

金銀花萃取物對尖吻鱸及四絲馬鮫鏈球菌感染症之抗病效力評估

郭錦朱* · 張博淵 · 賴哲翊 · 林如謙 · 陳陽德 · 吳豐成

行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心

摘 要

尖吻鱸 (*Lates calcarifer*) 和四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 是我國重要的高經濟養殖魚類，在集約養殖及極端氣候衝擊下易罹細菌性疾病，尤以鏈球菌感染症為最。金銀花 (*Lonicera japonica*) 富含多酚化合物，具廣效抗菌活性。為提升養殖魚之抗病力，本研究製備金銀花萃取物，探討其在活體外對瓶鼻海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 之抗菌力及對該菌感染症之抗病效力；結果發現金銀花萃取物之總酚含量比來源生藥提高 2.4 倍，綠原酸含量為 7%，濃度低於 281 µg/ml 對鮭魚鰓細胞的增殖不具影響，在活體外對瓶鼻海豚鏈球菌具抗菌力。以 0、1、2、3 及 4% 添加於飼料，投餵尖吻鱸 14 天及四絲馬鮫 28 天後以瓶鼻海豚鏈球菌攻擊，結果發現所有金銀花萃取物添加組之抗病力皆顯著優於對照組 ($p < 0.01$)，最佳保護力可達 50% 以上；建議最佳應用方法，是於尖吻鱸飼料中添加 3% 的金銀花萃取物投餵 14 天或於四絲馬鮫飼料中添加 4% 的金銀花萃取物投餵 28 天。

關鍵詞：金銀花、尖吻鱸、四絲馬鮫、瓶鼻海豚鏈球菌、抗菌活性

前 言

世界人口於 2021 年達 78.51 億人，比 2020 年增加 0.15 億，隨著世界人口及人類生活水準的提升，對優質動物性蛋白的需求與日俱增，因此，生產足量的水產食品是解決糧食問題亟為重要的課題之一。根據聯合國糧農組織的漁業統計資料顯示 (FAO, 2020)，2018 年之全球魚類、甲殼類、軟體動物和其他水生動物的產量持續增長且達創紀錄的 1.785 億公噸，比 2017 年增長 3.4%，且其中源自養殖漁業的產量亦達 8,210 萬公噸的高峰，比 2017 年增加 3.2%，水產養殖對漁業總產量的貢獻從 2000 年的 25.7% 穩步提高到 2018 年的 46.0%，而我國 2019 年源自水產養殖之漁業產量為 28.1%，也比 2018 年增加 3.2% (漁業署，2020)。其中，鱸魚及馬鮫科魚類是我國重要的七大高經濟養殖魚類，於 2019 年各貢獻養殖漁業產量的 8.3% 及 4.0%，而產值則各貢獻 5.9% 及 6.5%，主要的養殖魚種分別為尖吻鱸 (*Lates calcarifer*)

及四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*)，平均售價各為 91 元/kg 及 210 元/kg。然，為提升養殖效能及產量，水產動物在高度集約養殖下，易受細菌、病毒、寄生蟲等病原侵襲，其中，鏈球菌感染症 (streptococcosis) 更是鱸魚及馬鮫科魚類主要的細菌性疾病，瓶鼻海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 則為其主要致病原，常造成大量死亡而損失慘重，業者為控制疫情，在大量或不當使用抗生素或化學藥品下，易衍生藥物殘留及抗藥菌增生等問題，間接威脅人體健康及環境生態。

生藥 (crude herb) 具多種營養成分和生物活性物質，能全面調節動物的生理機能，兼具營養物質和疾病防治的雙重功效，是新藥研發的重要來源。近年來，生藥在水產養殖的保健及替代療法廣受重視，尤其是增強免疫力、促進成長、拮抗細菌及病毒性疾病等的相關研究 (Liu *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011, 2012, 2015; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012; Shakya and Labh, 2014; Bulfon *et al.*, 2015; Syed *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017; Baldissera *et al.*, 2018; Dhami *et al.*, 2018; 郭, 2019, 2020a; Yonar *et al.*, 2019; Dabbou *et al.*, 2020)。金銀花 (*Lonicera japonica*) 又名忍冬，為忍冬科 (Caprifoliaceae) 多年生半常綠纏繞性木質藤

*通訊作者 / 屏東縣東港鎮豐漁街 67 號; TEL: (08)8324-121 轉 270; FAX: (08)8320-234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw

