

doi: 10.12131/20180056

## 基于响应面法分析乌梅和抗生素对哈维氏弧菌的协同抑制作用

钟志鸿<sup>1,2</sup>, 王 菲<sup>1,2</sup>, 陈永贵<sup>2</sup>, 邓恒为<sup>2,3</sup>, 王世锋<sup>2</sup>, 孙 云<sup>2</sup>,  
陈雪芬<sup>1</sup>, 郭伟良<sup>1,2</sup>, 周永灿<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学海洋学院, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228; 3. 中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 为了给哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 疾病防治新手段的开发提供基础实验数据, 筛选了协同抗哈维氏弧菌的乌梅 (*Fructus mume*) 水提液与抗生素复合物。首先绘制药物浓度对数对抑菌圈直径标准曲线, 采用全组合法筛选与乌梅水提液具有协同抗菌活性的抗生素, 然后采用中心组合设计法 (CCD) 结合响应面法 (RSM) 分析乌梅水提液与筛出抗生素复合后两两药物间的交互作用, 并确定最佳复合配比。全组合法筛出的四环素、土霉素、金霉素和强力霉素分别与乌梅水提液具有协同抗菌作用, RSM 分析显示将这 4 种药物复合后, 乌梅水提液与土霉素对哈维氏弧菌存在显著协同抗菌作用; 土霉素分别与金霉素和强力霉素存在交互抑制作用; 乌梅水提液、土霉素、金霉素和强力霉素最佳复合配比为 45 : 0.12 : 0.00 : 0.00 (mg·mL<sup>-1</sup>)。模型预测最优复合物对哈维氏弧菌的抑菌圈直径为 18.54 mm, 琼脂扩散法平行 3 次测得该复合物的抑菌圈直径为 (19.03±0.07) mm, 相对误差为 2.6%, 表明该方法结果可靠, 为考察药物间的交互作用提供了新思路。

**关键词:** 哈维氏弧菌; 乌梅; 抗生素; 响应面分析法; 协同抗菌

中图分类号: R 931.71

文献标志码: A

文章编号: 2095 - 0780 - (2018) 06 - 0081 - 08

## Synergism between *Fructus mume* and antibiotics against *Vibrio harveyi* based on response surface methodology

ZHONG Zhihong<sup>1,2</sup>, WANG Fei<sup>1,2</sup>, CHEN Yonggui<sup>2</sup>, DENG Hengwei<sup>2,3</sup>, WANG Shifeng<sup>2</sup>, SUN Yun<sup>2</sup>,  
CHEN Xuefen<sup>1</sup>, GUO Weiliang<sup>1,2</sup>, ZHOU Yongcan<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** To provide basic experimental data for developing protocols to prevent and cure the disease caused by *Vibrio harveyi*, we collected the compound of *Fructus mume* water extract and antibiotics, which has synergism of antibacterial activity against *V. harveyi*. First, we plotted the standard curves of concentration logarithms versus inhibitory zone diameters of the test drugs, and used comprehensive combination experimental design method to screen the antibiotics which had synergism effect with *F. mume* water extract. Then, we applied central concentration design (CCD) with response surface methodology (RSM) to investigate the interac-

收稿日期: 2018-04-04; 修回日期: 2018-05-24

资助项目: 国家自然科学基金项目(31560725); 海洋公益性行业科研专项经费项目(201405020); 海南省自然科学基金创新研究团队项目(2016CXTD005); 南海海洋生物健康养殖团队(hdkytg201704)

作者简介: 钟志鸿 (1993 —), 男, 硕士研究生, 从事水产养殖病害防治研究。E-mail: zhongzh@hainu.edu.cn

通信作者: 郭伟良 (1983 —), 男, 博士, 副教授, 从事水产养殖病害防治研究。E-mail: guowl07@mails.jlu.edu.cn

周永灿 (1968 —), 男, 博士, 教授, 从事水产养殖病害防治研究。E-mail: zychnu@163.com

tion among *F. mume* water extract and antibiotics against *V. harveyi* and to find their optimum combination. Results show that significant synergism existed between *F. mume* water extract and tetracycline, oxytetracycline, aureomycin and deoxytetracycline. RSM results indicate that the synergism between *F. mume* water extract and oxytetracycline contributed to the most significant effect on the antibacterial activity against *V. harveyi*. However, antagonism effect existed between oxytetracycline and aureomycin, and between oxytetracycline and deoxytetracycline. The optimum ratio of *F. mume* water extract, oxytetracycline, aureomycin and deoxytetracycline was 45 : 0.12 : 0.00 : 0.00 (mg·mL<sup>-1</sup>). For this optimum combination, the predictive inhibitory zone diameter was 18.54 mm. According to cup method, agar diffusion method with three replicates, the practical maximum inhibitory zone diameter was (19.03±0.07) mm, and the relative error between predictive values and actual values was 2.6%. Thus, RSM is a reliable approach to describe the relationship among test drugs and inhibitory zone diameter.

