

Tang H J, Zheng Y, Sun Y, *et al.* Antibacterial and preventive effects of *Terminalia chebula* and methyl gallate against *Aeromonas hydrophila* isolated from *Alosa sapidissima* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(4): 042614. [唐海军, 郑尧, 孙毅, 等. 诃子和没食子酸甲酯对美洲鲈鱼源嗜水气单胞菌抗菌活性与预防效果研究 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(4): 042614.]

诃子和没食子酸甲酯对美洲鲈鱼源嗜水气单胞菌 抗菌活性与预防效果研究

唐海军¹ 郑尧^{1,2*} 孙毅² 习丙文^{1,2} 陈凯² 徐钢春^{1,2*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘要: 为探寻防控美洲鲈(*Alosa sapidissima*)嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染的有效途径, 本研究首先从患病美洲鲈中分离鉴定出致病菌株嗜水气单胞菌YML1, 并证实其对 β -内酰胺类及四环素类抗生素具有耐药性。通过琼脂平板扩散法、牛津杯打孔法及二倍稀释法筛选, 诃子水提物及没食子酸甲酯对YML1均表现出高度敏感, 抑菌圈直径分别达(21.00 $\pm$ 0.75)和(24.00 $\pm$ 1.50) mm, 二者最小抑菌浓度(MIC), 分别为5.00和0.16 mg/mL, 最小杀菌浓度(MBC)分别为40.00和5.00 mg/mL。进一步日粮添加诃子与没食子酸甲酯, 发现均能显著提高攻毒后美洲鲈的存活率, 并能协同上调免疫相关基因(*lyz*、*tap2a*、*psmb9a*)与抗氧化基因(*gss*、*nrf1*、*cat*)的表达, 激活补体系统(C3、C4), 并提高溶菌酶(LZM)及抗氧化酶活性(SOD、GSH-Px), 以提升美洲鲈对嗜水气单胞菌的抗病能力; 诃子通过同步上调抗氧化基因(*gss*、*cat*)、天然免疫基因(*lyz*、*tlr3*)及抗原处理基因(*tap2a*)的表达, 并显著提升其对应的酶活(T-SOD、GSH-Px、LZM、C3、C4), 增强了美洲鲈的基础免疫与病原识别能力。综上, 诃子与没食子酸甲酯均可上调美洲鲈的免疫生化指标及相关基因表达, 缓解嗜水气单胞菌感染所致的应激与肝损伤, 可作为潜在的饲料添加剂用于美洲鲈细菌性疾病(嗜水气单胞菌)的防控。

关键词: 嗜水气单胞菌; 诃子; 没食子酸甲酯; 免疫调控; 抗氧化; 美洲鲈

中图分类号: S941.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)04-042614-15

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0358 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0358



美洲鲈(*Alosa sapidissima*)隶属于鲱形目(Clupeiformes)鲱科(Clupeidae)西鲱属(*Alosa*), 近年来在我国规模化养殖中发展迅速^[1,2]。在美洲鲈的病原研究中, 细菌性疾病是危害最严重的疾病类型之一。目前我国已报道的有嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[3]、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)^[4,5]等。其中, 嗜水气单胞菌是引起出血性败血症的主要病原之一, 可导致体表出血、溃疡、腹水和肠炎等典型症状^[6-9]。当前, 针对该鱼的病原分离与病害防控研究仍处于探索阶段, 缺乏系统性预防措施

及其作用机制研究, 亟须通过营养免疫调控等手段提高其抗病能力。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种广泛分布于淡水环境中的革兰氏阴性短杆状兼性厌氧条件致病菌, 能引起人-兽-鱼共患病^[10]。该菌的致病性是多种毒力因子协同作用的结果^[11]。其通过Ⅲ型/Ⅵ型分泌系统向宿主细胞注入效应蛋白, 并利用气溶素等孔形成毒素及蛋白酶、脂肪酶等胞外酶, 直接破坏宿主的物理屏障并诱导细胞裂解与凋亡^[12-14]。在免疫层面, 该菌通过分泌溶血素、蛋白酶等毒力因子, 直接破坏鱼类免疫细胞(如巨

收稿日期: 2025-10-15; 修订日期: 2025-12-29

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金创新团队项目(2023TD66)资助 [Supported by the Innovation Team Project of Grant for Basic Scientific Research by Central-Level Public Welfare Research Institute (2023TD66)]

作者简介: 唐海军(1999—), 男, 硕士研究生; 主要从事水产健康养殖研究。E-mail: 2674346412@qq.com

通信作者: 郑尧(1986—), 男, 博士, 副研究员; 主要从事水产免疫毒理学研究。E-mail: zhengy@ffrc.cn 徐钢春(1979—), 男, 博士, 研究员; 主要从事名优特色鱼类规模化繁育技术研究。E-mail: xugc@ffrc.cn *共同通信作者

噬细胞、淋巴细胞)和免疫组织(如脾脏、肾脏),导致鱼类体内炎症细胞因子白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)水平显著升高,引发全身性剧烈的炎症反应,从而导致免疫系统耗竭,甚至引发多器官功能衰竭^[15]。感染也引发剧烈氧化应激,核心抗氧化酶系活性被显著扰乱:超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性通常下降,清除自由基能力减弱;而谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GSH-Px)活性变化及非酶抗氧化剂谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量的耗竭,共同导致脂质过氧化产物丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量显著升高,标志细胞发生严重氧化损伤^[16, 17]。与此同时,感染作为强应激原还可激活特定凋亡途径,增加肝细胞的凋亡程度,消耗胆固醇,加上活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)水平急剧升高,引发代谢紊乱与免疫抑制,最终全面削弱了宿主的抗应激性能^[18, 19]。

中草药因其天然、低毒和不易产生耐药性等特点,在水产病害防控中展现出广阔的应用前景。诃子(*Terminalia chebula*)作为传统抗菌中草药,已被证实具有抗氧化、抗菌、抗炎及卓越的细胞保护和保肝特性,并且富含多种活性成分,如没食子酸甲酯(Methyl Gallate, MG)、没食子酸(Gallic acid)、单宁酸等(Tannic acid)^[20-22]。其中,没食子酸甲酯已被证实对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)具有抑制作用,最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)分别为512、256、512、512和256 $\mu\text{g/mL}$ ^[23-26]。没食子酸甲酯还被证实兼具抗炎与抗氧化活性:不仅能缓解结肠炎与关节炎^[27, 28],还可保护肝细胞抵抗过氧化氢等引发的氧化损伤^[29, 30]。

近几年长三角区域美洲鲈养殖病害多发,本研究以患病美洲鲈分离的嗜水气单胞菌为对象,通过回感实验验证其感染能力,并结合药敏实验筛选高效抑菌中草药活性成分,重点评价诃子及没食子酸甲酯的体外抑菌活性;进一步通过膳食干预实验,探究其对美洲鲈抗嗜水气单胞菌感染的预防效果,并分析其对抗氧化酶、免疫因子及应激激素的调控作用。研究结果将为中草药在水产细菌性病害防控中的应用提供理论依据,并为美洲鲈健康养殖开发新型绿色添加剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设计