本植物忍冬的花蕾或帶初開的花，是臺灣中低海拔與平地常見的藥用植物，具有殺菌、抗病毒、解熱、抗發炎、保肝、止血、抗氧化及免疫調節等作用 (Shang *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021)，其主要的抗菌活性成分為富含多酚結構的有機酸及類黃酮 (flavonoids) 化合物，且重要的有機酸有綠原酸 (chlorogenic acid、3-O-caffeoylquinic acid；CA)、3,5-二咖啡醯奎尼酸 (3,5-di-O-caffeoylquinic acid、isochlorogenic acid A) 及 4,5-二咖啡醯奎尼酸 (4,5-di-O-caffeoylquinic acid、isochlorogenic acid C)，含量依序各為 34.9 ± 0.2 、 11.6 ± 0.1 及 2.6 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Li *et al.*, 2018)。有鑒於金銀花對轉糖鏈球菌 (*S. mutans*)、放線共生聚集桿菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*)、金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙門氏腸炎桿菌 (*Salmonella enteritidis*)、痢疾桿菌 (*Shigella* spp.)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 以及黴漿菌 (*Mycoplasma gallisepticum*) 等具抗菌活性 (Shang *et al.*, 2011)，很多文獻亦報告金銀花在活體內對致病原感染症亦具抗病效果 (Müstak *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021)，因此，本研究將製備金銀花萃取物，測定其總酚及綠原酸含量，探討其對瓶鼻海豚鏈球菌在活體外的抗菌活性及在尖吻鱸、四絲馬鮫體內對瓶鼻海豚鏈球菌感染症之抗病效力，此外，亦評估其對魚鰓細胞增殖及對供試魚成長之影響，期建立金銀花萃取物之最佳及有效的應用方法。

材料與方法

一、製備金銀花萃取物

金銀花生藥粉購自勝昌製藥 (中華民國、臺灣)，取 15 g 放入圓桶濾紙並置入索氏萃取器 (soxhlet extractor)，以甲醇 200 ml 在 80°C 迴流萃取 4 小時，收集甲醇萃取液 (Xiong *et al.*, 2013; 楊, 2017)，以減壓濃縮裝置於 50°C 濃縮至乾，再以純水回溶，所得之水溶液以冷凍乾燥機 (Labconco, USA) 凍乾，即得金銀花萃取物，秤其重量與原生

藥重量之比值 100% 即為產率。

二、金銀花萃取物總酚含量測定

以 Folin-Ciocalteu 比色法測定總酚含量 (Yang *et al.*, 2017)；分析方法是將 400 μl 待測金銀花樣品及沒食子酸 (gallic acid, Sigma-Aldrich) 標準品與 200 μl Folin-Ciocalteu 試劑 (Sigma-Aldrich) 及 2 ml 水均勻混合，然後加 10.75% 碳酸鈉 (sodium carbonate, Merck) 溶液至 5 ml，於室溫作用 30 min 後，以波長 760 nm 測吸光值。由沒食子酸檢量線計算金銀花樣品的總酚含量。

三、金銀花萃取物之綠原酸含量檢測

綠原酸是評估金銀花的效價及品質的主要活性成分，其含量以高效能液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 串連光二極體儀 (photodiode array detector, Waters 996) 檢測及定量；本檢測方法的固定相為 C_{18} 管柱 (3.9 \times 150 mm, Waters)，移動相為甲醇：水：甲酸 = 30：69：1，流速 0.8 ml/min，注射量為 10 μl ，監測波長為 327 nm。標準檢量線的製作，是將綠原酸標準品溶於甲醇製成 100、50、10、5、1 及 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準溶液，樣品則取 15 mg 溶於 100 ml 甲醇中，標準品及樣品溶液皆以 0.2 μm 過濾膜過濾後注入儀器分析，然後將樣品所得的相對面積帶入標準檢量線即可得金銀花萃取物之綠原酸含量。

四、供試菌株

自感染瓶鼻海豚鏈球菌的午仔魚病死魚肝臟分離病原並接種至含 5% 羊血之胰蛋白酶大豆瓊脂 (tryptic soy agar, Difco) 之血液培養基 (blood agar)，連續分離純化後，以 16S rRNA 基因定序確認菌種，然後保存於菌種保存管 (Microbank, Pro-Lab Diagnostics)。使用前取保菌磁珠塗抹於血液培養基上，單株純化培養後再進行後續的各項試驗。

五、金銀花萃取物對瓶鼻海豚鏈球菌的抑菌環 (inhibitory zone, IZ) 測定

將瓶鼻海豚鏈球菌刮入外加 1.5% 氯化鈉的

米勒培養液 (Mueller Hinton broth, Difco)，調整菌液濃度至波長 540 nm 的吸光值為 1 (菌液濃度為 3.5×10^9 cfu/ml) 後，取 0.1 ml 塗抹於外加 1.5% 氯化鈉的米勒培養基 (Mueller Hinton agar, Difco)，並以滅菌吸管挖洞，再將供試金銀花水液加入洞中，並以滅菌水取代金銀花水液作為對照組，每組 3 重覆，在 28°C 培養 24 - 48 hr，觀測抑菌環直徑。

六、金銀花萃取物對瓶鼻海豚鏈球菌的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 及最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC)

將瓶鼻海豚鏈球菌刮入外加 1.5% 氯化鈉的米勒培養液中，調整菌液濃度至波長 540 nm 的吸光值為 1，再以米勒培養液稀釋 1,000 倍，取 90 μ l 植入 96 孔盤孔槽，接著加入 10 μ l 不同濃度的金銀花萃取物水液；此外，也以滅菌水取代金銀花萃取物水液為正對照組，滅菌水取代菌液加入米勒培養液為負對照組，每組 3 重覆；96 孔盤在 28°C 培養 24 及 48 hr，觀測其澄清度，溶液呈澄清者的最小濃度即為 24 及 48 hr 的最小抑菌濃度。此外，將未長菌孔槽內的培養液取 10 μ l 均勻塗抹於米勒培養基上，在 28°C 培養 48 hr 後，未長菌者的最小濃度即為 24 及 48 hr 的最小殺菌濃度。

