

文章编号: 1673-1689(2011)02-0178-07

复方植物提取物对嗜水气单胞菌的抑菌作用

卢春霞¹, 王洪新^{*1,2}, 吕文平¹, 徐跑³, 朱健³,
谢骏³, 刘波³, 周群兰³, 杨乐¹, 王远辉¹

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要: 采用琼脂扩散法和二倍稀释法测定了植物提取物的抑菌活性, 用正交 *t* 值法对复合组方进行优化, 并且采用 HPLC 法对组方进行有效成分分析。结果筛选出抑菌效果佳的植物提取物为茶多酚、五倍子、大黄、黄芩、诃子。筛选出优化方的药味组成为茶多酚、五倍子、大黄 3 种提取物, 最佳剂量配比为质量比 5: 2: 1。本组方对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度 MIC 达到 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本组方有效成分质量分数为: 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) 12.6%; 表儿茶素(EC) 7.57%; 表没食子儿茶素(EGC) 4.26%; 表儿茶素没食子酸酯(ECG) 4.19%; 儿茶素(1.03%); 没食子酸 1.18%。

关键词: 植物提取物; 嗜水气单胞菌; 高压液相色谱; 最小抑菌浓度(MIC)

中图分类号: S 941.4

文献标识码: A

Antimicrobial Activity of Plant Extracts against *Aeromonas hydrophila*

LU Chunxia¹, WANG Hongxin^{*1,2}, LU Weiping¹, XU Pao³, ZHU Jian³,
XIE Jun³, LIU Bo³, ZHOU Qunlan³, YANG Le¹, WANG Yuanhui¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The objective of this study is to choose a novel antibacterial substance from Chinese herbs to control bacteriosis of fishes, based on the result of the agar well diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC). The result showed that the extracts from Tea polyphenol, Galla Chinensis, Rhubarb, Scutellaria and Terminalia chebula exhibited excellent antibacterial activity. And the optimum formation of Traditional Chinese herbs is Tea polyphenol, Galla Chinensis and Rhubarb at ratio 5: 2: 1 (w/w/w), the minimum inhibitory concentration (MIC) is 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The contents of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), catechin, gallic acid were 12.6%, 7.57%, 4.26%, 4.19%, 1.03%, 1.18% in the compound, respectively.

Key words: plant extracts, *Aeromonas hydrophila*, HPLC, minimum inhibitory concentration(MIC)

收稿日期: 2010-04-02

基金项目: 农业部重点实验室开放研究基金项目(BZ2009-24)。

作者简介: 卢春霞(1978-), 女, 河南虞城人, 食品营养与安全博士研究生。Email: shzlcx2002@163.com

* 通信作者: 王洪新(1964-), 男, 江苏徐州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品功能因子方面的研究。Email: whx1964@126.com

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于弧菌科、气单胞菌属,是嗜温、有动力的气单胞菌群,普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤和人类粪便中,具有广泛的致病性,对水产动物^[1-2]、两栖动物^[3]和哺乳动物^[4-5]均有致病性。在水产上,是鱼类最常见的致病菌,对淡水鱼感染称为细菌性败血症,发病率达到90%以上,死亡率高达65%以上。曾在上海、江苏、浙江、安徽、广东、广西、福建、湖南、湖北、河南、河北、北京、天津、四川、陕西、山西、云南、内蒙古、山东、辽宁、吉林等20多个省、市、自治区广泛流行,受危害的鱼种类有异育银鲫、白鲫、鲫、团头鲂、鲢、鳙、鲮、鲤、鳊、黄鳝、草鱼、白鲢、加州鲈、银鲌、胡子鲶等多种淡水养殖鱼类^[6]。该病被认为是流行地区最广,流行季节最长,危害淡水鱼种类最多,造成损失最大的一种传染病。已引起国内外水产界、兽医学界和医学界学者的高度重视。