**Key words:** *Vibrio harveyi*; *Fructus mume*; antibiotics; response surface methodology; synergism effect

近年来,为了满足人们对海产品与日俱增的需求,海水养殖规模不断扩大,养殖环境恶化日趋严重,导致病害频发,成为海水养殖可持续发展的瓶颈问题<sup>[1-3]</sup>。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种革兰氏阴性菌,广泛分布于海洋环境中,是海水养殖动物的重要致病菌,给海水养殖业造成了巨大损失<sup>[4-6]</sup>。抗生素因其起效快、效果好等优点,成为防治海水养殖动物病害的常用药<sup>[7]</sup>。然而由于抗生素存在病菌耐药、环境污染和药物残留等负面影响,必须科学合理使用<sup>[8-9]</sup>。中草药具有抗菌、抗病毒、抗虫、抗应激、增加食欲、提供营养、促进生长和增强免疫力等多重功效;且因中草药为天然药物,在机体内容易消除、在环境中容易降解、毒副作用小,具有很好的开发前景。然而中草药一般具有起效慢、作用温和、对突发性疾病的控制力弱等缺点,因而应用受限<sup>[10]</sup>。已有研究表明中草药富含活性成分,部分活性成分本身就具有抗菌活性,或可以增强抗生素的抗菌活性<sup>[11]</sup>。因此,将中草药联合低剂量抗生素进行应用,可降低两者用量、降低病原菌耐药机率和药物残留风险,两者共同应用于水产养殖动物病害,被认为是最有前途的水产动物病害防控手段之一<sup>[12]</sup>。然而,并非所有的中草药与抗生素之间都存在协同作用,为了更好地将中草药联合抗生素应用于水产动物病害防控中,研究其交互作用非常必要<sup>[13-14]</sup>。

响应面法(RSM)常用于工艺条件优化<sup>[15-16]</sup>。RSM在合理的实验设计下,能以最少的实验点数,获取最大限度的实验信息,其采用多元二次回归法作为函数估计的工具,研究各因素间对考察指标(响应值)的交互影响,精确地描述各因素和响应值之间的关系。乌梅(*Fructus mume*)是由双子叶植物药蔷薇科植物梅的干燥近成熟果实加工而

成<sup>[17]</sup>。已有研究表明乌梅提取液具有显著的抗哈维氏弧菌活性<sup>[18-20]</sup>,本文在采用琼脂扩散法确认乌梅水提液体外抗哈维氏弧菌活性的基础上,采用全组合法初步筛选与乌梅水提液具有协同效应的抗生素,然后采用中心组合实验设计方法(CCD)结合RSM,分析乌梅水提液与抗生素对哈维氏弧菌的抑制活性,以确定乌梅水提液与抗生素之间的最佳配比,为乌梅联合抗生素防治弧菌病提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原料、试剂与仪器

乌梅购于海南源安隆药品超市;强力霉素、金霉素和土霉素购于宁波瑞源生物科技有限公司(粉剂, HPLC≥99.8%);链霉素和新霉素购于北京拜尔迪生物技术公司(粉剂, HPLC≥99.8%),四环素购于Sigma公司(粉剂, HPLC≥99.8%);哈维氏弧菌为本实验室分离鉴定和保存。

液体培养基(g·L<sup>-1</sup>)为酵母粉1、蛋白胨5、氯化钠(NaCl)30、牛肉膏3,用1 mol·L<sup>-1</sup>的氢氧化钠(NaOH)或盐酸(HCl)调节pH至7.5;半固体培养基(上层培养基)由液体培养基中加入1%的琼脂粉制备而成;固体培养基(下层培养基)由液体培养基中加入2%的琼脂粉制备而成。

### 1.2 实验方法

1.2.1 乌梅水提液样品制备 乌梅在80℃烘箱中干燥2h,去核,研钵研碎,过40目筛,称5.0g于250 mL具塞三角瓶中,加50 mL去离子水,浸润30 min,沸水浴提取30 min,8 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清过0.22 μm微孔滤膜,制成药物质量浓度为1 g·mL<sup>-1</sup>的乌梅水提液样品。