患病美洲鲈采自江苏省常州市某养殖基地(120°06'E, 31°81'N),实验用异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)100尾[(体重30.0 $\pm$ 1.0) g],由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心靖江科研实验基地(120°33'E, 32°10'N)提供,美洲鲈幼鱼1000尾,购自镇江江之源渔业科技有限公司(119°82'E, 32°30'N)。实验鱼暂养于25—28℃水体中,每日投喂2次并换水1/5, 7d后随机取8尾鱼的体表黏液、鳃、肠道内容物及肝脏组织,经LB培养基28℃增菌与平板培养48h均无菌落生长,判定无细菌感染后用于实验。细菌鉴定采用的革兰氏染色试剂、营养琼脂、LB培养基购自南京建成海浩生物科技有限公司。Premix Taq聚合酶购置于大连宝生物公司、16S rRNA引物(27F/1492R)由上海生工生物工程有限公司合成。中草药诃子(*Terminalia chebula* Retz.)、五倍子(*Rhus chinensis* Mill)购自亳州川德堂药业有限公司;没食子酸($\geq 98.5\%$)、没食子酸甲酯($\geq 98\%$)、单宁酸($\geq 96\%$)等标准品购置于上海源叶生物科技有限公司。生化指标试剂盒:谷丙转氨酶(Alanine Aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate Aminotransferase, AST)、CAT、GSH-Px、T-SOD、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、酸性磷酸酶(Acid Phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AKP)、溶菌酶(Lysozyme, LZM)、鱼补体系统C3 (Complement Component C3)、C4 (Complement Component C4)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、肿瘤坏死因子- β (Tumor Necrosis Factor- β , TNF- β)、IL-1 β 、鱼皮质醇(Fish Cortisol)、鱼肾上腺素(Fish Epinephrine)均购自南京建成海浩生物科技有限公司。

100 g药材经60℃烘干后,1000 mL去离子水煎煮3次(30min/次),合并滤液浓缩至100 mL(1 g/mL),4℃保存制备好的中草药提取液。没食子酸甲酯、没食子酸和单宁酸等标准品配制成浓度为20 mg/mL的水溶液。

1.2 病原菌分离鉴定与回感实验

取病鱼肝组织划线接种营养琼脂,28℃培养24h,挑取优势菌落(命名为YML1)纯化后保存于-80℃甘油管。革兰氏染色按标准流程(结晶紫碘液酒精番红)镜检。生理生化鉴定参照《伯杰细菌鉴定手册》进行糖类代谢、酶活性等测定。扩增16S rRNA的PCR条件:95℃ 3min; 35 $\times$ (95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s); 72℃ 5min。通过MEGA11.0构

建系统发育树。

将YML1菌悬液(3.0×10^7 cfu/mL)分为腹腔注射和肌肉注射异育银鲫[(30.0±1.0) g 100 μ L/尾], 设3平行组($n=15$ /组)及生理盐水对照。记录96h死亡率, 并重新分离病原验证科赫法则。

1.3 药敏实验

取-80℃保存的YML1菌种, 复苏后接种于5 mL营养肉汤中, 28℃、180 r/min振荡培养24h。采用麦氏比浊法将菌液浓度调整为 1.0×10^8 cfu/mL备用。取菌悬液100 μ L均匀涂布于平板, 贴附药敏纸片后28℃培养24h。使用游标卡尺测量抑菌圈直径, 参考《抗微生物药物敏感性试验的执行标准》说明和CLSI标准判定敏感性: 抑菌圈直径<10mm (-)、10—15 mm (+中敏)、15—20 mm (++)高敏)、 ≥ 20 mm (+++)极敏)

1.4 中草药抑菌活性筛选

采用琼脂平板扩散法及牛津杯打孔法筛选高效抑菌中草药, 具体操作为取100 μ L浓度为 1×10^8 cfu/mL的菌液均匀涂布于LB营养琼脂培养基上, 使用无菌打孔器(直径7 mm)在平板上制备加样孔, 然后在各孔中分别加入200 μ L所制备的中草药液, 置于28℃培养24h, 测量并记录抑菌圈直径。进一步采用二倍稀释法(80.00—0.625 mg/mL), 将经过梯度稀释的样品置于28℃、180 r/min的恒温摇床中振荡培养24h, 随后观察不同药物浓度下试管内培养液的浑浊程度。若培养液颜色转为澄清, 表明细菌生长受到抑制, 此时对应的药物浓度即为最低抑菌浓度(MIC)。随后取100 μ L细菌培养液均匀涂布于LB营养琼脂培养基表面, 将接种后的平板置于28℃恒温培养箱中静置培养24h。最终, 以完全无菌落生长的最低药物浓度确定为最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)。实验设3次重复, 以无菌水为阴性对照。标准品抑菌活性方法同上, 浓度梯度为10.00—0.15625 mg/mL。

1.5 诃子与没食子酸甲酯对美洲鲈生长性能与嗜水气单胞菌半数致死浓度的确定

驯化好的美洲鲈幼苗挑选216尾, 随机分为6组(每组3个重复, 每重复12尾), 分别暴露于不同浓度的嗜水气单胞菌悬液(1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 5.0×10^7 、 1.0×10^8 cfu/mL)及空白对照(PBS)。96h攻毒实验后, 采用GraphPad Prism进行Log-Logistic非线性回归分析, 建立细菌浓度-死亡率关系模型, 计算96h半数致死浓度(Lethal Concentration, 50%, LC₅₀)。

预防实验分为两个阶段: 膳食干预(48d)和攻毒实验(21d), 前一阶段选取健康美洲鲈600尾, 随机分

为4组分别是空白对照组(K组)、攻毒对照组(D组)、0.5%没食子酸甲酯(M组)、2%诃子水提物(H组), 实验用基础饲料(饲料蛋白、脂肪、糖类含量分别为50.0%、10.0%和3.0%), 每组3个重复($n=3$), 每个重复50尾处理48d。在攻毒实验(21d)中, K组不攻毒, D、M、H组感染1/10 96h-LC₅₀嗜水气单胞菌。在实验周期内, 定期采集攻毒后7d、14d和21d的肝脏样本(每重复9尾), 液氮速冻后-80℃保存用于生化指标测定。

在实验结束后, 统一记录所有鱼体的初始体重(Initial body weight, IBW)、终末体重(Final body weight, FBW)、全长(Total length, TL)、特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/(69d)×100、存活率(Survival rate, SR, %)=100×初始鱼尾数/终末鱼尾数。

1.6 诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈相关生化指标的影响

生化指标试剂盒测定肝脏, 肝功能指标: ALT、AST; 抗氧化酶: CAT、GSH-Px、T-SOD、MDA; 免疫相关酶: ACP、AKP、LZM、C3、C4; 炎症因子: TNF- α 、TNF- β 、IL-1 β ; 应激激素: Fish Cortisol、Fish Epinephrine, 所有操作严格按说明书进行, 依据样品的浓度和OD值, 采用ELISAcalc软件计算标准曲线的回归方程, 并选用Logistic(四参数)模型进行拟合。

1.7 诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈相关基因表达的影响

采用TRIzol试剂(TaKaRa MiniBEST, 南京建成)提取美洲鲈14d的肝脏总RNA, 逆转录使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA合成试剂盒, 实时定量PCR引物参照NCBI数据库序列设计(表1)。引物的合成和试剂(TB Green Fast qPCR混合物)来源于上海生工生物工程有限公司。扩增程序: 95℃预变性5min, 95℃变性10s, 55℃退火20s, 72℃延伸20s, 共40个循环。 β -actin基因作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达水平。qPCR分析抗氧化应激基因: 谷胱甘肽合成酶(gss)、过氧化氢酶(cat)、核因子E2相关因子1(nrf1), 免疫相关基因: 溶菌酶(hyz)、Toll受体3(trl3)、抗原处理相关转运蛋白2a(tap2a)、蛋白酶体亚基 β 9a(psmb9a)。

1.8 数据处理

实验数据使用IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences 20.0)软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 表示差异显著, 结果采用GraphPad Prism 9.5进行差异柱状图分析, 均以平均值±标准误(mean±SE)表示。

