https://doi.org/10.12677/ojfr.2024.112017

中草药对大口黑鲈病原爱德华氏菌的体外抑制 效果研究

陈浩楠^{1,2}, 刘馨茹³, 孙 妍^{1,2*}, 董学旺^{1,2}, 刘 群^{1,2}, 魏俊利^{1,2}, 孙洪超⁴

- 1天津市动物疫病预防控制中心, 天津
- 2天津市水生动物疫病专业实验室,天津
- 3天津农学院水产学院,天津
- 4天津超林水产养殖有限公司,天津

收稿日期: 2024年5月31日: 录用日期: 2024年6月20日: 发布日期: 2024年6月29日

摘 要

本文采用水煎法制备10种中草药的水溶性提取物,观察其对大口黑鲈源杀鱼爱德华氏菌的抑制作用。通过琼脂打孔法对其活性进行筛选,并利用酶标仪测定其最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。结果显示: 10种水溶性提取物中有5种对杀鱼爱德华氏菌有不同程度的抑制作用,分别为大黄、黄连、黄芩、女贞子和苏木。其中苏木的抑菌和杀菌的效果最明显,抑菌圈直径平均值为21.2 mm,MIC和MBC的浓度分别为7.8125 mg/mL和62.5 mg/mL。该研究为大口黑鲈细菌性疫病的防控提供了新思路。

关键词

杀鱼爱德华氏菌,中草药,抑菌圈,最小抑菌浓度,最小杀菌浓度

The Research of the Inhibitory Effect of Chinese Herbal Medicine on *Edwardsiella piscicida* from Largemouth Bass *in Vitro*

Haonan Chen 1,2 , Xinru Liu 3 , Yan Sun $^{1,2^*}$, Xuewang Dong 1,2 , Qun Liu 1,2 , Junli Wei 1,2 , Hongchao Sun 4

*通讯作者。

¹Animal Disease Prevention and Control Center of Tianjin, Tianjin

²Tianjin Professional Laboratory of Aquaculture Disease, Tianjin

³College of Aquatic Products, Tianjin Agricultural University, Tianjin

⁴Tianjin Chaolin Aquaculture Co., Ltd., Tianjin

Received: May 31st, 2024; accepted: Jun. 20th, 2024; published: Jun. 29th, 2024

Abstract

In this paper, water-soluble extracts of 10 kinds of Chinese herbal medicines were prepared by water decoction method to observe their inhibitory effects on *Edwardsiella piscicida* from largemouth bass. Agar hole diffusion test was applied to screen the antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by microplate reader. The results showed that 5 of the 10 extracts had different inhibitory effects on *Edwardsiella piscicida*, including *Rheum officinale Baill, Coptidis rhizoma, Scutellaria baicalensis Georgi, Fructus ligustri Lucidi* and *Lignum sappan*. Among them, *Lignum sappan* has the most obvious antibacterial and bactericidal effects. The average diameter of bacteriostatic zone was 21.2 mm. The concentration of MIC and MBC was 7.8125 mg/ml and 62.5 mg/ml respectively. The research had provided a new idea for the prevention and control of bacterial diseases in large mouth bass.

Keywords

Edwardsiella piscicida, Chinese Herbal Medicine, Bacteriostatic Zone, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



Open Access

1. 引言

大口黑鲈(Micropterus salmoides)俗称加州鲈鱼,原产自加拿大和美国,1983年大口黑鲈被引进至我国,且年产量一直保持在16万吨左右[1],因其肉质坚实,味道鲜美,且骨刺少,营养价值高,在市场上深受大众喜爱。随着北方地区大口黑鲈养殖量不断增加,各类疾病暴发严重。尤其近两年大口黑鲈养殖过程中常出现各类病毒性、细菌性疫病引起大量死亡,给养殖户造成了经济损失,其中爱德华氏菌在大口黑鲈的病原菌中较为常见。

据研究表明爱德华氏菌属应归为肠杆菌科,可被分为三个种,迟缓爱德华氏菌(Edwardsiella tarda, E. tarda)、保科爱德华氏菌(Edwardsiella hoshinae, E. hoshinae)和鮰爱德华氏菌(Edwardsiella ictalurid, E. ictaluri),其中,迟缓爱德华氏菌分布较为广泛[2],危害较严重。2013 年后,通过对迟缓爱德华氏菌的表现型和遗传特征的鉴定发现其存在着很多的差异,研究人员将异于迟缓爱德华氏菌的分离株重新命名为杀鱼爱德华氏菌[3]。由杀鱼爱德华氏菌引起的爱德华氏菌病在世界范围内的重要经济鱼类中,除大口黑鲈外也包括鳗鲡、真鲷和大菱鲆[4]。该菌致病高发期在夏季及初秋等高温季节,一旦发病会极大抑制养殖鱼类的生长,引起养殖鱼类大面积死亡,对养殖户造成不可估量的经济损失[5]。杀鱼爱德华氏菌目前已引起水产养殖业和相关研究人员的普遍重视,因此筛选出有效抑制杀鱼爱德华氏菌的药物迫在眉睫。