1.2.2 体外抗哈维氏弧菌活性测定 菌悬液的制备:冻存的哈维氏弧菌转移至液体培养基中,

30 ℃、150 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h, 按 1% 接种量接入新液体培养基中, 30 ℃、150 r·min<sup>-1</sup> 培养 16 h, 按此条件再传一代, 培养液 3 000 g 离心 10 min, 收集菌体, 用无菌生理盐水重悬菌体并将其 OD<sub>600 nm</sub> 调整至 0.8 (活菌数约为 2.82×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>), 制成菌悬液。

抗哈维氏弧菌体外抑菌活性测定参考 Tramer 和 Flower<sup>[21]</sup>。将固体培养基湿热灭菌后, 趁热倒入培养皿中, 每个培养皿 15 mL, 平放静置冷凝, 按体积分数 2% 接种量将菌悬液接入低于 50 ℃ 未冷凝的半固体培养基中, 然后倒入含冷凝的固体培养基培养皿中, 每个培养皿 10 mL, 摇匀, 平放静置冷凝。用直径 5 mm 打孔器在双层培养基上均匀打 3 个孔, 在每个孔中加 60 μL 样品液, 30 ℃ 培养 16 h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径, 每个样品平行测 3 次, 取平均值作为该样品的抑菌圈直径。

标准曲线绘制。按表 1 设计浓度, 制备 6 个等比浓度梯度的乌梅水提液和抗生素标准溶液, 琼脂扩散法测定其抑菌圈直径, 以浓度对数为横坐标 (C), 抑菌圈直径为纵坐标 (Y, cm), 绘制标准曲线。

1.2.3 全组合方法考察乌梅水提液与抗生素间交互作用 乌梅水提液与抗生素进行一一复合, 乌梅和抗生素药物浓度与抑菌圈直径间的相关曲线回归方程分别为  $Y=A_1\lg C+B_1$  和  $Y=A_2\lg C+B_2$ , 复合液中乌梅水提液和抗生素的浓度分别为  $C_1$  和  $C_2$ , 未复合时, 两种药物在该两个浓度下的抑菌圈直径分别为  $Y_1=A_1\lg C_1+B_1$  和  $Y_2=A_2\lg C_2+B_2$ , 而乌梅水提液抑菌圈直径达  $Y_2$  时其浓度为  $C_3=10^{(Y_2-B_1)/A_1}$ ; 抗生素抑菌圈直径为  $Y_1$  时药物浓度为  $C_4=10^{(Y_1-B_2)/A_2}$ ; 假设乌梅水提液和抗生素复合后不存

在交互作用, 则其抑菌圈直径范围应该介于  $Y_3=A_1\lg(C_1+C_3)+B_1$  和  $Y_4=A_2\lg(C_2+C_4)+B_2$  区间, 如果抑菌圈直径小于  $\text{Min}(Y_3, Y_4)$ , 则乌梅水提液和抗生素间存在交相抑制作用; 而其抑菌圈直径大于  $\text{Max}(Y_3, Y_4)$ , 则 A 和 B 药物存在交互促进作用, 促进率为  $[Y-\text{Max}(Y_3, Y_4)]/\text{Max}(Y_3, Y_4)\times 100\%$ 。

1.2.4 CCD 和 RSM 方法考察乌梅水提液与抗生素间交互作用 乌梅水提液与 1.2.3 筛出的与其存在协同作用的抗生素作为考察因素, 进行 CCD 设计实验, 然后以抑菌圈直径作为响应值, 进行 RSM 分析, 分析各因素对响应值的影响和各因素之间的交互作用, 以寻找各因素之间的最优配比。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线的绘制

按照 1.2.2 的标准曲线绘制方法, 绘制乌梅水提液、四环素、土霉素、强力霉素、金霉素、新霉素和链霉素的标准曲线, 各标准曲线及其参数见表 1。由表可知, 各标准曲线的相关系数 ( $R^2$ ) 高于 0.927 4, 表明各药物的浓度对数与抑菌圈直径呈较好的线性关系, 可根据标准曲线计算其浓度范围内各药物的抑菌圈直径。

### 2.2 全组合实验考察乌梅水提液与抗生素之间的交互作用

采用 1.2.3 全组合实验设计方法考察乌梅水提液与 6 种抗生素对哈维氏弧菌的交互作用, 它们的复合方案、估算的抑菌圈直径范围和实际测量值见表 2。由表可知乌梅水提液与四环素、土霉素、强力霉素和金霉素之间有显著的交互促进作用, 与新霉素和链霉素之间有显著的交互抑制作用。