七、金銀花萃取物對細胞增殖之影響 (MTT assay)

以 WST-1 細胞增殖呈色分析套組 (WST-1, Roche) 進行細胞活性分析；首先將以 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Sigma-Aldrich) 培養良好之 G1B (BCRC 60559) 鯰魚鰓細胞，移除舊培養液後，加 5 ml 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液 (trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich) 反應 5 min 使細胞懸浮，再加 5 ml 培養液中和反應，移至 50 ml 離心管，以 3,000 rpm 在 4°C 離心 10 min，移除上清液，加 3 ml 培養液使細胞懸浮，再以血球計數器計算細胞密度，並將細胞數調整為 10^5 cell/ml。接著，將細胞加入 96 孔盤孔槽中，每孔 100 μ l，另將金銀花萃取物以細胞培養液配製成不同濃度，每孔加 100 μ l，每種濃度 4 重覆，置於 25°C 培養

箱培養，24 hr 後移除培養液，每孔加入 100 μ l 磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich) 清洗細胞，重覆 3 次之後，每孔加 100 μ l 培養液及 10 μ l WST-1 細胞增殖檢測試劑，在 37°C 培養箱反應 4 hr，以多功能微量盤檢測儀 (multi-mode microplate reader, BioTek) 於 450 nm 測定吸光值。

八、金銀花萃取物對尖吻鱸及四絲馬鮫鏈球菌感染症之抗病效力及應用方法

首先製備供試飼料，於鰻魚粉中加入金銀花萃取物，添加劑量為 0、1、2、3 及 4% 共五組，先混合均勻，再加入 35% 水揉勻，放入絞肉機製成條狀飼料，室溫風乾 4 hr 後製粒，再放入烘箱以 50°C 乾燥 48 hr 即得。另，購入尖吻鱸及四絲馬鮫各一批，先在 1.8 t FRP 桶蓄養 2 週後，移至 0.5 t FRP 桶馴餌 1 週。尖吻鱸的均重 3.5 ± 0.2 g，每桶 25 尾，共 20 桶，採流水式飼養，海水鹽度 30 ± 1 psu，水溫 28.4 ± 1.2 °C。四絲馬鮫的均重 4.2 ± 0.2 g，每桶 25 尾，共 20 桶，採流水式飼養，海水鹽度 30 ± 1 psu，水溫 27.3 ± 0.8 °C。供試魚以含金銀花萃取物 0、1、2、3 及 4% 之供試飼料投餵，每組 4 重覆，每天飼料投餵量為魚體重的 3%，尖吻鱸經 14 天、四絲馬鮫則 28 天投餵後秤重，再各分別以瓶鼻海豚鏈球菌 7.0×10^6 cfu/ml 及 1.4×10^6 cfu/ml 腹腔注射進行攻擊，每尾 0.05 ml，觀測為期 10 天的死亡數，並計算其相對活存率 (relative percent survival, RPS = [1 - (處理組死亡率 / 對照組死亡率)] \times 100) 及增重比 (percent weight gain; WG% = (最後體重 - 初重) / 初重 \times 100)，評估金銀花萃取物對魚體抗病力及成長之影響。

九、統計分析

所有試驗結果皆以微軟 Excel 軟體內的單因子變異數分析法 (one-way ANOVA) 統計，顯著水準設有 $p < 0.01$ 及 $p < 0.05$ 。

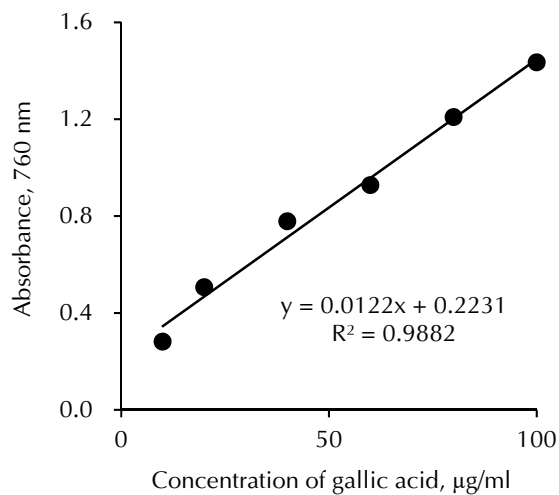
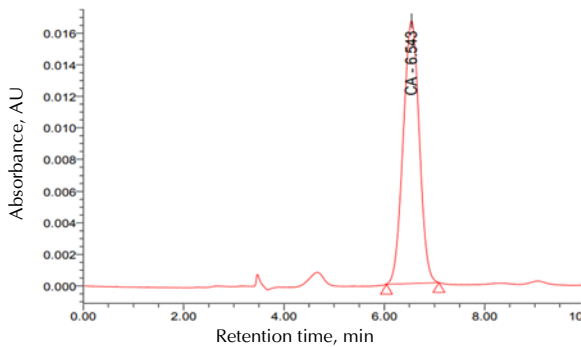
結果與討論

金銀花萃取物之製備方法，較常用者有索氏萃取法、蒸餾迴流萃取法及超音波萃取法三種，根

Table 1 The inhibitory zone (IZ), minimal inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) of *Lonicera japonica* and its extract against *Streptococcus iniae*

Preparations of <i>Lonicera japonica</i>	IZ* (mm)	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
		24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Crude herb	10.7±0.6	1.6	3.1	3.1	6.2
Extract from crude herb	16.3±0.6	0.6	1.1	0.6	1.1

*n=3.