我国中草药种类繁多,使用历史悠久。中草药具有天然性、多功能性、无毒副残留性、无抗药性等诸多优点[6]。目前已有诸多研究人员发现,中草药对多种病原都具有一定的抑制作用,这在水产养殖病害防治方面也有相关研究报道。中草药被普遍认为能够替代抗生素、疫苗和化学药品在水产养殖中广泛

使用,因此中草药在水产养殖抗病使用中有巨大的优势以及使用前景。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 病原菌与中草药

实验用杀鱼爱德华氏菌来自于实验室保存。将其进行复苏,通过固体与液体培养基的培养,纯化富集大量杀鱼爱德华氏菌。

实验中草药为百部(Stemona japonica)、大黄(Rheum officinale Baill)、当归(Angelica sinensis)、蛇床子 (Cnidium monnieri (L.) Spreng)、黄连(Coptidis rhizoma)、苦参(Sophora flavescens)、黄芩(Scutellaria baicalensis Georgi)、黄柏(Cortex Phellodendri Chinensis)、女贞子(Fructus ligustri Lucidi)、苏木(Lignum sappan)。

2.1.2. 实验仪器与设备

酶标仪(帝肯); 高速冷冻离心机(艾本德); 生物安全柜(海尔); 生化培养箱(北京六一); 游标卡尺(上海赛拓)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 药液的制备

每味中草药取 50 g,投入烧杯加水 500 mL,浸泡一夜后煎煮,水沸腾后文火继续煎煮 1 h,最终浓缩至 50 mL,生药浓度为 1 g/mL。两层纱布过滤,滤液移至 50 mL 离心管,获得中草药粗提液,放置 4° 冰箱保存,静置沉淀后取上层药液使用[7]。

2.2.2. 平板的制备

称取 BHI 固体培养基粉末 47 g,溶于 1 L 去离子水中,加热煮沸,121℃高压灭菌 1 h 备用。将灭菌的牛津杯置于细菌培养板中间,倒入 25 mL 制备好的培养基溶液,保持液体不流入牛津杯内,冷却备用。

2.2.3. 抑菌圈的测定

取浓度为 2×106 cfu/mL 杀鱼爱德华氏菌悬液 100 μL 涂布于带孔的 BHI 固体培养基上。每个孔内加入 150 μL 中草药液,保持加满但不溢出的状态。将培养皿平放于生化培养箱内 37℃培养 24 h,选取三个不同方向,分别量取抑菌圈直径并取平均值。

药物敏感度评定标准为: 抑菌圈直径平均值 > 20 mm, 判定为极度敏感(++++); 抑菌圈直径平均值 15~20 mm, 判定为高度敏感(+++); 抑菌圈直径平均值 10~15 mm, 判定为中度敏感(++); 抑菌圈直径平均值 < 10 mm, 判定为低度敏感(+); 无抑菌圈则判定为不敏感(-) [8]。

2.2.4. 最小抑菌浓度(MIC)的测定

在细胞培养板孔中加入 150 μ L 的 BHI 液体培养基和 150 μ L 有明显抑制效果的 5 味中草药粗提液,通过二倍稀释法进行倍比稀释,粗体液的浓度分别为 500 mg/mL、250 mg/mL、125 mg/mL、62.5 mg/mL、31.25 mg/mL、15.625 mg/mL、7.8125 mg/mL、3.906 mg/mL、1.953 mg/mL、0.977 mg/mL,在每孔中加入 10 μ L 菌液,菌液浓度为 2 × 106 ng/mL。每个孔做空白对照,只加中药粗体液不加菌液,盖好盖板置于生化培养箱内 37℃培养 24 h,利用酶标仪测量每孔的吸光度(OD)值。按顺序出现的最后一组无明显差异的数据所对应的药物浓度,判定为该药物的最小抑菌浓度。