目前,由嗜水气单胞菌引起的水产动物的疾病防治多采用抗生素。但是,抗生素的滥用造成耐药性的增强,不仅给鱼病的治疗带来困难,对人体也造成巨大的危害^[7]。而植物提取物以其天然性、无残留、毒副作用小、不产生耐药性、价格低廉等优点,作为抗生素代替品以解决抗药性和药物残留问题倍受瞩目。近年来,植物提取物作为免疫增强剂和治疗药物在水产上(罗非鱼^[8-9]、异育银鲫^[10]、鲤^[11-12])的应用逐渐增多。因此,开发更多有抑菌效果的植物提取物是养殖业急需解决的问题。作者在借鉴传统中草药理论研究和实践的基础上选出11种中草药,并测定其体外抑菌活性,从中筛选出对嗜水气单胞菌有抑制作用的植物提取物,制备成复方制剂,进行体外抑菌活性及有效成分含量的研究,为水产动物疾病防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 嗜水气单胞菌 IB101, JG101, 4LNS301, CCH201, LNB101, CG101: 由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心惠赠; BSK-10, TPS-30 由浙江省淡水水产研究所提供。

1.1.2 培养基 普通肉汤培养基为牛肉膏 3.0g, 蛋白胨 10.0g, 氯化钠 5.0g, 琼脂 20g, 高压蒸汽灭菌。

1.1.3 供试植物样品 茶多酚: 购自陆圣康源科技开发有限公司; 五倍子、大黄、黄芩、诃子、金银花、穿心莲、紫锥菊、牛蒡叶、苦参: 购自无锡汇华强盛医药连锁有限公司; 大蒜: 购自农贸市场。

1.1.4 试剂 甲醇: 色谱纯, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素: 阿拉丁试剂公司产品, 纯度大于98%; 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(EGC)、儿茶素、没食子酸: 成都曼思特生物科技有限公司, 纯度大于98%。

1.1.5 仪器 800型离心机: 北京医学仪器厂; SW-CJ2F超净工作台: 苏州净化设备厂制造; 电子天平: Sartorius Co, Germany 公司制造; PW-30精密培养箱; UV-2100分光光度仪: 尤尼柯上海仪器有限公司制造; 1100-高效液相色谱仪: 美国 Agilent 公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 植物提取物的制备 按文献[13-17]制备。将制备的醇提取物用30%的乙醇配成0.5mg/mL的质量浓度, 置4℃冰箱中保存待用。

1.2.2 菌悬液的制备 将菌株融化, 用接种针在固体培养基上划线, 37℃培养24h后, 挑取单个菌落, 接种到液体培养基上振荡培养12~16h。采用麦氏比浊法将菌液用液体培养基稀释到合适浓度。实验中菌液浓度为 10^6 CFU/mL。

1.2.3 抗菌活性的测定

1) 滤纸方法(琼脂扩散法): 滤纸片(6mm)经灭菌后, 分别浸入提取物, 无菌条件下贴在涂有菌液的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上, 并做空白对照, 37℃培养24h后测抑菌圈直径(尽可能地使纸片的含药量一致), 每种提取物8次重复。

2) 二倍稀释法: 通过抑菌圈的测定筛选出有抑菌效果的植物提取物进行最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)的测定。采用二倍稀释法^[18]对植物提取物进行梯度稀释至0.006~12.5mg/mL的12个2倍系列浓度。然后在盛有1.9mL肉汤培养基的试管中分别加入100μL稀释后的药液, 最后一管不加提取物作空白对照, 最后加入细菌悬液, 使细菌浓度达到 10^6 CFU/mL。37℃培养24h, 625nm测定吸光值, 无菌生长的试管中的药物浓度即为该药物的最小抑菌浓度(MIC)。试验重复3次。

1.2.4 正交t值法优化组合复方及剂量配比 从抑菌活性试验中筛选出抑菌效果佳的提取物, 利用正交t值法^[19], 以最小抑菌浓度为检测指标, 对筛选出的提取物进行组方和剂量优化。

1) 正交t值法优化组方原则: 将筛选出来的提取物其中每种为一个因素, 其代号随机选定, 分别为A、B、C、D、E, 每种提取物均有给药和不给药两

个水平,设水平1为给药,水平2为不给药,结果见表1。各药在每组方中的用量采用正交试验中效果最优的剂量组合。试验选用 $L_{12}(2^{11})$ 正交 t 值表^[20]进行试验安排,各组通过二倍稀释法测定最小抑菌浓度(MIC),每组3个重复,数据越小,抑菌效果越好。