2 结果

2.1 病原菌的分离鉴定

患病美洲鲈呈现典型出血性症状, 如背鳍、尾鳍破损伴出血, 腹部肿胀, 肛门红肿伴黏液渗出。解剖可见鳃丝点状出血、腹水积聚, 肠道空虚呈半透明状, 肝脏肿大且色淡。经镜检排除寄生虫感染后, 从肝脏分离获得优势菌株YML1; 形态学上该菌株在营养琼脂上形成圆形、光滑、灰白色圆形菌落, 革兰氏染色呈现为红色, 两端钝圆(图 1); 生理生化特性该菌株可发酵葡萄糖(O—F实验为F)、阿拉伯糖(不发酵肌醇/山梨醇), 硝酸盐还原、明胶

液化、精氨酸双水解酶及七叶苷水解等反应阳性(表 2); 16S rRNA PCR扩增产物经测序为1339 bp(图 2), BLAST分析显示与嗜水气单胞菌(登录号MG428960等)相似度达99%, 系统发育树确认其归属于嗜水气单胞菌分支。

动物回归感染实验结果显示, 健康异育银鲫经YML1 (3.0×10^7 cfu/mL)感染后48h内全部死亡(表 3)。病理观察注射部位明显红肿并出血, 进一步解剖发现肝脏红肿并伴随腹腔积水。

2.2 药敏实验结果

分离出来的嗜水气单胞菌菌株对庆大霉素、

表 1 qPCR分析的基因引物序列

Tab. 1 Primer sequence for gene analyzed by qPCR

基因名称 Gene name	基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')	PCR产物大小 Product size (bp)
β-肌动蛋白Reference gene	β-actin	GTGGATCAGCAAGCAGGAGT ATCCTGAGTCAAGCGCCAAA	165
谷胱甘肽合成酶Glutathione synthetase	gss	AAAGAGGGCCATGCTCAGTC GCTGCAGGGTTGTTGTCAAG	224
核因子E2相关因子1 Nuclear respiratory factor 1 isoform X3	nrf1	GGTGGATCAGAACTGGGCAA CAACACACGTTGACTCGCTG	265
溶菌酶Lysozyme C-like	lyz	AGCCTACCTCAGATCACGGT GTGAGACTCCCATTTCGGCAA	213
抗原处理相关转运蛋白2a Antigen peptide transporter 2-like	tap2a	TTCGCACTGTACGAGGGTTC CCTGCCATAGAGGAGCATGG	173
过氧化氢酶Catalase	cat	GGGGGACTCAGAGACCAGAT CAAACACGTTGGCCTTGGAG	246
蛋白酶体亚基β型9a Proteasome subunit beta type 9 protein	psmb9a	ACTGTGCCCTCTCTGGATCT CAGCGACAATGAGATGTGCG	180
样受体3 Toll-like receptor 3 Toll	tlr3	TCCTGGTACGTTTTCAGGGC GAGCAGCTGATAGTCGACCC	164

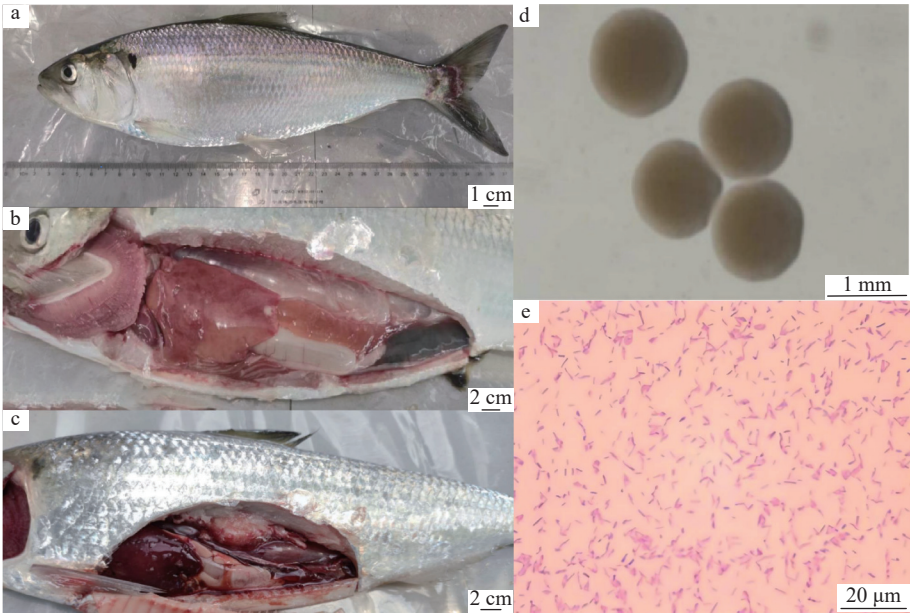


图 1 患病美洲鲈临床症状

Fig. 1 Clinical symptoms of *Alosa sapidissima*

a. 尾鳍不完整, 体表有创面; b. 肝脏泛白, 肠道半透明, 无食物; c. 肝脏红肿, 腹水, 鳃丝轻微出血; d. YML1菌落形态; e. YML1革兰氏染色结果

a. The caudal fin is incomplete, and there are wounds on the body surface; b. White liver, translucent intestine, no food; c. Liver redness, ascites, slight bleeding of gill filaments; d. YML1 colony morphology; e. YML1 Gram staining results

链霉素、红霉素等药物敏感(表 4); 对苯唑西林、氨苄西林、四环素等药物具有抗药性; 对氯苯尼考、氯霉素、阿奇霉素、头孢曲松等药物高度敏感, 抑菌圈直径是8.20—40.75 mm。

2.3 中草药及标准品抑菌活性

通过初步筛选, 将中草药和标准物质对嗜水气单胞菌敏感程度汇总于(表 5), 代表性的抑菌圈图片(图 3)。结果显示, 诃子表现出极敏(+++), 五倍

表 2 分离株生理生化结果
Tab. 2 The physiological and biochemical results

名称Name	结果Result	名称Name	结果Result	名称Name	结果Result
蕈糖Muscaric sugar	+	血清菊糖Serum inulin	+	6.5%高盐肉汤6.5%high-salt broth	-
葡萄糖Amylaceum	+	甘露糖Mannitose	+	硝酸盐(还原) Nitrate (Reduced)	+
麦芽糖Barley-suga	+	卫茅醇Melampyrin	-	苯丙氨酸Phe	-
甘露醇Mannitol	+	肌醇Inose	-	半固体琼脂Semi-solid agar	+
蔗糖Sucrose	+	山梨醇Sorbol	-	硫化氢Hydrogen sulfide	-
阿拉伯糖Arabinose	+	水杨素Salicin	+	明胶Glutin	+
木糖Xylose	-	七叶苷Esculin	+	鸟氨酸Ornithin	-
棉子糖Raffinose	-	胆汁七叶Bile sevoside	+	赖氨酸lysine	+
果糖Fructose	+	尿素Urea	+	精氨酸Arginine	+
半乳糖Galactosum	+	ONPG	+	精水Semen	+
山梨糖Sorbose	-	葡萄糖酸盐Gluconate	-	氨基酸对照Amino acid control	-
纤维二糖Cellobiose	-	枸橼酸盐Citrate	-	精水对照Semen control	-
密二糖Melibiose	-	丙二酸盐Malonate	-	蛋白胨水Peptone water	-
松三糖Melicitose	-	O—F	F		

注: 阳性(+), 阴性(-), 发酵型(F)
Note: Positive (+), Negative (-), Fermentative (F)