2.2.5. 最小杀菌浓度(MBC)的测定

依据 MIC 的数据结果,移液枪吸取稀释浓度为 MIC 值及高于该稀释浓度的培养物 150 μL 涂布于无 孔的 BHI 固体培养基上,置于生化培养箱内 37℃培养 24 h,观察结果,无菌落长出的培养皿所对应的最低浓度为该药物的最小杀菌浓度[9]。

3. 实验结果

3.1. 抑菌圈测定结果

杀鱼爱德华氏菌对 10 味中草药的敏感程度如表 1 所示,杀鱼爱德华氏菌对 10 味中草药的敏感程度大小依次为:苏木、黄连、女贞子、黄芩、大黄。其他无抑菌圈均为不敏感[10]。其中,杀鱼爱德华氏菌对苏木表现为极度敏感(++++),对黄连表现为高度敏感(+++),对大黄、黄芩、女贞子菌表现为中度敏感(+++)。因此,杀鱼爱德华氏菌对苏木,黄连较为敏感。选取有效果的苏木、黄连、大黄、黄芩、女贞子 5种中草药继续进行 MIC 以及 MBC 的测定。

Table 1. Antibacterial effects of 10 Chinese herbal medicines on *Edwardsiella piscicida in vitro* 表 1. 10 味中草药对杀鱼爱德华氏菌的体外抑菌效果

中草药	抑菌圈直径1	抑菌圈直径 2	抑菌圈直径3	平均值	抑菌等级
百部					
大黄	11.90	11.50	11.70	11.70	++
当归					
蛇床子					
黄连	16.0	14.52	14.48	15.00	+++
苦参					
黄芩	12.46	10.38	12.60	11.81	++
黄柏					
女贞子	13.74	13.30	13.46	13.50	++
苏木	20.50	22.10	21.00	21.20	++++

注: +++极度敏感; +++高度敏感; ++中度敏感; ---不敏感。

3.2.5 味中草药对杀鱼爱德华氏菌的 MIC

大黄、黄连、黄芩、女贞子以及苏木的 MIC 测定结果如表 2 所示,大黄的 MIC 浓度为 31.25 mg/mL,黄连的 MIC 浓度为 15.625 mg/mL,黄芩的 MIC 浓度为 31.25 mg/mL,女贞子的 MIC 浓度为 125 mg/mL,苏木的 MIC 浓度 7.8125 mg/mL。因此,苏木的 MIC 值最小,抑制效果最明显。其次分别是黄连、大黄、黄芩。女贞子的 MIC 浓度最大抑菌效果较差。

Table 2. MIC of 5 Chinese herbal medicines against *Edwardsiella piscicida* 表 2. 5 味中草药对杀鱼爱德华氏菌的 MIC

	OD 值										
药物浓度 (mg/mL)		500	250	120	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.906	1.953	0.977
	实验组	1.7068	1.0535	0.3006	0.2151	0.1631	0.7576	0.5969	0.866	0.9808	1.0241
大黄	对照组	1.7173	1.0142	0.3016	0.207	0.1527	0.1242	0.3547	0.3597	0.401	0.3783
	差值	-0.0105	0.0393	-0.001	0.0081	0.0104	0.6334	0.2422	0.5063	0.5798	0.6458

续表											
黄连	实验组	1.3593	1.1276	0.8885	0.4865	0.2826	0.1827	0.3529	0.6539	0.9751	1.0532
	对照组	1.2968	1.0638	0.8772	0.4336	0.2574	0.169	0.1308	0.2892	0.3622	0.286
	差值	0.0625	0.0638	0.0113	0.0529	0.0252	0.0137	0.2221	0.3647	0.6129	0.7672
	实验组	0.2851	0.1908	0.1364	0.1175	0.3908	0.6717	1.013	0.9898	1.0231	1.0837
黄芩	对照组	0.3113	0.1757	0.1282	0.1104	0.445	0.4436	0.3551	0.3875	0.3582	0.3903
	差值	-0.0262	0.0151	0.0082	0.0071	-0.0542	0.2281	0.6579	0.6023	0.6649	0.6934
	实验组	0.1769	0.1285	0.1035	0.2072	0.2732	0.2371	0.2066	0.2197	0.2786	0.3375
女贞子	对照组	0.1778	0.1283	0.1071	0.0987	0.0938	0.0977	0.085	0.0688	0.0689	0.0615
	差值	-0.0009	0.0002	-0.0036	0.1085	0.1794	0.1394	0.1216	0.1509	0.2097	0.276
	实验组	0.3555	0.2792	0.1841	0.1793	0.1034	0.0848	0.0865	0.2575	0.3443	0.2797
苏木	对照组	0.3566	0.2777	0.1821	0.1871	0.1042	0.0871	0.0862	0.0813	0.1329	0.0921
	差值	-0.0011	0.0015	0.002	-0.0078	-0.0008	-0.0023	0.0003	0.1762	0.2114	0.1876