表1 复方5种成份因素水平分析表

Tab.1 Factor level charts of five composition

水平	因素				
	A 五倍子	B 茶多酚	C 大黄	D 黄芩	E 诃子
1	30	50	30	10	10
2	0	0	0	0	0

2) 辅药交互作用的正交 t 值法:用正交表着重分析辅药彼此间的交互作用,以最小抑菌浓度(MIC)为检测指标,每组3个重复。

3) 正交 t 值法优化剂量配比:各因素确定后,采用正交表进行剂量优化,以原用剂量为中剂量,适当增减,以最小抑菌浓度(MIC)为检测指标,每组3个重复。

1.2.5 HPLC法测定组方有效成分

1) 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil-C18 柱(200 mm×4.6 mm);流动相:0.05% 甲醇水溶液,甲醇(B)。梯度洗脱:0.01~18.0 min, 90%~20% A,

18.00~24.00 min, 20%~10% A, 24.00~25.00 min, 10%~90% A; 25.00~30.00 min, 90%~90% A;柱温:35℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:5 μ L。

2) 溶液的制备:分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、EGCG、EC、EGC、ECG、儿茶素、没食子酸对照品1 mg,置10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为100 μ g/mL的对照品混合溶液。称取样品50 mg,置100 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度为500 μ g/mL的样品混合溶液。

2 实验结果

2.1 抑菌活性的测定

2.1.1 滤纸方法(琼脂扩散法) 11种植物提取物对嗜水气单胞菌的抑菌圈测定结果见表2。在0.5 g/mL的浓度下,茶多酚、五倍子抑菌作用最明显,大黄、黄芩、诃子提取物次之,其余提取物没有抑菌效果。

2.1.2 最小抑菌浓度的测定 不同植物提取物对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度(MIC)测定结果见表3。五倍子、茶多酚的提取物抑菌作用明显,最小抑菌质量浓度为0.097~0.390 mg/mL;大黄、黄芩、诃子提取物次之,MIC为0.78~3.125 mg/mL。

表2 提取物对嗜水气单胞菌的抑菌圈测定

Tab.2 Inhibition zone of extracts against *A. hydrophila*

菌株	茶多酚	五倍子	大黄	黄芩	诃子
IB101	19.87±0.61	17.84±0.84	13.88±0.59	11.96±0.92	12.30±1.13
JG101	20.13±0.48	17.75±0.68	14.09±0.74	12.60±0.58	10.99±0.73
TPS 30	20.63±0.52	18.25±0.94	14.17±0.41	12.67±0.82	12.05±0.82
BSK-10	20.88±1.36	17.75±0.53	14.43±0.68	11.58±0.63	11.33±0.52
4LNS301	21.08±0.91	18.54±1.15	13.76±0.93	12.79±1.04	12.01±0.96
CCH 201	20.69±1.12	18.78±0.96	12.97±1.08	13.03±0.95	11.84±0.81
LNB101	21.14±0.72	18.92±0.88	14.43±0.68	12.38±0.72	12.15±1.08

表3 提取物对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度

Tab.3 MIC of extracts against *A. hydrophila*

提取物	茶多酚	五倍子	大黄	黄芩	诃子
IB101	0.195	0.195	1.560	3.125	1.56~3.125
JG 101	0.195	0.097~0.195	0.780~1.560	1.560	1.560
TPS 30	0.390	0.195	1.560	1.560	1.560

续表 3

提取物	茶多酚	五倍子	大黄	黄芩	诃子
BSK-10	0.390	0.195	0.780	1.560	1.560
4LNS301	0.195	0.195	0.780	1.56~3.125	1.56~3.125
CCH201	0.195~0.390	0.097~0.195	0.780~1.560	1.560	1.560
LNB101	0.390	0.195	1.560	1.56~3.125	1.560