**Fig. 1** The standard curve of gallic acid obtained by the Folin–Ciocalteu method.**Fig. 2** High-performance liquid chromatography chromatogram of chlorogenic acid (CA) in *Lonicera japonica* extract.

據 Xiong *et al.* (2013) 的評估，以索氏萃取法的效率最佳，此外，楊 (2017) 分別以甲醇及水作為金銀花的萃取液，結果發現金銀花之甲醇萃取物之綠原酸含量及對 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基的清除能力皆顯著高於金銀花之水萃取物，因此，本研究以甲醇為萃取液製備金銀花萃取物，產率為 $18.0 \pm 0.4\%$ 。而金銀花之總酚含量則以 Folin-Ciocalteu 比色法測定，其檢

量線如 Fig. 1 所示，為 $y = 0.0122x + 0.2231$ ($R^2 = 0.9882$)，算得之金銀花生藥及其萃取物之總酚含量分別為 3.6 及 8.9 mg/g，金銀花萃取物之總酚含量比其來源生藥提高 2.4 倍。再以 HPLC 檢測金銀花萃取物之綠原酸含量，監測滯留時間為 6.5 min (Fig. 2)，計算綠原酸含量的檢量線為 $y = 3.83 \times 10^4 x - 1.59 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9999$)，得金銀花萃取物之綠原酸含量為 7%，遠高於市售金銀花僅含綠原酸 0.06% (方, 2005) 及藥典規定金銀花之綠原酸含量需 $\geq 1.5\%$ 之標準 (衛生福利部, 2018)。

金銀花在活體外對瓶鼻海豚鏈球菌的抗菌力以 IZ、MIC 及 MBC 評估，結果如 Table 1 所示，金銀花生藥及其萃取物對瓶鼻海豚鏈球菌的 IZ 各為 10.7 ± 0.6 及 16.3 ± 0.6 mm；24 hr MIC 各為 1.6 及 0.6 mg/ml；24 hr MBC 各為 3.1 及 0.6 mg/ml；48 hr MIC 各為 3.1 及 1.1 mg/ml；48 hr MBC 各為 6.2 及 1.1 mg/ml，顯見金銀花萃取物之殺菌力比來源生藥提高 5 倍以上。金銀花的殺菌力雖主要源自富含多酚化構的有機酸 (如綠原酸、異綠原酸等) 及類黃酮 (flavonoids) [如木犀草素 (luteolin)、金絲桃苷 (hyperoside)、忍冬苷 (lonicerin) 等]，然金銀花所含的三萜 (triterpenes) 及三萜皂苷類 (triterpenoid saponins) 如齊墩果酸 (oleanolic acid) 及環烯醚萜類 (iridoid) 如忍冬苦苷 (secoxyloganin) 等活性物質亦具殺菌能力 (方, 2005; Xiong *et al.*, 2013)，因此，金銀花萃取物之總酚含量雖比其來源生藥僅提高 2.4 倍，而其殺菌力卻可強 5 倍以上。另，以金銀花萃取物對鯉魚鰓細胞增殖之影響進行毒性評估，結果如 Fig. 3 所示，金銀花萃取物之濃度 $\leq 281 \mu\text{g/ml}$ 對鯉魚鰓細胞增殖不具影響 ($p > 0.05$)；Liu *et al.* (2020) 也報導金銀花水萃物之濃度 $\leq 10 \text{ mg/ml}$ 對石斑脾臟細胞不具毒性。

Fig. 3 Effect of *Lonicera japonica* extract on cell viability measured by MTT assay. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=4). Means with different letters above the error bars are significantly different (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