3.3.5 种中草药对杀鱼爱德华氏菌的 MBC

大黄、黄连、黄芩、女贞子以及苏木的 MBC 测定结果如表 3 所示。大黄全部长菌因此无 MBC 浓度。 黄连 MBC 浓度为 125 mg/mL,黄芩全部长菌因此无 MBC 浓度,女贞子 MBC 浓度为 250 mg/mL,苏木 MBC 浓度为 62.5 mg/mL。综上可得出苏木对杀鱼爱德华氏菌的杀菌效果最明显。

Table 3. MBC of 5 Chinese herbal medicines against *Edwardsiella piscicida* 表 3. 5 味中草药的 MBC 测定结果

中药	浓度(mg/mL)	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125
大黄		P	P	P	P	P		
黄连		N	N	N	P	P	P	
黄芩	·	P	P	P	P	P		
女贞子		N	N	P				
苏木	'	N	N	N	N	P	P	P

N不长菌; P长菌。

4. 讨论

4.1. 不同中草药的抑菌效果分析

据抑菌圈测定实验结果可知,选取的10味中草药中有5味中草药对杀鱼爱德华氏菌有明显抑制效果。其中黄连、女贞子以及苏木对杀鱼爱德华氏菌有明显的抑制作用。抑菌圈的平均直径均大于13 mm,苏木的抑菌圈直径可达20 mm以上。但这3味药材对杀鱼爱德华氏菌的抑菌效果也存在一定差异。黄连属毛茛科黄连属应试部位为根茎;女贞子属木犀科应试部位为成熟果实;苏木属豆科应试部位为根皮。由此可推测中草药对病原菌抑制效果的不同可能与中草药的种类及应试部位有关系。而苦参与苏木同属豆科,应试部位为根部,本试验结果却显示苦参对杀鱼爱德华氏菌无抑制作用,蛇床子属伞形科,但应试部位与女贞子同为成熟果实,本试验中也显示蛇床子对杀鱼爱德华氏菌无抑制作用。综上可推断原因可能为,不同种类的中草药及应试部位都会对同一病原菌产生不同的抑制效果。根据MIC及MBC测定结果,黄连、女贞子、苏木抑菌效果最为明显,其MIC测定结果分别为15.625 mg/mL、125 mg/mL、7.8125 mg/mL,其 MBC的测定结果分别为125 mg/mL、250 mg/mL、62.5 mg/mL。而大黄与黄芩对杀鱼爱德华氏菌的抑制效果不及黄连、女贞子及苏木明显,可见不同中草药对同一的菌株的抑制效果不同。董亚萍

[11]等研究发现,苦参、黄芩、连翘等中草药均对嗜水气单胞菌有延缓耐药性的作用。但在本实验中苦参对杀鱼爱德华氏菌无抑制作用,可推测其原因为,同一种中草药对不同的病原菌抑制效果有一定的差异。肖辉[12]等研究发现,同样的药材使用不同的提取方法对同一菌种的抑制效果有极大的差异。在本实验中百部、当归、蛇床子等药物对大口黑鲈病原杀鱼爱德华氏菌不敏感,依此推测原因可能为本实验中采取的中草药提取方式未能使中草药中的有效活性物质释放出来导致对杀鱼爱德华氏菌不敏感。因此,为本实验提供了进一步设想,对应试的10味药材采取不同的提取方式,进一步探究药物的不同提取物对爱德华氏菌的抑菌效果。