表1 各药物的标准方程及其参数

Tab.1 Standard functions and parameters of each drug

药物名称 drug	标准曲线 standard curve	质量浓度范围/mg·mL <sup>-1</sup> range of concentration	$R^2$
乌梅水提液 <i>F. mume</i> water extract	$Y=8.688\ 0\lg C-5.799\ 0$	20~100	0.939 6
四环素 tetracycline	$Y=7.088\ 0\lg C+18.893\ 8$	0.07~0.52	0.986 9
土霉素 oxytetracycline	$Y=5.400\ 1\lg C+14.388\ 4$	0.03~0.58	0.961 9
强力霉素 deoxytetracycline	$Y=3.927\ 2\lg C+15.835\ 6$	0.10~1.55	0.935 5
金霉素 aureomycin	$Y=3.667\ 4\lg C+16.121\ 0$	0.03~0.58	0.991 4
新霉素 neomycin	$Y=7.116\ 0\lg C+15.598\ 0$	0.10~0.80	0.941 0
链霉素 streptomycin	$Y=10.134\ 1\lg C+15.950\ 4$	0.15~0.65	0.927 4

### 2.3 响应面法考察乌梅水提液与抗生素间的交互作用

表2的结果显示对乌梅水提液抗菌活性的促进作用由高到低为土霉素>金霉素>强力霉素>四环素,选择促进效率最强的前3种抗生素(土霉素、金霉素和强力霉素)与乌梅水提液进行复合,进行四因素三水平的CCD实验,其因素水平见表3,设计方案与实验结果见表4。

以抑菌圈直径作为响应值(Y),各药物的浓度编码值作为变量,采用SAS RSREG程序对实验结果进行RSM分析实验,回归模型如式:

$$Y=16.6483+0.1425X_1+0.1978X_2-0.0013X_3+0.0630X_4+0.0649X_1^2+0.2463X_1X_2+0.1390X_1X_3+0.0088X_1X_4+0.0406X_2^2-0.0425X_2X_3-0.4733X_2X_4+0.0634X_3^2+0.0080X_3X_4+0.0394X_4^2$$

模型的相关系数( $R^2$ )为0.8276,说明响应值82.76%的信息量由所选变量引起,采用F检验法对模型进行显著性检验,其 $Pr>F$ 值为0.0094,表明模型显著可靠,采用F检验法对模型中各项系数进行显著性检验,结果见表5,由表可知,在设计浓度范围内,乌梅水提液( $X_1$ )和土霉素

( $X_2$ )的浓度对抑菌圈直径影响显著,土霉素的浓度对其影响为极显著,而金霉素( $X_3$ )和强力霉素( $X_4$ )在低浓度范围内对抑菌圈直径的影响并不显著。乌梅水提液与土霉素之间( $X_1X_2$ )存在显著协同作用,而乌梅水提液与金霉素( $X_1X_3$ )、强力霉素( $X_1X_4$ )之间的相互促进作用不显著。土霉素与金霉素组合( $X_2X_3$ )以及土霉素与强力霉素组合( $X_2X_4$ )在模型中系数为负,表明土霉素与金霉素和强力霉素之间均存在拮抗作用,且 $X_2X_4$ 的F检验结果呈极显著水平( $Pr>F$ 值小于0.01),金霉素和强力霉素对响应值的促进作用并不显著( $Pr>F_{(X_3)}$ 和 $Pr>F_{(X_4)}$ 值均大于0.10),所以考虑复合时不添加金霉素和强力霉素。图1~图6为两两药物之间的交互作用响应曲面图,可以直观地观察到两两药物对响应值的影响;由图1可知Y沿着(-1,-1)至(1,1)直线剧增,表明乌梅水提液与土霉素存在显著的交互促进作用,图2和图3也呈图1类似趋势,但它们两两因素之间的交互促进作用不如图1显著;图4和图5的响应曲面为凹曲面,且它们的至高点位于(-1,1)和(1,-1)区域,表明土霉素与金霉素、强力霉素之间存在交互抑制作用,图4的响应

表2 全组合实验结果

Tab.2 Experimental design and results of combination of *F. mume* water extract and antibiotics

抗生素 antibiotics	质量浓度/mg·mL <sup>-1</sup> concentration		抑菌圈直径范围/mm inhibitory zone diameter		相互促进效率/% synergism efficiency
	乌梅水提液 <i>F. mume</i> water extract	抗生素 antibiotics	估算值 predicted value	测量值 actual value	
四环素 tetracycline	50	0.13	13.43~13.83	15.47±0.06	11.88
土霉素 oxytetracycline		0.27	12.05~12.93	16.60±0.08	28.37
强力霉素 deoxytetracycline		0.20	13.23~14.18	16.27±0.09	14.73
金霉素 aureomycin		0.13	13.01~14.02	16.32±0.07	16.35
新霉素 neomycin		0.20	12.04~12.50	10.64±0.09	-
链霉素 streptomycin		0.20	11.53~11.96	8.35±0.04	-

注: - 表示无交互促进作用

Note: - indicates no synergism effect.