2.2 正交 *t* 值法优化复合组方和剂量配比

2.2.1 正交 *t* 值法优化复合组方 复合组方的正交 *t* 值法 $L_{12}(2^{11})$ 的组方原则见表 4。B 茶多酚有明显的抑菌效果, 故为主药。五倍子、诃子、大黄、黄芩提取物为辅药, 本方抗菌作用最佳组合为 $A_1 B_1 C_2 D_2 E_2$ (茶多酚, 五倍子)。

2.2.2 辅药交互作用的正交 *t* 值法 辅药交互作用抑菌结果见表 5。五倍子、大黄(AC); 大黄、黄芩(CD); 大黄、诃子(CE) 三组组合有协同作用, 五倍子、黄芩(AD); 五倍子、诃子(AE); 黄芩、诃子(DE)

有拮抗作用。因为 C 药和任一种药都有协同作用, 故选用 C 药, A 药在最佳组合里出现, 所以, 辅药选择 A 药五倍子和 C 药大黄。

2.2.3 正交 *t* 值法优化剂量配比 各因素确定后, 用 $L_9(3^4)$ 正交表进行剂量选择, 剂量优化见表 6~7。提取物间最佳剂量配比为茶多酚: 五倍子: 大黄 = 5: 2: 1(质量比), 该优化组在正交表中 9 组组合之内, 最小抑菌浓度为 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抑菌效果优于任何单因素水平。

表 4 正交 *t* 值法 $L_{12}(2^{11})$ 的试验结果
Tab. 4 Experimental results of orthogonal *t* value design $L_{12}(2^{11})$

组别	A	B	C	D	E				$\mu\text{g}/\text{mL}$		
						MIC ($n=3$)	均数	<i>s</i>	s^2		
1	1	1	1	1	1	339	339	339	339	0	0
2	1	1	1	2	2	143	143	143	143	0	0
3	1	1	2	1	2	234	234	234	234	0	0
4	1	2	2	2	1	417	417	417	417	0	0
5	1	2	2	1	1	520	520	520	520	0	0
6	1	2	1	2	2	625	312	312	416.7	180.71	32656
7	2	1	1	2	1	117	117	117	117	0	0
8	2	1	2	2	1	156	156	156	156	0	0
9	2	1	2	1	2	156	156	156	156	0	0
10	2	2	1	1	2	825	825	825	825	0	0
11	2	2	1	1	1	520	520	1040	693	300	90132
12	2	2	2	2	2						
M_1	344.95	190.8	422.28	461.16	373.67	$n=3 M_m=365.2 \sum s^2=122788$					
M_2	389.4	574.34	296.6	249.94	354.94	$S_e=(\sum s^2/n)-1/2=202.3$					
<i>D</i>	44.45	383.54	-125.06	-211.96	-20.47	$t= D /S_e f=G(n-1)=11(3-1)=22$					
<i>t</i>	0.22	1.89	0.62	1.05	0.09	$t_{0.05}=1.958+2.45/(f-1)=2.07$					
<i>P</i>	-	-	-	-	-	$t_{0.01}=2.58+4.8/(f-1)=2.81$					

注: 数值越小, 作用越强; 1 水平用药; 2 水平不用; M_1 : 用某药各组的指标测定值的均数, M_2 : 未用某药各组的指标测定值的均数; $D=M_2-M_1$ 。

表5 辅药交互作用分析表

Tab.5 Analysis table of adjuvant interaction

因素	AC	AD	AE	CD	CE	DE
[1 1]	312 [^]	417 [〃]	417 [〃]	617 [^]	617 [^]	1600 [〃]
[1 2]	390	390	390	780	780	1560
[2 1]	780	1560	1560	1560	1560	1040
[2 2]						

注: 数值越小, 作用越强; 1 水平: 用药, 2 水平: 不用; AC、CD 及 CE 间有协同作用([1 1] 均小于[1 2] 和[2 1]), 以[^]表示协同), AD、AE、DE 有拮抗作用([1 1] 均大于[1 2] 或[2 1], 以[〃]表示拮抗)。