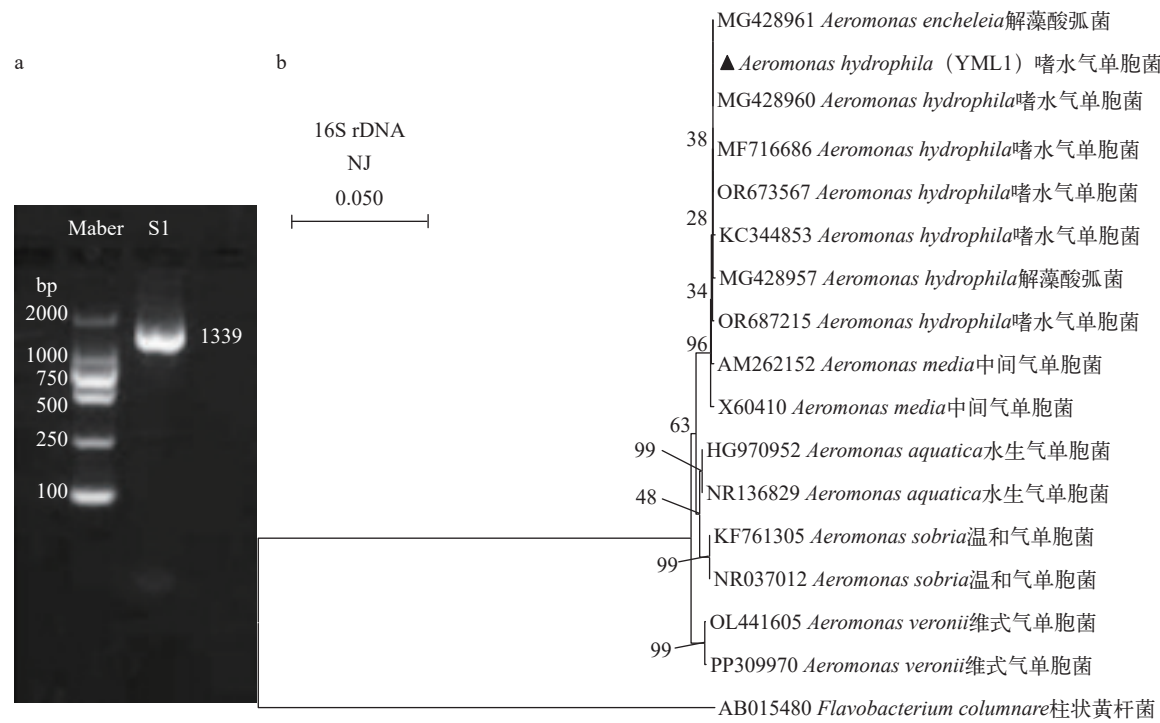


图 2 凝胶电泳结果及YML1菌株的系统发育树

Fig. 2 Gel electrophoresis results and phylogenetic tree of YML1strain

a. YML1凝胶电泳结果图, 第一列为Maker, 第二列S1为分离菌株YML1; b. 分离菌株YML1系统发育树

a. YML1 gel electrophoresis results diagram, the first column is Maker, the second column S1 is the isolated strain YML1; b. Phylogenetic tree of the isolated strain YML1

表 3 回感实验结果

Tab. 3 Reinfection test result

组别 Group	注射处理 Injection treatment	数量 Number	死亡数Mortality					死亡率 Morality (%)
			0	6h	12h	24h	48h	
腹腔注射 Intraperitoneal injection	3.0×10 ⁷ cfu/mL	15	0	0	1	3	11	100
			0	0	2	4	9	100
			0	0	2	3	10	100
肌肉注射 Intramuscular injection	3.0×10 ⁷ cfu/mL	15	0	0	6	6	3	100
			0	0	5	7	3	100
			0	0	7	6	2	100
对照组Control	生理盐水 Physiological saline	15	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0

表 4 药敏实验抑菌圈直径及敏感程度等级

Tab. 4 Bacteriostatic diameter and sensitivity level in drug susceptibility test (mean±SE, n=5)

序号No.	药物Antibiotic	抑菌圈直径Diamete of the inhibitory circle (mm)	敏感程度Sensitivity	抑菌等级Antibacterial level
1	青霉素Penicillin	—	—	—
2	苯唑西林Oxacillin	—	—	—
3	氨苄西林Ampicillin	—	—	—
4	哌拉西林Piperacillin	22.46±1.25	极敏	+++
5	头孢氨苄Cefalexin	—	—	—
6	头孢唑啉Cefazolin	—	—	—
7	头孢呋辛Cefuroxime	23.53±0.83	极敏	+++
8	头孢他啶Ceftazidime	25.45±0.90	极敏	+++
9	头孢曲松Ceftriaxone	29.36±1.26	极敏	+++
10	头孢哌酮Cefoperazone	26.65±1.74	极敏	+++
11	恩诺沙星Ennosault	20.65±0.40	极敏	+++
12	阿米卡星Amikacin	22.40±1.30	极敏	+++
13	庆大霉素Gentamicin	19.80±0.40	高敏	++
14	卡那霉素Kanamycin	21.35±0.62	极敏	+++
15	链霉素Streptomycin	19.45±0.41	高敏	++
16	四环素Achromycin	—	—	—
17	米诺环素Minocycline	—	—	—
18	红霉素Erythromycin	17.35±0.45	高敏	++
19	阿奇霉素Azithromycin	30.75±2.15	极敏	+++
20	诺氟沙星Norfloxacin	28.55±1.65	极敏	+++
21	环丙沙星Ciprofloxacin	28.85±0.65	极敏	+++
22	林可霉素Cillimycin	—	—	—
23	万古霉素Vancomycin	—	—	—
24	多黏菌素B Polymyxin B	11.65±0.85	中敏	+
25	复方新诺明 Bactrim	15.45±0.96	中敏	+
26	氯霉素Chloramghenicol	36.40±2.85	极敏	+++
27	克林霉素Clindamycin	—	—	—
28	左氧氟沙星Levofloxacin	27.45±1.85	极敏	+++
29	亚胺培南Imipenem	10.20±0.30	中敏	+
30	强力霉素Doxycycline	8.20±0.25	中敏	+
31	氟苯尼考Florfenicol	40.75±0.75	极敏	+++
32	新霉素Neomycin	21.65±0.85	极敏	+++

子为高敏(++), 两者均显示出良好抑菌活性。基于文献调研, 本文进一步选取了这两种药材中共有的三种标准物质(单宁酸、没食子酸和没食子酸甲酯)进行深入研究。抑菌实验结果显示: 没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌表现出极度敏感(+++)的抑菌活性; 单宁酸和没食子酸显示高度敏感(++)的抑菌活性。

2.4 诃子与没食子酸甲酯对美洲鲈嗜水气单胞菌的半数致死浓度及生长性能

使用GraphPad Prism进行非线性回归分析, 得出美洲鲈96h-LC₅₀是1.58×10⁶ cfu/mL (图4)。据表6所示, 各实验组美洲鲈的终末体重、全长和特定生长率均无显著差异。在存活率方面, M组与H组均显著高于D组($P<0.05$); K组存活率显著高于M组($P<0.05$), 但与H组无显著差异。

2.5 日粮中添加诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈相关生化指标的影响

没食子酸甲酯组(M组)的免疫与抗氧化指标呈现明确的时序性高峰(图5)。在免疫方面, 补体(C3、C4)与TNF-β水平在14d达到同期峰值($P<0.05$); 而IL-1β、TNF-α及应激激素(皮质醇、肾上腺素)则在21d升至最高($P<0.05$)。在抗氧化方面, MDA含量、GSH-Px、CAT活性在14d显著高于其他组($P<0.05$); 至21d, MDA、GSH-Px、CAT及T-SOD活性均维持同期最高水平($P<0.05$), 与此对应, 该组的ALT在整个实验期间持续处于最高水平, AST活性在各时间点也均处于前列。

攻毒后7d, 攻毒对照组(D组)的炎症因子(IL-1β、TNF-α、TNF-β)与补体成分(C3、C4)水平均显著高于空白组(K组)($P<0.05$), 表明细菌感染模型成功建立并引发了急性免疫应激(图6和图7)。