表3 乌梅水提液与抗生素复合CCD设计因素水平表

Tab.3 Factors and levels of CCD for combination of *F. mume* water extract and antibiotics

水平 level	乌梅水提液( $X_1$ ) <i>F. mume</i> water extract	土霉素( $X_2$ ) oxytetracycline	金霉素( $X_3$ ) aureomycin	强力霉素( $X_4$ ) deoxytetracycline
-1	15	0.06	0.05	0.02
0	30	0.09	0.08	0.04
1	45	0.12	0.11	0.06

表4 CCD设计方案及其实验结果

Tab.4 Design and results of CCD

序号 No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y/mm$	序号 No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y/mm$
1	-1	-1	0	0	16.96±0.02	15	0	1	-1	0	17.06±0.07
2	-1	1	0	0	16.66±0.03	16	0	1	1	0	16.81±0.09
3	1	-1	0	0	16.51±0.14	17	-1	0	-1	0	16.53±0.16
4	1	1	0	0	17.20±0.13	18	-1	0	1	0	16.33±0.08
5	0	0	-1	-1	16.67±0.04	19	1	0	-1	0	16.85±0.05
6	0	0	-1	1	16.92±0.07	20	1	0	1	0	17.21±0.09
7	0	0	1	-1	16.72±0.05	21	0	-1	0	-1	15.83±0.04
8	0	0	1	1	17.01±0.04	22	0	-1	0	1	16.97±0.08
9	-1	0	0	-1	16.67±0.06	23	0	1	0	-1	17.33±0.12
10	-1	0	0	1	16.55±0.03	24	0	1	0	1	16.59±0.08
11	1	0	0	-1	16.87±0.08	25	0	0	0	0	16.61±0.08
12	1	0	0	1	16.79±0.07	26	0	0	0	0	16.68±0.05
13	0	-1	-1	0	16.55±0.09	27	0	0	0	0	16.66±0.04
14	0	-1	1	0	16.47±0.08						

曲面相对平缓,表明土霉素和金霉素之间的交互抑制不是很显著,图5中(1,1)区域的响应值显著低于(-1,1)和(1,-1)区域,表明土霉素与强力霉素之间存在显著抑制作用;图6整个响应曲面都很平缓,表明金霉素和强力霉素对响应值的影响不显著。

综上所述,采用模式搜索法对响应模型最优化配方进行搜索,结果显示,在模型可预测范围内, $V$ (乌梅水提液): $m$ (土霉素): $m$ (金霉素): $m$ (强力霉素)的最佳配比为45:0.12:0.00:0.00( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),在此最佳复合配比方案下,模型预测其抑菌圈直径( $Y$ )为18.54 mm。

## 2.4 验证实验

按照2.3中的乌梅水提液与抗生素复合配比方案 $V$ (乌梅水提液): $m$ (土霉素): $m$ (金霉素): $m$ (强力霉素)=45:0.12:0.00:0.00( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),模型预测最佳配比的复合物抑菌圈直径为18.54 mm,琼脂扩散法3次平行检测最佳复合物的抑菌圈直径为(19.03±0.07) mm,相对误差2.6%,表明该方法确实可行。