表6 剂量优化因素水平表

Tab.6 Factor level charts of dose optimization mg

因素	A 茶多酚	B 五倍子	C 大黄	D 空白
1 水平	40	20	5	0
2 水平	50	30	10	0
3 水平	60	40	15	0

2.3 HPLC法测定组方有效成分质量分数

分别吸样品溶液和对照品溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行测定。结果表明, 样品中各个成分色谱峰分离良好, 见图 1。根据样品中各成分峰面积所对应的标准品的峰面积, 计算各成分在组方中的质量分数, 样品有效成分质量分数见表 8。

表7 剂量优化分析表

Tab.7 Analysis table of dose optimization

组别	A	B	C	D	MIC (n= 3)	均数	s	s ²		
1	1	1	1	1	126	126	126	126	0	0
2	1	2	2	2	156	156	156	156	0	0
3	1	3	3	3	93	93	186	124	53.69	2882.62
4	2	1	2	3	78	78	78	78	0	0
5	2	2	3	1	93	93	186	124	53.69	2882.62
6	2	3	1	2	93	93	93	93	0	0
7	3	1	3	2	93	93	93	93	0	0
8	3	2	1	3	93	93	186	124	53.69	2882.62
9	3	3	2	1	97	97	97	97	0	0
M ₁	406	297	343		n= 3	M _m = 112.78	Σs ² = 8647.86			
M ₂	295	404	331			S _e = (Σs ² /n) - 1/2 = 53.69				
M ₃	314	314	341			G = 9	L = 3	f = G(n- 1) = 9(3- 1) = 18		
S	59.37	57.5	6.43			t = (L) ^{- 1/2} × S _a / S _e				
t	1.92	1.85	0.207			t _{0.05} = 1.73 + 2.66/(f- 1) = 1.88				
P	*	-	-			t _{0.01} = 2.147 + 4.88/(f- 1) = 2.43				

注: 数值越小, 作用越强; 1 水平: 用药; 2 水平: 不用; * P < 0.05。

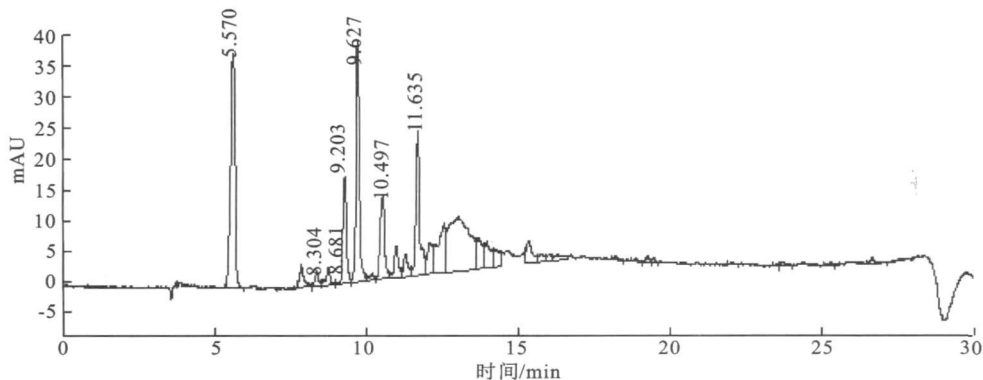


图1 复合组方的 HPLC 图

Fig.1 HPLC figure of composing prescriptions

表8 复合组方的有效成分质量分数

Tab. 8 Content of active components of composing prescriptions

成分	保留时间/min	质量分数/%
没食子酸	5.570	1.18
表没食子儿茶素	8.304	4.26
儿茶素	8.681	1.03
表没食子儿茶素没食子酸酯	9.627	12.6
表儿茶素	10.497	7.57
表儿茶素没食子酸酯	11.63	4.19
大黄素	22.006	0.038
大黄酸	23.667	0.073
芦荟大黄素	26.618	0.057