诃子组(H组)则表现出持续增强的免疫激活模式。在14d, 其IL-1β与T-SOD活性显著高于其他处理组($P<0.05$), 同时补体(C3、C4)、LZM、GSH-Px及T-SOD活性均显著高于D组($P<0.05$)。至21d, H组的补体(C3、C4)、炎症因子(IL-1β、TNF-α)及应激激素水平进一步显著高于D组($P<0.05$), 其中补体C3达到其自身峰值($P<0.05$)。在肝功能指标方面, 该组的ALT水平在21d恢复至与空白组相当, AST活性则在14d出现高峰后, 于21d降至较低水平。

2.6 日粮中添加诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈相关基因表达的影响

攻毒14d的肝脏qPCR结果表明(图7): M组能全面上调抗氧化基因(*gss*、*nrf1*、*cat*)与免疫基因(*lyz*、*tap2a*、*psmb9a*)的表达, 与攻毒组差异显著($P<0.05$), 且其*lyz*与*psmb9a*的表达强度显著优于H组($P<0.05$)。H组则显著提升了部分抗氧化基因(*gss*、*cat*)及免疫基因(*lyz*、*tap2a*、*tlr3*)的表达水平, 与攻毒组差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 病原菌分离鉴定、药敏结果与抑菌活性

嗜水气单胞菌是一种常见的水生动物条件性致病菌, 可引发运动性气单胞菌败血症, 其典型病

表 5 中草药及标准品体外抑菌效果

Tab. 5 Antibacterial effect of Chinese herbal medicine and standard drugs in vitro (mean±SE, n=5)

药物 Antibiotic	抑菌圈直径 Diameter (mm)	敏感程度 Sensitivity	最小抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration, MIC (mg/mL)	最小杀菌浓度 Minimum bactericidal concentration, MBC (mg/mL)
诃子 <i>Terminalia chebula</i>	21.00±0.75	极敏	5.00	40.00
五倍子 <i>Rhus chinensis</i>	19.5±0.50	高敏	5.00	40.00
单宁酸Tannic acid	18.50±0.50	高敏	2.50	5.00
没食子酸甲酯Methyl gallate	24.00±1.50	极敏	0.16	5.00
没食子酸Gallic acid	19.50±0.50	高敏	2.50	5.00

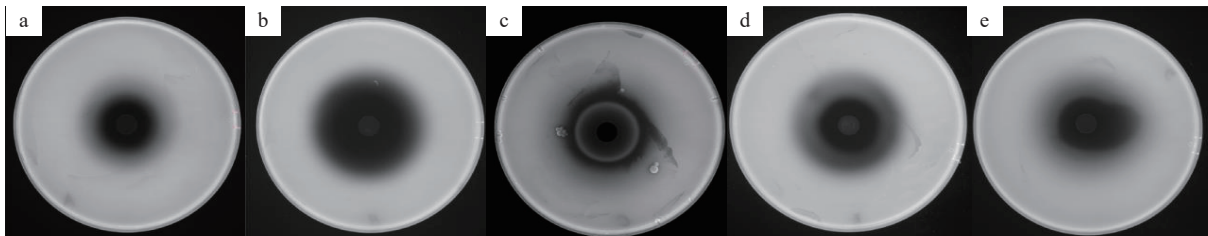


图 3 筛选抑菌中草药单体及标准物质的体外抑菌结果

Fig. 3 Screening of antibacterial Chinese herbal monomer and standard substance in vitro antibacterial results

a. 单宁酸; b. 没食子酸; c. 没食子酸甲酯; d. 五倍子; e. 诃子

a. tannic acid; b. gallic acid; c. methyl gallate; d. *Rhus chinensis* Mill; e. *Terminalia chebula* Retz

理特征主要包括泄殖腔红肿出血、腹腔积水、胃肠炎性出血及皮肤溃疡等^[31-34]。该菌的致病性依赖于丝氨酸蛋白酶、气溶素及Ⅲ型分泌系统等关键毒力因子^[35],但其引发的病理表现具有显著的宿主差异性: 鲤科鱼类常表现为体表溃疡与出血性败血症^[36]; 鲑科鱼类则多以皮肤溃烂和肝脾肿大为主^[37],而在两栖类中则易引发“红腿病”。

本研究从患病美洲鲈体内分离得到一株病原菌——嗜水气单胞菌YML1。该菌株可导致美洲鲈出现体表出血、鳃丝溃烂、腹水及肝脾充血等症状,这些症状在感染嗜水气单胞菌的异育银鲫中也曾出现^[1, 38, 39]。药敏实验显示,菌株YML1对β-内酰胺类抗生素(如青霉素、苯唑西林、氨苄西林)、部分头孢菌素(头孢氨苄、头孢唑啉)及四环素类(四环素、米诺环素)完全耐药(抑菌圈直径<10 mm),与气单胞菌属广泛耐药性一致^[40, 41];但对三代头孢菌素(头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮)极敏感(抑菌圈>25 mm)。

针对细菌耐药性问题,中草药因抗菌谱广、资源丰富、安全性高、不易诱导耐药及可调节肠道微生态等优势,成为防控耐药菌的研究热点。抗菌中草药既能直接抑制或杀灭病原微生物,又可调节

机体免疫^[42]。诃子作为一种广谱抗菌中草药,在抑制水产病原菌方面展现出独特的优越性^[43]。研究表明,其对多种致病菌均具有抑菌活性,包括沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、大口黑鲈源嗜水气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、乌鳢源维氏气单胞菌以及幽门螺杆菌等^[44-48]。除抗菌作用外,研究还发现诃子可作为诱食剂,提高凡纳滨对虾的摄食率^[49]。

周坤等^[50]从诃子中分离鉴定出94种成分,其中没食子酸及其酯类占比达25.5%^[51]。没食子酸甲酯作为其中的关键抗菌成分,能够通过破坏细菌膜结构、引起pH下降、改变膜电位并降低ATP水平,从而发挥抑菌作用^[52],该成分在单独或联合用药中均显示出良好的治疗潜力^[53]。本研究中的没食子酸甲酯未被列入《水产养殖用药明白纸2024》禁药。

多项研究采用水提煎煮结合牛津杯法筛选抗菌中药,如诃子和五倍子的水提液对鲤鱼源嗜水气单胞菌分别为极度敏感和中度敏感^[54];嗜水气单胞菌对苏木、诃子、黄芩、五倍子等8种中药水提液极敏感^[55];山楂水提液对罗非鱼大肠杆菌抑菌效果最佳^[56]。本研究通过琼脂平板扩散法、牛津杯打孔法及二倍稀释法筛选证实,诃子及没食子酸甲酯对美洲鲈源嗜水气单胞菌具有较强抑菌效果。然而,诃子水提物的最低杀菌浓度(MBC)较高,提示其水提取物中活性成分(如鞣质、多酚类)浓度可能不足,若采用甲醇或乙酸乙酯提取,有望获得抑菌活性更强的活性物质。

3.2 诃子与没食子酸甲酯对美洲鲈生长性能与嗜水气单胞菌半数致死浓度的确定

添加0.5%的没食子酸甲酯或2%的诃子水提取物,对美洲鲈的正常生长性能不会产生影响,但诃子含有酚酸类、鞣质类、三萜类及黄酮类等多种活性成分,具有抗氧化、神经保护、抗肿瘤、抗病毒和抗菌等多种药理活性^[57, 58]。而没食子酸及其甲酯衍生物具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抑菌等生物活性^[59, 60]。

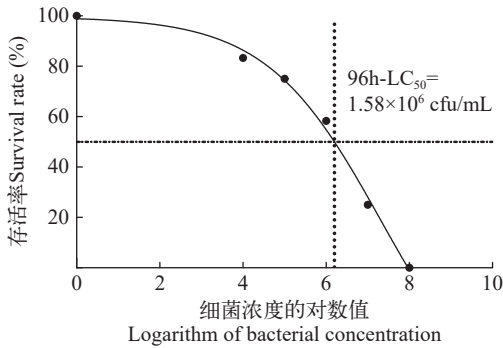


图4 嗜水气单胞菌攻毒美洲鲈96h-LC₅₀

Fig. 4 96h-LC₅₀ of *A. hydrophila* challenge in *A. sapidissima* after 96h exposure