## 3 讨论

据报道,乌梅提取液有显著的体外抗哈维氏

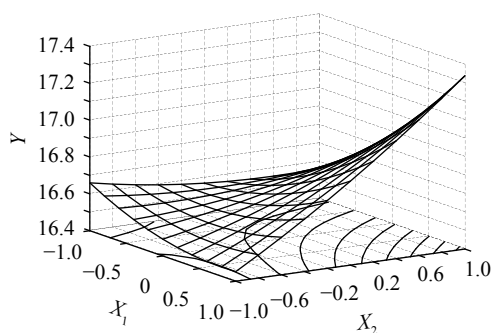
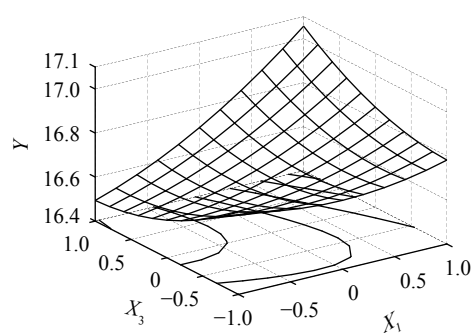
弧菌活性<sup>[18-20]</sup>,其最小抑菌浓度(MIC)为12.5~25.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,本研究采用琼脂扩散法检测其MIC低于20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (乌梅水提液标准曲线最低浓度值),与文献报道基本相符。中草药与抗生素协同防治水产动物疾病,可降低病原菌耐药机率及药物残留风险和毒副作用,然而必须在全面了解两者间相互作用的基础上,才可以将两者科学合理地联合应用<sup>[22-23]</sup>。目前常采用的方法有棋盘法、时间-杀菌曲线(time-killing)法和琼脂扩散法。棋盘法因采用微孔板作为病原菌培养容器,培养容量小,病原菌生长受外界因素干扰大,结果准确度难以得到保障,且仅限于考察两两药物之间的交互作用<sup>[24-25]</sup>;而时间-杀菌曲线法则较为费时费力<sup>[12,26]</sup>。为此本研究采用操作简便、结果可靠的琼脂扩散法首先考察两两药物之间的交互作用<sup>[27]</sup>,结果显示四环素类抗生素土霉素、金霉素和强力霉素均对乌梅水提液的体外抗哈维氏弧菌活性具有促进作用,而氨基糖苷类抗生素链霉素和新霉素对乌梅水提液的体外抗哈维氏弧菌活性存在拮抗作用。

采用CCD结合RSM法考察乌梅水提液、土霉素、金霉素和强力霉素复合后两两药物间的交互作用。姚远等<sup>[28]</sup>成功采用RSM方法考察了乳酸

表5 RSM统计分析结果

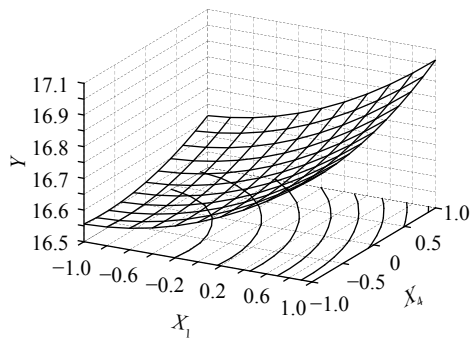
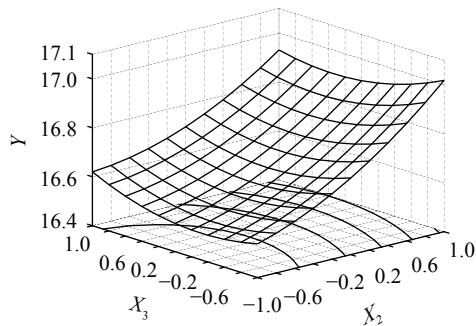
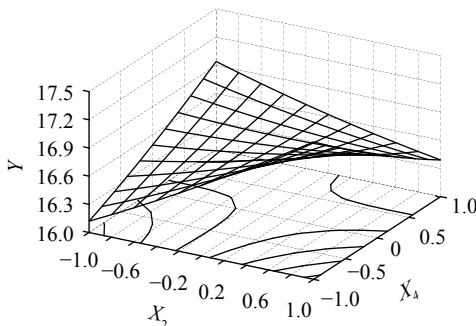
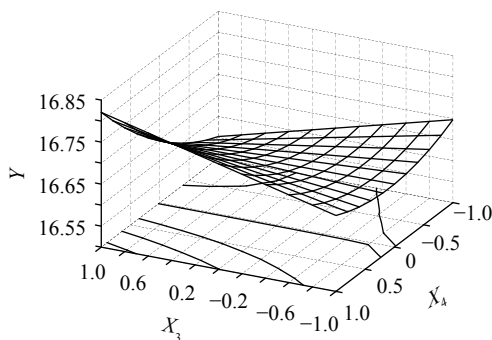
Tab.5 Statistical results of RSM analysis