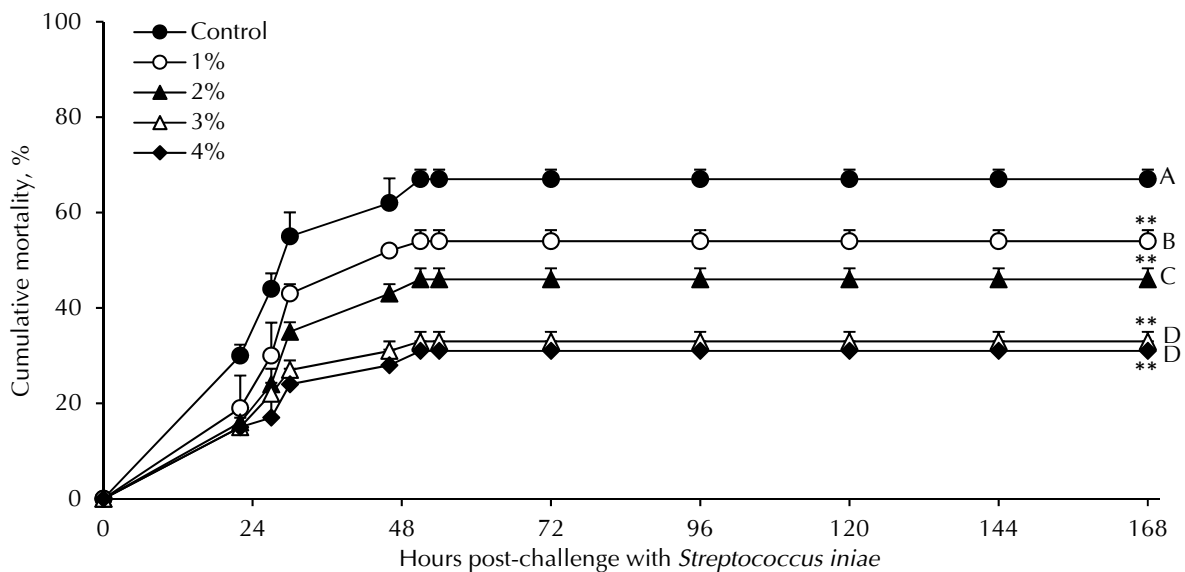
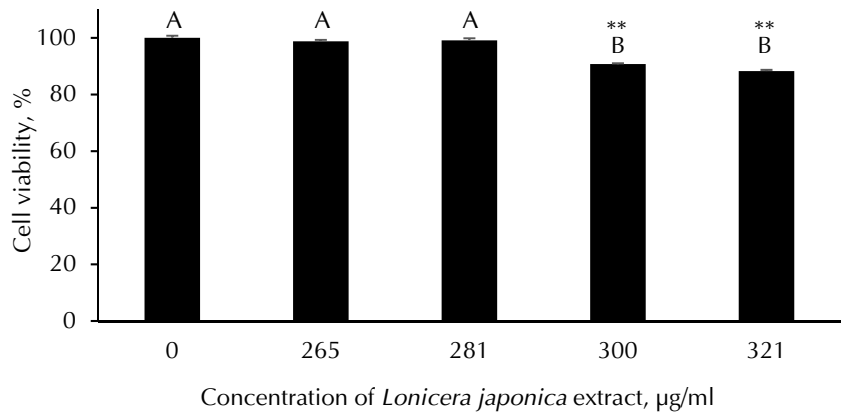


Fig. 4 Cumulative mortality of *Lates calcarifer* challenged with *Streptococcus iniae* after being fed diets supplemented with 0, 1, 2, 3, and 4% *Lonicera japonica* extract for 14 days. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=4). Means indicated by different letters are significantly different (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

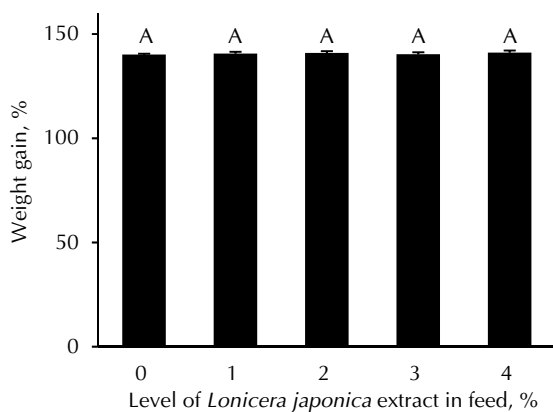


Fig. 5 Percent weight gain of *Lates calcarifer* fed diets supplemented with 0, 1, 2, 3, and 4% *Lonicera japonica* extract for 14 days. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=4). Means with the same letter above the error bar are not significantly different ($p > 0.05$).

為評估金銀花萃取物在尖吻鱷及四絲馬鮫體內對鏈球菌感染症之抗病效果並建立最佳的應用方法，乃將金銀花萃取物以 0、1、2、3 及 4% 添加於鰻魚粉製備成供試飼料，且鑒於以五倍子精萃物投餵鱷魚提高抗病力之研究結果顯示投餵 14 天即可達最佳的抗病效果 (郭等, 2020a)，因此本研究尖吻鱷之金銀花萃取物投餵期為 14 天，之後觀測其增重並以瓶鼻海豚鏈球菌進行攻擊，結果如 Fig. 4 及 5 所示，發現所有攝取金銀花萃取物添加組之尖吻鱷的抗病力皆顯著優於對照組者 ($p < 0.01$)，尖吻鱷對瓶鼻海豚鏈球菌之保護力會隨飼料中金銀花萃取物添加量增加而提高，保護力分別提高 $19.4 \pm 3.4\%$ 、 $31.3 \pm 3.4\%$ 、 $50.7 \pm 3.0\%$ 及 $53.7 \pm 3.0\%$ ，且 3 及 4% 添加組間無顯