4.2. 药物活性物质的抑菌效果分析

百部、大黄、黄芩等许多中草药都具有杀菌作用。本实验中苏木、黄连、女贞子均具有抗炎、抗菌、抗病毒的作用,苏木主要含有黄酮类化合,包括苏木黄素、苏木查尔酮、巴西苏木素、黄酮类等,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抗菌作用[13]。许瑞平[12]等研究发现,苏木的根茎、叶、花等部位含有黄酮类、糖皂甙等活性物质可以起到较强的抑菌作用。可用于预防和治疗多种细菌感染疾病,如金黄色葡萄球菌、维氏气单胞菌等。通过本试验可证明,苏木对杀鱼爱德华氏菌也起到明显的抑杀作用。女贞子含有齐墩果酸、女贞子苷、挥发油等活性物质,能够增强动物免疫机能[14],同时对革兰氏阳性菌和阴性菌也均有抗菌作用。朱文婷[15]等研究发现,黄连中所含的黄连碱、小檗碱等活性成分通过破坏细菌结构、抑制细菌糖代谢的方式起到抑菌的作用。通过体外抑菌实验,发现黄连对除杀鱼爱德华氏菌外有明显抑制作用,对嗜水气单胞菌同样有明显抑制作用。综上可推断,中草药的成分复杂,对细菌的抑制作用皆与其中的有效活性物质有关,其多糖、生物碱、有机酸类、黄酮类等均可能为抑菌的有效成分[16]。

4.3. 抑菌圈测定结果与 MIC、MBC 浓度关系分析

将抑菌圈直径大小与 MIC 及 MBC 数据进行对比,抑菌圈直径大小与 MIC 及 MBC 浓度测量值存在着一定的关系。可以发现抑菌圈平均直径越大的中草药,其 MIC 及 MBC 测定值越小。但女贞子的抑菌圈平均直径为 13.50 mm,大黄与黄芩的抑菌圈平均直径分别为 11.70 mm、11.81 mm。而大黄与黄芩的MIC 则要小于女贞子。其原因推断可能为同一种中草药在固体培养基与液体培养基中的扩散程度存在一定差异。因此,抑菌圈与 MIC、MBC 测量值的相关性并不十分严谨,存在一定的局限性。同时也说明,判断中草药对爱德华氏菌的抑制效果除体外抑制效果研究以外还应该结合更全面的体内实验。如,在本实验中大黄的抑制效果并不明显,而 ZHAO [17]等通过含有大黄的复方中药来改善大口黑鲈的代谢和免疫紊乱,试验发现按 4%添加剂量添加复方中药到饲料中可使大口黑鲈的代谢及免疫维持在正常水平。在本实验中根据抑菌圈直径的测定来看,苏木对杀鱼爱德华氏菌极其敏感,黄连、女贞子对杀鱼爱德华氏菌也相较敏感,但从 MIC 及 MBC 的测定结果来看在药物浓度较高的情况下,才可出现对爱德华氏菌的抑制效果。据此可推测大致原因,中草药浓度需达到某一定值,才可出现对病原菌的抑制及杀菌效果。

4.4. 中草药在水产养殖业的发展趋势

中草药来源于天然的有机物与无机物,是一种天然药物,无有毒物质残留,不会对人体造成危害,不会污染环境。中草药不仅种类繁多,历史悠久,所含天然物质能够促进机体生长[18],同时也可以抑制并杀死病原菌,有效地预防病害发生。夏与晴[7]等通过研究发现,将有协同作用的中草药按照一定的比例配伍,所得出的复方药物,要比其单方药物的抑菌效果更加明显。综上,单方中草药的抑制效果较为单一,而存在协同作用的复方中草药则能扬长避短,大大提升其抑菌效果[19]。所以,以联合药物的思想开发水产类疾病防治是大势所趋,从全面的角度有机协调、协同发展。通过此发现可对本实验做出设想,

进一步将对杀鱼爱德华氏菌有协同作用的中草药苏木、女贞子、黄连进行合理配伍更加深入探究复方药物对大口黑鲈病原杀鱼爱德华氏菌的抑制效果。全面发展中草药在水产养殖病害防治的绿色应用。为后续中草药在水产养殖中的应用提供科学依据。

5. 结论与展望

随着北方地区大口黑鲈养殖量不断增加,各类疫病暴发严重。其中爱德华氏菌在大口黑鲈的病原菌中较为常见,本实验将实验室冻存的杀鱼爱德华氏菌复苏纯化并选取百部、大黄、当归、蛇床子、黄连、苦参、黄芩、黄柏、女贞子、苏木 10 味中草药材探究其对大口黑鲈病原爱德华氏菌的抑制效果。

通过试验得出以下结论,选取的 10 味药材中,有 5 味对杀鱼爱德华氏菌有抑制效果,其中苏木表现 为极度敏感,抑菌圈直径达到 21.20 mm,最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)分别为 7.8125 mg/mL 和 62.5 mg/mL。女贞子与黄连的抑菌效果仅次于苏木,女贞子的抑菌圈直径为 13.50 mm, MIC 及 MBC 浓度分别为 125 mg/mL 和 250 mg/mL;黄连的抑菌圈直径为 15.00 mm, MIC 及 MBC 浓度分别 15.625 mg/mL 和 125 mg/mL。相比之下,有抑制作用的大黄与黄芩却不能起到杀菌作用。