来源 source	自由度 df	平方和 SS	均方差 MS	F	Pr>F
$X_1$	1	0.243 7	0.243 7	6.953 8	0.021 7
$X_2$	1	0.469 7	0.469 7	13.402 7	0.003 3
$X_3$	1	0.000 0	0.000 0	0.000 6	0.980 7
$X_4$	1	0.047 6	0.047 6	1.359 2	0.266 3
$X_1^2$	1	0.022 4	0.022 4	0.640 6	0.439 1
$X_1X_2$	1	0.242 6	0.242 6	6.921 9	0.021 9
$X_1X_3$	1	0.077 3	0.077 3	2.205 5	0.163 3
$X_1X_4$	1	0.000 3	0.000 3	0.008 7	0.927 1
$X_2^2$	1	0.008 8	0.008 8	0.251 2	0.625 3
$X_2X_3$	1	0.007 2	0.007 2	0.206 2	0.657 9
$X_2X_4$	1	0.895 9	0.895 9	25.565 5	0.000 3
$X_3^2$	1	0.021 4	0.021 4	0.611 3	0.449 5
$X_3X_4$	1	0.000 3	0.000 3	0.007 3	0.933 3
$X_4^2$	1	0.008 3	0.008 3	0.236 0	0.635 9
模型 model	14	2.018 1	0.144 1	4.113 6	0.009 4
线性项 linear	4	0.761 0	0.190 3	5.429 1	0.009 9
平方项 quadratic	4	0.033 6	0.008 4	0.239 6	0.910 5
交互项 cross product	6	1.223 5	0.203 9	5.819 2	0.004 8
残差 error	12	0.420 5	0.035 0		
失拟项 lack of fit	10	0.417 6	0.041 8	28.793 5	0.034 0
净误差 pure error	2	0.002 9	0.001 5		
总和 total	26	2.438 6			

图1  $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面图和等高线图Fig.1 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_1, X_2)$ 图2  $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面图和等高线图Fig.2 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_1, X_3)$ 

钠、茶多酚与壳聚糖抑制铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的交互作用, 发现三者对铜绿假单胞菌的抑制效果 (从大到小) 为乳酸钠 > 壳聚糖 >

茶多酚; 乳酸钠和茶多酚存在明显的拮抗作用; 乳酸钠和壳聚糖存在明显的协同作用; 而茶多酚和壳聚糖之间交互作用不显著, 并获得乳酸钠 (mg) 和

图3  $Y=f(X_1, X_4)$ 的响应面图和等高线图Fig.3 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_1, X_4)$ 图4  $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面图和等高线图Fig.4 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_2, X_3)$ 图5  $Y=f(X_2, X_4)$ 的响应面图和等高线图Fig.5 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_2, X_4)$ 图6  $Y=f(X_3, X_4)$ 的响应面图和等高线图Fig.6 Responsive surfaces and contours of  $Y=f(X_3, X_4)$ 

壳聚糖 (mL) 最佳复合配比为 62.5 : 3.17。本研究结果显示土霉素、金霉素和强力霉素均与乌梅水提液在哈维氏弧菌的体外抑制活性上存在显著的协同促进作用, 而土霉素分别与金霉素和强力霉素在体外抗哈维氏弧菌活性上存在显著的交互抑制作用。经过 CCD 结合 RSM 优化, 获得乌梅水提液、金霉素、土霉素和强力霉素的最佳配比并根据模型给出预测值, 在最佳配比方案下进行了验证实验, 表明该方法确实可行。

研究表明, 乌梅主要抑菌成分为柠檬酸等有机酸类, 其抗菌机制主要包括: 通过破坏菌质膜内侧的磷脂酰丝氨酸, 从而破坏其细胞膜系统, 使细胞内容物外泄而导致细菌死亡; 阻滞 DNA 的合成进而抑制细胞分裂; 柠檬酸从转录水平降低细菌荚膜多糖生物合成从而达到抑杀菌效果<sup>[29]</sup>。四环素类抗生素通过与细菌胞内核糖体 30S 亚基形成可逆结合体, 抑制蛋白质合成; 也可通过结合线粒体 70S 亚基, 抑制线粒体蛋白质的合成<sup>[30]</sup>。乌梅与四环素类抗生素作用机制和靶位不同, 这可能是两者之间存在协同抗哈维氏弧菌的原因, 然而两者的协同抗菌机制仍需进一步研究。虽然本研究结果表明乌梅水提液与四环素类抗生素具有体外协同抗哈维氏弧菌作用, 但应用于防治哈维氏弧菌引发的动物疾病还需结合药物动力学与药效学等多因素进行研究。