3 结 语

3.1 植物提取物对嗜水气单胞菌的抑菌活性

不同中草药对嗜水气单胞菌的抑菌活性明显不同。结果表明, 11种提取物在0.5 g/mL质量浓度下, 茶多酚、五倍子抑菌活性最强, 抑菌圈平均直径均达到18 mm以上, 大黄、黄芩、诃子抑菌圈平均直径范围10~15 mm。不同的研究者发现, 同一种药物对同一种病原菌的抑菌作用, 其结果不尽一致^[20-21]。出现上述结果可能是由于试验手段、条件等不一致的结果, 另外也同所试菌株毒力的强弱、药物的采集区、采集季节、使用部位(根、茎、叶、花、果实、种子)、植物年龄、贮藏炮制方法有关。因此, 在进行抑菌中草药的筛选时, 建议运用科学的提取方法, 以标准菌株为受试菌株, 采用同一测定方法,

以提高结果的准确性和可比性。

3.2 正交t值法优化复合组方和剂量配比

由于中药方剂的药味组成常多于4味, 在进行拆方研究时如做全面正交设计工作量很大。正交t值法源于正交设计, 比较适合4~11味药的复方研究, 其优点是各因素间的交互作用虽未列在表内, 但可用较少的试验次数来分析较多的因素。本实验通过正交t值法得到复方植物提取物组方的最优组合为A₁B₁C₂D₂E₂(五倍子茶多酚)。但是, 第一步主药分析中t值在统计学上没有显著差异, 这跟正交表中的第12组没有数据有关, 第12组因为不添加任何提取物, 也就不存在最小抑菌浓度, 因此, 由于缺少第12组(代表2水平)的数据而影响了t值。故只有选择抑菌效果最好的茶多酚为主药。通过第二步交互作用分析, 最终组方确定为茶多酚, 五倍子, 大黄。最佳剂量配比茶多酚: 五倍子: 大黄是5: 2: 1(质量比), 本组方对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度(MIC)达到78 ug/mL, 与薛飞^[22](2006)等报道的苦参复方制剂C和D方剂对嗜水气单胞菌MIC为15.6、7.8 mg/mL; MBC为250、125 mg/mL报道相比较, 抑菌效果较佳。

3.3 HPLC法测定组方有效成分质量分数

本研究中以HPLC法测定复合组方的有效成分含量, 组方中以茶多酚的质量分数较高, 其中EGCG质量分数达12.6%。但是大黄中的蒽醌类质量分数很少, 其原因可能一是蒽醌类在大黄中的质量分数本来就不高, 大概3%左右^[14], 再者, 在提取中可能导致蒽醌水解; 二是大黄在复合组方中的质量分数比较小, 所以测定结果显示组方中的蒽醌类物质质量分数极少。

参考文献(References):

- [1] Xia C, Ma Z H, Rahman M H, et al. PCR cloning and identification of the *hly* haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China[J]. *Aquaculture*, 2004, 229: 45 - 53.
- [2] Jiravanichpaisal P, Roos S, Edsman L, et al. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 101: 56- 66.
- [3] Vivas J, Carracedo B, Riano J, et al. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 70: 2702- 2708.
- [4] Gray S J. *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility[J]. *J Hyg Lond*, 1984, 3: 365- 75.
- [5] Ahishali E, Pinarbasi B, Akyuz F. A case of *Aeromonas hydrophila* enteritis in the course of ulcerative colitis[J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2007, 18: 430- 431.
- [6] 张运强, 李庆乐. 嗜水气单胞菌的致病性及其防治方法[J]. *广西农业科学*, 2007, 38(5): 565- 568.
ZHANG Yur qiang, LI Qing le. Pathogenicity and control of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Guangxi Agriculture Science*, 2007, 38(5): 565- 568. (in Chinese)