结果显示,所选取的单方中草药对大口黑鲈病原爱德华氏菌有一定的抑杀作用。为中草药在水产病 害防治方面提供了一定的理论基础,中草药有望成为抗生素及化学药品的有效替代品。但本实验未能从 药物提取方式更深入的探究,且单方中草药作用效果单一,本实验未能更深一步探究复方中草药对大口 黑鲈病原的抑制效果,后续研究有待进一步加深。

综上,可知苏木、女贞子、黄连对爱德华氏菌有明显的抑菌、杀菌作用。以此为基础进行深入研究,可为爱德华氏菌引起的水产疫病的防治提供新思路,同时也为防止水产动物抗生素滥用,发展水产养殖绿色健康养殖高质量发展提供科学依据。

基金项目

天津市农业发展服务中心种业青年科技创新项目(zxkj202421)。

参考文献

- [1] 郭文杰, 韩锐, 许为镇, 等. 大口黑鲈杀鱼爱德华氏菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 水产学杂志, 2023, 36(6): 47-51, 68.
- [2] 陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病(综述) [J]. 河北科技师范学院学报, 2004, 18(3): 70-76.
- [3] 王凯, 阮鹏飞. 大口黑鲈源杀鱼爱德华氏菌的鉴定及组织病理学观察[J]. 当代水产, 2022, 47(11): 61-64.
- [4] Wimalasena, P.M.H.S., Pathirana, S.K.N.H., Silva, D.J.C.B., et al. (2018) Antibiotic Resistance and Virulence-Associated Gene Profiles of Edwardsiella tarda Isolated from Cultured Fish in Japan. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 19, 141-147.
- [5] 王玮,朱国霞,王洋,等.爱德华氏菌对大黄、黄柏、黄芪、黄连四种中药的敏感程度试验[J].临床医药文献电子杂志、2018、5(57): 193-195.
- [6] 陈圳, 钱且奇, 李志鹏, 等. 抗水产病原非 O1/O139 霍乱弧菌的中草药筛选及抑菌效果分析[J]. 水产学杂志, 2023, 36(2): 43-47, 59.
- [7] 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.
- [8] 胡建美,王宝屯,冯娟,等. 60 种中草药及其复方对杀鱼爱德华氏菌的体外抑菌效果[J]. 甘肃农业大学学报, 2022, 57(2): 27-35.
- [9] 张彬,黄婷,陈明,等. 致病性鮰爱德华氏菌药敏及中草药体外抑菌作用研究[J]. 水产科技情报, 2010, 37(6): 282-287.
- [10] 李茜, 张懿瑾, 华汝泉, 等. 23 种中草药及复方对鲫肠道 3 种细菌的体外抑菌试验[J]. 淡水渔业, 2007, 37(4): 7-11.

- [11] 董亚萍, 谢欣燕, 胡鲲, 等. 中草药延缓嗜水气单胞菌对恩诺沙星耐药性的研究[J]. 湖南农业科学, 2016(12): 1-4
- [12] 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, 2(3): 53-56.
- [13] 赖成虹, 李作孝, 刘广益. 苏木免疫抑制作用的研究进展[J]. 医学综述, 2004, 10(10): 635-637.
- [14] 舒燕, 王升平, 曾发姣, 等. 现代炮制工艺对女贞子成分的影响及其抗菌作用研究进展[J]. 生物资源, 2022, 44(5): 425-431.
- [15] 朱文婷,李文嘉,宣雄智,等. 渔用中草药种类、作用机理及应用效果研究进展[J]. 中国饲料, 2024(5): 94-100.
- [16] 徐丰都, 彭丽园, 蔡婷, 等. 中草药对水产动物致病菌抑杀作用的研究进展[J]. 水产养殖, 2016, 37(10): 48-52.
- [17] Liulan, Z., Ji, L., Hao, L., et al. (2022) Yinchenhao Decoction Ameliorates the High-Carbohydrate Diet Induced Suppression of Immune Response in Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*). Fish Shellfish Immunology, **125**, 141-151.
- [18] 王鑫源, 董晓雪, 张莹, 等. 中草药替代抗生素在猪生产中的应用研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(9): 42-45, 51.
- [19] 区庆淦. 抗杀鱼爱德华氏菌中草药的筛选及对大口黑鲈免疫力的作用[D]: [硕士学位论文]. 佛山: 佛山科学技术学院, 2022.