#### 参考文献:

- [1] 叶乃好, 庄志猛, 王清印. 水产健康养殖理念与发展对策[J]. 中国工程科学, 2016, 18(3): 101-104.
- [2] 吴淑勤, 王亚军. 我国水产养殖病害控制技术现状与发展趋势[J]. 中国水产, 2010(8): 9-10.
- [3] 杨蕾, 舒廷飞, 温琰茂. 我国海水养殖及其可持续发展的对策[J]. 水产科学, 2003, 22(4): 45-48.
- [4] 蒋魁, 徐力文, 苏友禄, 等. 2012年~2014年南海海水养殖鱼类病原菌哈维氏弧菌分离株的耐药性分析[J]. 南方水产科学, 2016, 12(6): 99-107.
- [5] 闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 海水养殖动物致病弧菌的研究进展[J]. 水产科学, 2009, 28(8): 475-481.
- [6] 张晓华, 钟英斌, 陈吉祥. 哈维氏弧菌的生物学特性、流行病学及检测技术[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(5): 740-748.
- [7] CHENG G Y, HAO H H, XIE S Y, et al. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?[J]. Front Microbiol, 2014, 5: 217.
- [8] LIU X, STEELE J C, MENG X Z. Usage, residue, and human

- health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review[J]. *Environ Pollut*, 2017, 223: 161-169.
- [9] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [10] CITARASU T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry[J]. *Aquacult Int*, 2010, 18(3): 403-414.
- [11] SYAHIDAH A, SAAD C R, DAUD H M, et al. Status and potential of herbal applications in aquaculture: a review[J]. *Iranian J Fish Sci*, 2015, 14(1): 27-44.
- [12] AIYEGORO O, ADEWUSI A, OYEDEMI S A, et al. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(7): 4477-4487.
- [13] KUMAR S N, SIJI J V, NAMBISAN B, et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(11): 3143-3150.
- [14] ANANTHARAMAN A, RIZVI M S, SAHAL D. Synergy with rifampin and kanamycin enhances potency, kill kinetics, and selectivity of de novo-designed antimicrobial peptides[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 1693-1699.
- [15] 邓恒为, 郭伟良, 孙晓飞, 等. 响应面法优化丹参中抗无乳链球菌活性成分的提取工艺[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 132-140.
- [16] 逯家辉, 李国庆, 张华飞, 等. 八角茴香油提取工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(6): 254-257.
- [17] 王智云, 孙玉刚, 王麟, 等. 乌梅的药理活性研究进展[J]. *实用临床医药杂志*, 2015, 19(19): 200-202.
- [18] GAO G S, ZHANG Y Y, SHI Q M, et al. Isolation and identification of the pathogen causing skin ulcer disease in *Cynoglossus semilaevis* Günther and its sensitivity to Chinese herbal medicine[J]. *Agr Sci Technol*, 2015, 16(10): 2221-2224, 2276.
- [19] 贾春红, 李淑芳, 林红英, 等. 8株方斑东风螺病原菌对17种中草药敏感性测定[J]. *中兽医学杂志*, 2012(6): 6-9.
- [20] 王玉娥, 邢晨光, 王国良. 5种海洋致病弧菌对34种中草药敏感性的测定[J]. *水产科学*, 2008, 27(5): 221-225.
- [21] TRAMER J, FOWLER G G. Estimation of nisin in foods[J]. *J Sci Food Agric*, 1964, 15: 522-528.
- [22] 李焯新, 蔡小辉, 黄瑜, 等. 中草药与抗生素联用对罗非鱼源无乳链球菌的体外抑菌作用[J]. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(4): 45-49.
- [23] GUO W L, WANG W H, HU W T, et al. Antibacterial synergisms of Ji Xue Teng, *Spatholobus suberectus*, extract and selected antibiotics against *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in vitro and in vivo[J]. *J World Aquacult Soc*, 2018, early view.
- [24] BLESSON D, SAJI C V, NIVYA R M, et al. Synergistic antibacterial activity of natural plant extracts and antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *World J Pharm Pharmaceu Sci*, 2015, 4(3): 741-763.
- [25] RAND K H, HOUCK H J, BROWN P, et al. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(3): 613-615.
- [26] AIYEGORO O A, OKOH A I. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: implications in antimicrobial chemotherapy[J]. *J Med Plants Res*, 2009, 3(13): 1147-1152.
- [27] WHITE R L, BURGESS D S, MANDURU M, et al. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 1996, 40(8): 1914-1918.
- [28] 姚远, 董庆利, 叶维, 等. 乳酸钠、茶多酚与壳聚糖协同抑制铜绿假单胞菌的效果[J]. *生物加工过程*, 2014, 12(4): 60-65.
- [29] 张小琼, 侯晓军, 杨敏, 等. 乌梅的药理作用研究进展[J]. *中国药房*, 2016, 27(25): 3567-3570.
- [30] 孙广龙, 胡立宏. 四环素类抗生药的研究进展[J]. *药学研究*, 2017, 36(1): 1-5.