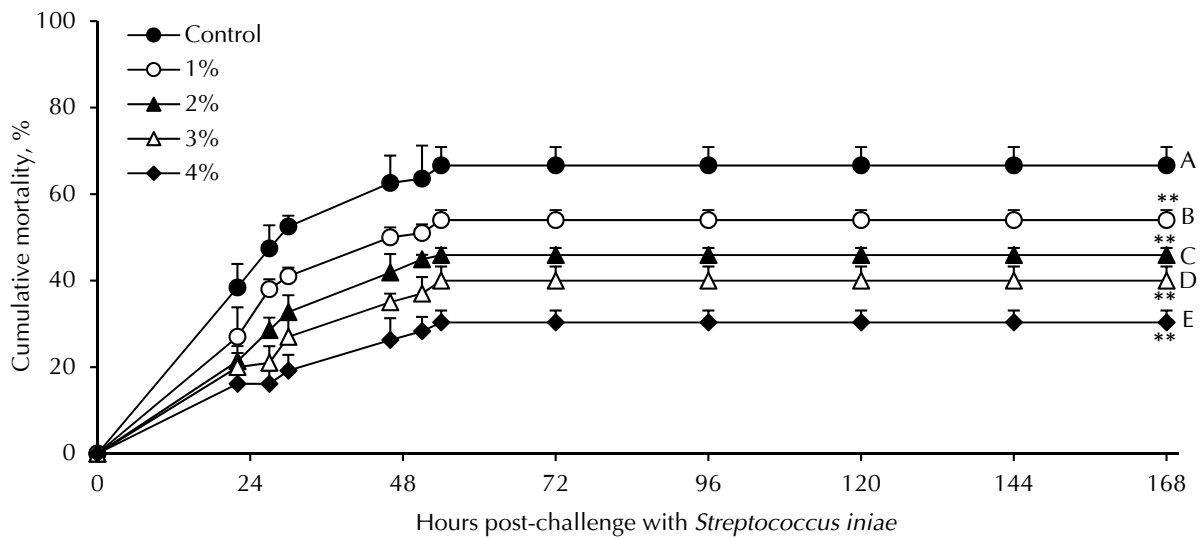
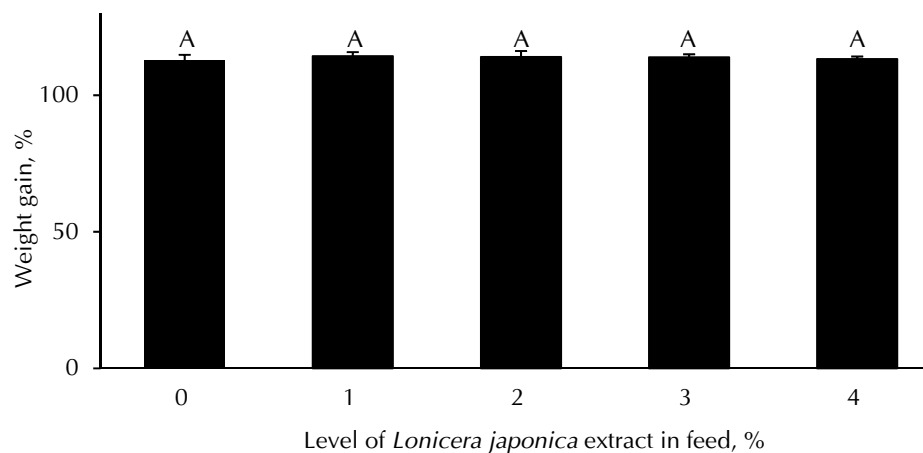


Fig. 6 Cumulative mortality of *Eleutheronema tetradactylum* challenged with *Streptococcus iniae* after being fed diets supplemented with 0, 1, 2, 3, and 4% *Lonicera japonica* extract for 28 days. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=4). Means indicated by different letters are significantly different (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Fig. 7 Percent weight gain of *Eleutheronema tetradactylum* fed diets supplemented with 0, 1, 2, 3, and 4% *Lonicera japonica* extract for 28 days. Data are shown as mean \pm standard deviation (n=4). Means with the same letter above the error bar are not significantly different ($p > 0.05$).



著差異 ($p > 0.05$)，另，所有攝取金銀花萃取物添加組之魚增重皆與對照組者間無顯著差異 ($p > 0.05$)，顯見金銀花萃取物之添加不影響尖吻鱸之成長。此外，也將上述飼料投餵四絲馬鮫，由於鑒於大蒜投餵四絲馬鮫 21 天之抗緊迫力優於投餵 14 天者以及大蒜和薑黃投餵四絲馬鮫 4 週者之溶菌酶、超氧化物歧化酶 (SOD)、抗黏液病毒 (myxovirus-resistant, Mx) 蛋白基因表現及對瓶鼻海豚鏈球菌之抗病力皆優於 14 天投餵者 (郭等, 2019, 2020b)，因此，本研究四絲馬鮫之金銀花萃取物投餵期採 4 週，之後觀測其增重並以瓶鼻海豚鏈球菌進行攻擊，結果如 Fig. 6 及 7 所示，發現所有攝取金銀花萃取物添加組魚之抗病力皆顯