表6 诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈生长性能及存活率的影响

Tab. 6 Effects of *Terminalia chebula* and methyl gallate on the growth performance and survival rate of *A. sapidissima* challenged with *A. hydrophila*

组别Group	K	D	M	H
初始体重IBW (g)	1.28±0.35	1.41±0.38	1.35±0.33	1.39±0.36
终末体重FBW (g)	7.44±0.48	7.25±0.67	7.38±0.98	7.48±1.60
全长TL (mm)	85.11±6.75	84.54±5.51	86.83±6.16	86.14±9.02
特定生长率SGR (%/d)	2.55±0.28	2.37±0.30	2.46±0.35	2.44±0.40
存活率SR (%)	94.00±2.00 ^a	79.33±3.06 ^c	88.67±3.06 ^b	90.67±2.31 ^{ab}

注: 数据后的小写字母(a、b、c)为差异性标记, 字母不同表示差异显著($P<0.05$), 字母相同则表示差异不显著
Note: Lowercase letters (a, b, c) following the data serve as markers for significant differences; Different letters indicate statistically significant difference at $P<0.05$, while the same letter denotes no significant difference

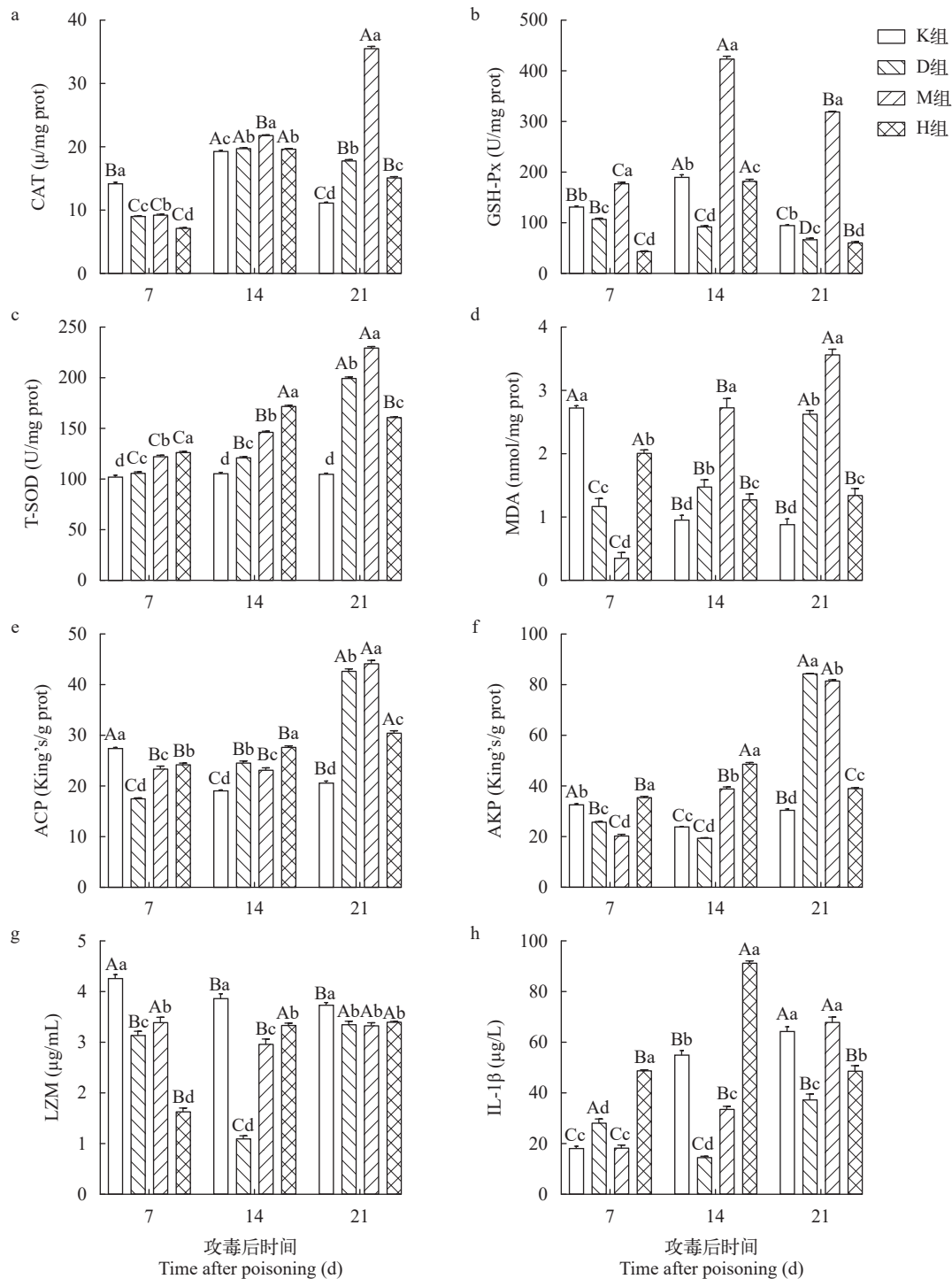


图5 日粮中添加诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈抗氧化性能和免疫性能的影响

Fig. 5 Effects of dietary supplementation of *Terminalia chebula* and methyl gallate on the antioxidant and immune performance of *A. sapidissima* after *A. hydrophila* challenge

大写字母(A、B、C...): 用于同一实验组在不同时间点的比较; 小写字母(a、b、c...): 用于同一时间点下不同实验组间的比较; 字母不同(如A vs. B 或 a vs. b)表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母则无显著差异, 下同。a. 过氧化氢酶(CAT); b. 谷胱甘肽过氧化物歧化酶(GSH-Px); c. 总超氧化物歧化酶(T-SOD); d. 丙二醛(MDA); e. 酸性磷酸酶(ACP); f. 碱性磷酸酶(AKP); g. 溶菌酶(LZM); h. 白介素(IL-1 β)

Uppercase letters (A, B, C...): Used for comparisons within the same experimental group across different time points. Lowercase letters (a, b, c...): Used for comparisons among different experimental groups at the same time point; Different letters (e.g., A vs. B or a vs. b) indicate statistically significant differences ($P < 0.05$), while the same letters denote no significant difference. The same as above; a. Catalase (CAT); b. Glutathione Peroxidase (GSH-Px); c. Total Superoxide Dismutase (T-SOD); d. Malondialdehyde (MDA); e. Acid Phosphatase (ACP); f. Alkaline Phosphatase (AKP); g. Lysozyme (LZM); h. Interleukin-1 β (IL-1 β)