- [7] 陈一资, 胡滨. 动物性食品中兽药残留的危害及其原因分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 162- 166.
CHEN Yi zi, HU Bin. Reasons & harm of animal medicine remainderr to animal material food[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 162- 166. (in Chinese)
- [8] Immanuel G, Uma R P, Iyapparaj P, et al. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*[J]. **Journal of Fish Biology**, 2009, 74: 1462- 1475.
- [9] László Ardó , Guojun Yin , Pao Xu, et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the nonr specific immune response of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*[J]. **Aquaculture**, 2008, 275: 26- 33.
- [10] 刘波, 周群兰, 何义进, 等. 植物提取物对异育银鲫生长、免疫与抗氧化相关因子及抗病力的影响[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 193- 198.
LIU Bo, ZHOU Qur lan, HE Yi jin, et al. Effects of plants extracts on growth, factors associated with immunity and antioxidation, and disease resistance of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. **Journal of Shanghai Fisheries University**, 2008, 17(2): 193- 198. (in Chinese)
- [11] YIN Guojun , Ardó L, Thompson K D, et al. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2009, 26: 140- 145.
- [12] Xie Jun, Liu Bo, Zhou Qur lan, et al. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian*[J]. **Aquaculture**, 2008, 281: 5- 11.
- [13] 黄建军. 复方五倍子抗菌剂有效成分的提取、分离及药效学研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [14] 马玉哲, 张俊杰, 李红霞. 大黄中蒽醌成分提取方法[J]. 河北理工大学学报: 自然科学版, 2009, 31(2): 131- 134.
MA Yu zhe, ZHANG Jur jie, LI Hong xia. The Research of the anthraquinone extraction method in rhubarb[J]. **Journal of Hebei Polytechnic University: Natural Science Edition**, 2009, 31(2): 131- 134. (in Chinese)
- [15] 熊淑华, 熊爱珍, 方晓, 等. 正交试验设计法优选黄芩的提取工艺[J]. 中国医药导报, 2008, 5(2): 46- 47.
XIONG shu hua, XIONG ai zhen, FANG xiao, et al. Extraction process of radix scutellariae with orthogonal test[J]. **China Medical Herald**, 2008, 5(2): 46- 47. (in Chinese)
- [16] 石章锁, 郑曙明, 崔秋芳. 正交试验优选诃子醇提工艺研究[J]. 河北渔业, 2007, 6: 11- 13.
SHI Zhang suo, ZHENG Shu ming, CUI Qi r fang. Study on the process for extracting medicine terminalia fruit by orthogonal experiment[J]. **Hebei Fisheries**, 2007, 6: 11- 13. (in Chinese)
- [17] 曾哲灵, 熊伟, 熊涛, 等. 大蒜素的提取工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 121- 123.
ZENG Zhe ling, XIONG Wei, XIONG Tao, et al. Study on the extraction of alliein[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2006, 32(2): 121- 123. (in Chinese)
- [18] Oonmetta aree J, Suzuki T, Gasaluck P, et al. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*[J]. **LWT**, 2006, 39: 1214- 1220.
- [19] 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- 46.
SUN Wei min, SUN Rui yuan. Chinese herbal medicine prescription of the orthogonal t value[J]. **Chinese Herbal Medicine Clinical Pharmacology**, 1992, 8(1): 41- 46. (in Chinese)
- [20] 肖辉, 苏振霞, 单娟娟, 等. 16 种中草药提取物对嗜水气单胞菌的体外抑菌实验[J]. 水生态学杂志, 2009, (3): 53- 56.
XIAO Hui, SU Zhen xia, SHAN Juan juan, et al. Experimental research on antibacterial effect of 16 kinds of Chinese herbal medicine on *Aeromonas hydrophila* in vitro[J]. **Journal of Hydroecology**, 2009, (3): 53- 56. (in Chinese)
- [21] 周群兰, 郑小平, 刘波, 等. 大黄提取物对嗜水气单胞菌的抑菌效果[J]. 江苏农业科学, 2007, 2: 64- 66.
ZHOU Qur lan, ZHENG Xiao ping, LIU Bo, et al. Antimicrobial activity of rhubarb extracts against *Aeromonas hydrophila*[J]. **Jiangsu Agriculture Science**, 2007, 2: 64- 66. (in Chinese)
- [22] 薛飞, 周维仁, 王志强, 等. 苦参生物碱及其复方制剂对嗜水气单胞菌的抑制作用[J]. 水利渔业, 2006, 26(1): 89- 91.
XU E Fei, ZHOU Wei ren, WANG Zhi qiang, et al. Antimicrobial activity of *Sophora* alkaloid and compound preparation against *Aeromonas hydrophila*[J]. **Conservancy Fisheries**, 2006, 26(1): 89- 91. (in Chinese)