著優於對照組者 ($p < 0.01$)，保護力分別提高 $18.9 \pm 3.5\%$ 、 $31.1 \pm 2.5\%$ 、 $40.0 \pm 4.9\%$ 及 $54.5 \pm 4.1\%$ ，且所有攝取金銀花萃取物添加組魚之增重皆與對照組者間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。類似的研究成果有 Liu *et al.* (2020) 分別以濃度 10 mg/ml 金銀花水萃取物混合虹彩病毒 (iridovirus) 及僅虹彩病毒對石斑進行腹腔注射處理，觀測之存活率分別為 88% 及 10%，由此可推知金銀花萃取物可有效提高石斑對虹彩病毒之抗病力；另將萃自金銀花之綠原酸以每天 190 μg 劑量加入已感染黴漿菌 (*Mycoplasma gallisepticum*) 之肉雞飲水中，可有效減少肉雞的感染率，且也能提高肉雞的增重 (Müştak *et al.*, 2015)。

總之，金銀花萃取物在活體外對瓶鼻海豚鏈球菌具抗菌力，以 1 - 4% 添加於飼料中，投餵尖吻鱸 14 天或投餵四絲馬鮫 28 天，對鏈球菌感染症皆具顯著抗病力，最佳保護力可達 50% 以上，建議的最佳應用方法，於鏈球菌症好發前 2 - 4 週，在尖吻鱸飼料中添加 3% 的金銀花萃取物投餵 14 天或於四絲馬鮫飼料中添加 4% 的金銀花萃取物投餵 28 天，可有效降低養殖魚爆發疫病之機會及死亡率，提高漁民收益。

參考文獻

- 方靜文 (2005) 金銀花活性成分綠原酸之定量研究. 中國醫藥大學中國藥學研究所 碩士論文, 98 pp.
- 楊嘉凱 (2017) 金銀花的生物活性分析. 明道大學材料與能源工程學系 碩士論文, 52 pp.
- 漁業署 (2020) 中華民國108年台閩地區漁業統計年報. 行政院農業委員會漁業署, 臺北, 臺灣.
- 衛生福利部 (2018) 臺灣中藥典 (第3版). 行政院衛生福利部, 臺北, 臺灣, p. 193.
- 郭錦朱 (2019) 中草藥在魚類養殖的應用. 水產試驗所技術手冊13, 行政院農業委員會水產試驗所編印, 基隆, 臺灣, 57 pp.
- 郭錦朱, 賴哲翊, 張博淵, 林冠宏, 周瑞良, 陳紫嫻 (2019) 薑黃及大蒜提升四絲馬鮫之抗病力研究. 2019台灣水產學會學術論文發表會, 2019年1月12日, 臺灣大學, 臺北, 臺灣, BP-03.
- 郭錦朱, 張博淵, 賴哲翊, 周瑞良 (2020a) 五倍子精萃物對尖吻鱸鏈球菌感染症之抗病效力及成長之影響. 水產研究, 28: 69-76.
- 郭錦朱、林冠宏、張博淵、賴哲翊 (2020b) 大蒜及薑黃對四絲馬鮫Mx基因表現之影響. 水試專訊, 72: 42-44.
- Baldissera, M. D., C. F. Souza, C. C. Zeppenfeld, S. Descovi, V. S. Machado, R. C. V. Santos and B. Baldisserotto (2018) Efficacy of dietary curcumin supplementation as bactericidal for silver catfish against *Streptococcus agalactiae*. Microb. Pathog., 116: 237-240.
- Bulfon, C., D. Volpatti and M. Galeotti (2015) Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. Aquac. Res., 46: 513-551.
- Dabbou, S., K. Lahbib, G. Pandino, S. Dabbou and S. Lombardo (2020) Evaluation of pigments, phenolic and volatile compounds, and antioxidant activity of a spontaneous population of *Portulaca oleracea* L. grown in Tunisia. Agriculture, 10: 353. doi:10.3390/agriculture10080353.
- Dhami, D. S., G. C. Shah, V. Kumar, Y. Joshi, M. Tripathi and M. Bisht (2018) Essential oil composition and antibacterial activity of *Agrimonia Pilosa* Ledeb (Rosaceae). Chem. Sci. Trans., 7: 499-505.
- Ding, Y., Z. Cao, L. Cao, G. Ding, Z. Wang and W. Xiao (2017) Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. Sci. Rep., 7: 45723. doi:10.1038/srep 45723.
- FAO (2020) FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb1213t>.
- Guo, J. J., B. Y. Her, R. L. Chou and T. I. Chen (2011) Screening of modern herbal medicines in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, against *Vibrio harveyi* infection. ISR J. Aquacult.-Bamid., 63(2): 1-7.
- Guo, J. J., C. M. Kuo, J. W. Hong, R. L. Chou, Y. H. Lee and T. I. Chen (2015) The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture, 435: 111-115.
- Guo, J. J., C. M. Kuo, Y. C. Chuang, J. W. Hong, R. L. Chou and T. I. Chen (2012) The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Aquaculture, 364-365: 33-38.
- Lee, Y. R., C. M. Chang, Y. C. Yeh, C. Y. F. Huang, F. M. Lin, J. T. Huang, C. C. Hsieh, J. R. Wang and H. S. Liu (2021) Honeysuckle aqueous extracts induced let-7a suppress EV71 replication and pathogenesis *in vitro* and *in vivo* and is predicted to inhibit SARS-CoV-2. Viruses 13, 308: 1-22.
- Li, Y., D. Konga and H. Wu (2018) Comprehensive chemical analysis of the flower buds of five *Lonicera* species by ATR-FTIR, HPLC-DAD, and chemometric methods. Rev. Bras. Farmacogn., 28: 533-541.
- Liu, B., X. Ge, Y. He, J. Xie, P. Xu, Y. He, Q. Zhou, L. Pan and R. Chen (2010) Effects of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail on the growth, non-specific immune response of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 310: 13-19.
- Liu, M., Q. Yu, Y. Yi, H. Xiao, D. F. Putra, K. Ke, Q. Zhang and P. Li (2020) Antiviral activities of *Lonicera japonica* Thunb. components against