与攻毒组(D组)相比, 没食子酸甲酯(M组)和诃子水提取物添加组(H组)的存活率均显著提升。通过

非线性回归分析, 确定本研究所用嗜水气单胞菌对美洲鲈的96h-LC₅₀为 1.58×10^6 CFU/mL。类似病原

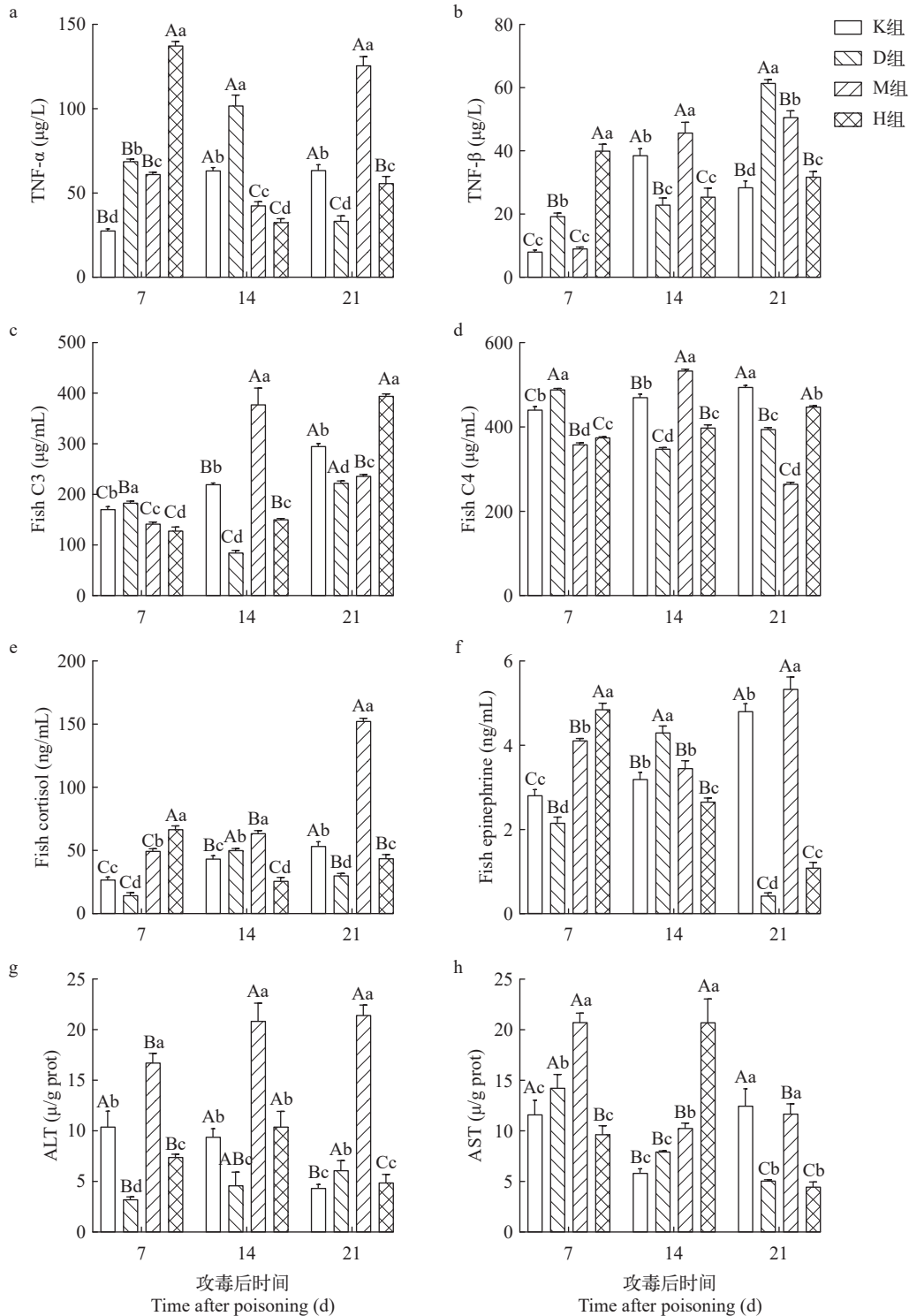


图6 日粮中添加诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈炎症因子、鱼补体系统及肝功能的影响

Fig. 6 Effects of dietary supplementation of *Terminalia chebula* and methyl gallate on inflammatory factors, complement system, and liver function of *A. sapidissima* after *A. hydrophila* challenge

a. 肿瘤坏死因子-α (TNF-α); b. 肿瘤坏死因子-β (TNF-β); c. 鱼补体C3; d. 鱼补体C4; e. 鱼皮质醇(Fish cortisol); f. 鱼肾上腺素(Fish epinephrine); g. 谷丙转氨酶(ALT); h. 谷草转氨酶(AST)

a. Tumor necrosis factor-α (TNF-α); b. Tumor necrosis factor-β (TNF-β); c. Fish complement C3; d. Fish complement C4; e. Fish cortisol; f. Fish epinephrine; g. Alanine aminotransferase (ALT); h. Aspartate aminotransferase (AST)

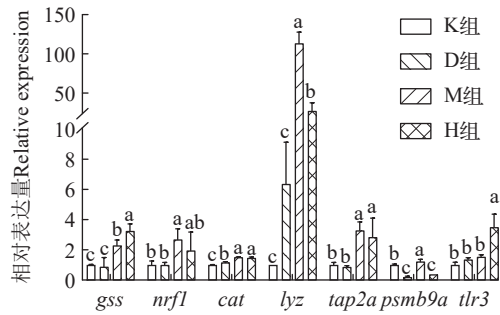


图7 日粮中添加诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈相关基因表达的影响

Fig. 7 Effects of dietary supplementation with *Terminalia chebula* and methyl gallate on the expression of related genes in *A. sapidissima* challenged with *A. hydrophila*

菌对鲤和中华鳖的96h-LC₅₀分别为 8.21×10^6 和 1.7×10^6 CFU/mL^[61, 62], 因此本实验采用1/10 LC₅₀浓度开展下一步实验。

3.3 日粮中添加诃子和没食子酸甲酯对嗜水气单胞菌攻毒后美洲鲈相关生化指标和基因表达的影响

细菌入侵可诱发免疫细胞发生呼吸暴发, 产生大量ROS, 过量ROS会损伤免疫细胞, 并破坏组织细胞完整性, 形成坏死灶, 为细菌定植与繁殖创造条件。此外, 过度炎症反应虽有助于杀菌, 但也会加剧组织损伤与免疫抑制, 促进细菌扩散。有研究表明诃子所含的没食子酸与鞣花酸能够有效清除过量ROS^[63]; 诃子水提取物可抑制脂质过氧化, 保护SOD活性, 并防止DNA链断裂及细胞凋亡^[64]。没食子酸甲酯也被证明可抑制氧化应激, 减少谷胱甘肽消耗^[65, 66]。本研究表明两者能显著提高GSH-Px、CAT和T-SOD的活性, 并同步上调了抗氧化通路关键基因(*nrfl*、*gss*、*cat*)的表达。

研究表明两者还可通过调控TLR4/NF-κB和MAPK信号通路, 影响IL-6、IL-1β等炎症介质的生成, 从而发挥抗炎作用^[67-69]。这种多途径调控体现在免疫指标的动态调节, 例如, 在感染中期(14d)两者显著增强了非特异性免疫(补体、溶菌酶)与抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px)活性, 到了感染后期(21d)处理组仍维持较高的免疫效应指标与应激激素水平, 肝功能指标(ALT、AST)在实验后期也可恢复至正常水平。

本研究表明没食子酸甲酯能同步有效激活美洲鲈的免疫与抗氧化防御系统。这表现在补体(C3、C4)和特征炎症因子(IL-1β、TNF-α、TNF-β)表达水平显著提升, 伴随这一强烈的免疫动员过程, 肝脏代谢标志物——ALT与AST的活性也相应维持

在较高水平。

有研究表明没食子酸甲酯能调控炎症反应, 避免过度免疫造成的组织损伤^[67-69]。在本研究中, 诃子与没食子酸甲酯处理后美洲鲈肝脏中*lyz*和补体(C3、C4)等基因表达显著上调。诃子组在感染后期ALT和AST的恢复, 提示其可能通过缓解肝损伤而发挥保肝作用^[70]。诃子因富含鞣花酸、没食子酸等自由基清除剂, 能抑制脂质过氧化, 保护SOD活性, 并防止DNA损伤^[71], 还能调控细胞色素P450系统, 维持肝脏中GSH的平衡, 从而从源头上减轻氧化损伤^[72, 73]。其中的主要活性成分没食子酸甲酯也被证明可通过激活Nrf2/HO-1/PRDX3信号轴保护线粒体功能来抑制凋亡通路^[57]。为进一步确定日粮添加诃子与没食子酸甲酯对美洲鲈源嗜水气单胞菌的保护效果, 单一物质和中草药本身、中草药活性物质与明白纸中抗生素联用对美洲鲈源嗜水气单胞菌的防控效果都值得进一步研究。

