniae*, *G. uralensis* and enrofloxacin were different in Chinese and western medicines formulas trial group IV, V. Results revealed that the concentration of Chinese medicines formulas III (200 mg/mL) was the best formula. The mortality for 40 d in test groups were as follows: control group II > control group IV > control group III > trial group III > trial group II > trial group I > trial group V > trial group VI > trial group IV > control group I. The ratio of *T. chebula*, *R. paeoniae* and *G. uralensis* of Chinese medicines formula I was 0.9 : 1.3 : 0.9. The ratios of *T. chebula*, *R. paeoniae*, *G. uralensis* and enrofloxacin in Chinese and western medicines formula were different. These are the best formulas. The Chinese and western medicines formula is better than the Chinese medicines formula. Results showed that by adding the formulas, the capacity of disease resistance can be improved.

Key words: *Epinephelus coioides*; *Vibrio alginolyticus*; Chinese medicines formula; enrofloxacin

Corresponding author: YAN Qingpi. E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of the Fujian Province, China (2016NZ0001-3, 2018J01455); National Natural Science Foundation of China (31702384); Cooperation Project between Industry and University from Fujian Provincial Department of Science and Technology (2016N5009); Fund of Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education (16PZY002SF18)