- grouper iridovirus *in vitro* and *in vivo*. *Aquaculture* 519, 734882: 1-11.
- Müştaş, H. K., E. Torun, D. Özen, G. Yücel, M. Akan and K. S. Diker (2015) Effect of *Lonicera japonica* extract on *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected broiler flocks. *Br. Poult. Sci.*, 56: 299-303, DOI: 10.1080/00071668.2015.1022711.
- Shakya, S. R. and S. N. Labh (2014) Medicinal uses of garlic (*Allium sativum*) improves fish health and acts as an immunostimulant in aquaculture. *European J. Biotechnol. Biosci.*, 2: 44-47.
- Shang, X., H. Pan, M. Li, X. Miao and H. Ding (2011) *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 138: 1-21. doi:10.1016/j.jep.2011.08.016.
- Syed, S., N. Fatima and G. Kabeer (2016) *Portulaca oleracea* L.: A mini review on phytochemistry and phramacology. *Int. J. Biol. Biotech.*, 13(4): 637-641.
- Wang, Q. K., C. X. Chen, Y. J. Guo, H. Y. Zhao, J. F. Sun, S. Ma and K. Z. Xing (2011) Dietary polysaccharide from *Angelica sinensis* enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquac. Int.*, 19: 945-956.
- Xiong, J., S. Li, W. Wang, Y. Hong, K. Tang and Q. Luo (2013) Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves. *Food Chem.*, 138: 327-333.
- Xie, J., P. Xu, Y. He, Y. Cui, J. Ming, Q. Zhou and L. Pan (2012) Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the physiological responses and HSP70 gene expression of *Megalobrama amblycephala* under *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1-7.
- Yang, Y., H. Luo, X. Song, L. Yu, J. Xie, J. Yang, R. Jia, J. Lin, Y. Zou, L. Li, L. Yin, C. He, X. Liang, G. Yue and Z. Yin (2017) Preparation of *Galla chinensis* oral solution as well as its stability, safety, and antidiarrheal activity evaluation. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, ID 1851459, 8 pages; <https://doi.org/10.1155/2017/1851459>.
- Yonar, M. E., S. M. Yonar, Ü. İspir and M. Ş. Ural (2019) Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. *Fish Shellfish Immunol.*, 89: 83-90.

Effects of *Lonicera japonica* Extracts on Disease Resistance Against Streptococcosis in Barramundi (*Lates calcarifer*) and Fourfinger Threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*)

Jiin-Ju Guo*, Po-Yuan Chang, Chen-Yi Lai, Ru-Chian Lin, Yang-De Chen
and Feng-Cheng Wu

Tungkang Biotechnology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The barramundi (*Lates calcarifer*) and fourfinger threadfin (*Eleutheronema tetradactylum*) are economically important farmed fishes in Taiwan. Due to intensive farming and extreme weather conditions, they are prone to bacterial diseases, especially streptococcal infection. *Lonicera japonica* is rich in polyphenolic compounds and has broad antibacterial activity. In order to enhance disease resistance of fish, this study aimed to prepare extracts of *L. japonica* to examine their antibacterial ability *in vitro* and their effects on resistance to *Streptococcus iniae* infection of the barramundi and fourfinger threadfin. The results showed that the total phenolic content of *L. japonica* extract was 2.4 times higher than that of the crude drug source, and its chlorogenic acid content was 7%. An extract concentration less than 281 µg/ml had no effect on catfish gill cell proliferation. The barramundi and fourfinger threadfin were fed diets containing 0, 1, 2, 3, and 4% *L. japonica* extract for 14 and 28 days, respectively, and then challenged with *S. iniae*. The results showed that disease resistance of all groups given *L. japonica* extract was significantly better than that of the control group ($p < 0.01$), and the highest protection afforded was more than 50%. In conclusion, the best application method of *L. japonica* extract is 3% in the feed of barramundi for 14 days and 4% in the feed of fourfinger threadfin for 28 days.

Key words: *Lonicera japonica*, *Lates calcarifer*, *Eleutheronema tetradactylum*, *Streptococcus iniae*, antibacterial activity

*Correspondence: No. 67, Fongyu St., Tungkang, Pingtung 92845, Taiwan. TEL: (08)8324121 ext. 270; FAX: (08)8320234; E-mail: jjguo@mail.tfrin.gov.tw