4 结论

本实验从患出血症病美洲鲈中成功分离出1株致病菌YML1, 并鉴定为嗜水气单胞菌。该菌感染可引起美洲鲈背鳍、尾鳍、腮丝等多处出血等典型病理变化。

药敏实验筛选出诃子及其活性成分没食子酸甲酯, 对美洲鲈源嗜水气单胞菌均具有显著抑菌效果且诃子和没食子酸甲酯均能显著提高攻毒后美洲鲈的存活率, 诃子的效果更显著。通过进一步的膳食干预, 从酶活与基因表达两个层面共同阐明: 没食子酸甲酯能协同上调免疫相关基因(*lyz*、*tap2a*、*psmb9a*)与抗氧化基因(*gss*、*nrfl*、*cat*)的表达, 并同步激活补体系统及抗氧化酶活性; 诃子显著上调抗氧化基因(*gss*、*cat*)与免疫基因(*lyz*、*tlrs*、*tap2a*), 同步激活抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px)和免疫效应物(溶菌酶、补体)活性。综上, 诃子与没食子酸甲酯均能上调美洲鲈的免疫生化指标及相关基因表达, 缓解嗜水气单胞菌感染所致的应激与损伤, 可作为潜在的饲料添加剂用于美洲鲈细菌性(嗜水气单胞菌)疾病的防控。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Chen K, Li J, Zheng Y, et al. A study on bacterial etiology and histopathology associated with hemorrhagic disease in American shad *Alosa sapidissima* [J]. *Aquaculture Research*, 2024, 2024(1): 8869167.
- [2] Liang Z Y, Miao L H, Liu Y, et al. Effect of temperature

- on embryonic development of shad [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2025, **49**(8): 36-47. [梁政远, 缪凌鸿, 刘影, 等. 温度对美洲鲈胚胎发育的影响 [J]. 水产学报, 2025, **49**(8): 36-47.]
- [3] Wang H L, Jin H Y, Gao Y, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from American shad [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, **45**(2): 257-266. [王会林, 晋怀远, 高晔, 等. 美洲鲈鱼嗜水气单胞菌病原的分离与鉴定 [J]. 渔业科学进展, 2024, **45**(2): 257-266.]
- [4] Wang S X, Li L, Diao J, *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of *Aeromonas sobria* isolated from shad (*Tenualosa reevesii*) [J]. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 2020, **10**(5): 35-37. [王淑娴, 李乐, 刁菁, 等. 鲈鱼源温和气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 农业灾害研究, 2020, **10**(5): 35-37.]
- [5] Gao X H, Gao W, Zhang M H. In vitro antibacterial activity of 40 Chinese herbal medicines against *Aeromonas sobria* isolated from *Alosa sapidissima* [J]. *Feed Industry*, 2023, **44**(12): 67-73. [高晓华, 高玮, 张明辉. 40种中草药对美洲鲈源温和气单胞菌的体外抑菌作用研究 [J]. 饲料工业, 2023, **44**(12): 67-73.]
- [6] Yang Y B, Ai X H, Xia Y T, *et al.* Diagnosis and treatment of a case of *Aeromonas veronii* infection in *Alosa sapidissima* [J]. *Fishery Guide to Be Rich*, 2014(23): 58-59. [杨移斌, 艾晓辉, 夏永涛, 等. 一例美国鲈鱼维氏气单胞菌病的诊断与治疗 [J]. 渔业致富指南, 2014(23): 58-59.]
- [7] Liu W. Proteomic analysis of the liver of black carp Infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(2): 330-339. [刘问. 嗜水气单胞菌感染青鱼肝脏的蛋白质组学分析 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(2): 330-339.]
- [8] Deng G C, Jiang X Y, Ye X, *et al.* Isolation, identification and physicochemical characteristics of *Aeromonas hydrophila* mixed infected in hemorrhagic disease of grass carp [J]. *Microbiology*, 2009, **36**(8): 1170-1177. [邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性 [J]. 微生物学通报, 2009, **36**(8): 1170-1177.]
- [9] Huang S H, Li S H, Zhou Y H, *et al.* Establishment and evaluation of an enteritis model in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2024, **42**(4): 886-898. [黄双慧, 李书含, 周永恒, 等. 嗜水气单胞菌感染大口黑鲈肠炎模型的建立及评价 [J]. 四川农业大学学报, 2024, **42**(4): 886-898.]
- [10] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, **23**(1): 35-73.
- [11] Sha J, Pillai L, Fadl A A, *et al.* The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infection and Immunity*, 2005, **73**(10): 6446-6457.
- [12] Bingle L E, Bailey C M, Pallen M J. Type VI secretion: a beginner's guide [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, **11**(1): 3-8.
- [13] Pang M, Jiang J, Xie X, *et al.* Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics [J]. *Scientific Reports*, 2015(5): 9833.
- [14] Sierra J C, Suarez G, Sha J, *et al.* Unraveling the mechanism of action of a new type III secretion system effector AexU from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2010, **49**(3): 122-134.
- [15] Yang Y B, Fu X Q, Chen B X, *et al.* Effects of *Aeromonas hydrophila* infection on iron metabolism in the liver of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2015, **34**(4): 97-101. [杨永波, 扶晓琴, 陈柏湘, 等. 嗜水气单胞菌感染对团头鲂肝脏铁代谢的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2015, **34**(4): 97-101.]
- [16] Chen J, Liu N, Zhang H, *et al.* The effects of *Aeromonas hydrophila* infection on oxidative stress, nonspecific immunity, autophagy, and apoptosis in the common carp [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020(105): 103587.
- [17] Monserrat J M, Martínez P E, Geracitano L A, *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, **146**(1/2): 221-234.
- [18] Pal S, Roy D, Ray S D, *et al.* *Aeromonas hydrophila* induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in liver and spleen of *Labeo rohita* mediated by calcium and reactive oxygen species [J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2020(20): 255-266.
- [19] Wang Z, Zhai W, Ye C, *et al.* Mechanisms and interventions of *Aeromonas hydrophila*-induced hepatic injury in *Megalobrama amblycephala*: Focus on oxidative stress-mediated mitochondrial apoptosis [J]. *Aquaculture*, 2026(612): 743139.
- [20] Ding G, Liu Y Z, Song M P, *et al.* Polyphenolic constituents from the fruit of *Terminalia chebula* [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2001, **32**(3): 193-196. [丁岗, 刘延泽, 宋毛平, 等. 诃子中的多元酚类成分 [J]. 中国药科大学学报, 2001, **32**(3): 193-196.]
- [21] Kesharwani A, Polachira S K, Nair R, *et al.* Anti-HSV-2 activity of *Terminalia chebula* Retz extract and its constituents, chebulagic and chebulinic acids [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, **17**(1): 110.
- [22] Li X D, Luo X M, Ma Z, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Terminalia bellerica* and predictive analysis on its quality marker (Q-Marker) [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, **54**(3): 976-990. [李雪冬, 罗晓敏, 马箴, 等.]

- 毛诃子化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. 中草药, 2023, **54**(3): 976-990.]
- [23] Flores-Maldonado O, Dávila-Aviña J, González G M, *et al.* Antibacterial activity of Gallic acid and methyl gallate against emerging non-fermenting bacilli [J]. *Folia Microbiologica*, 2025, **70**(1): 127-135.
- [24] Keyvani-Ghamsari S, Rahimi M, Khorsandi K. An update on the potential mechanism of Gallic acid as an antibacterial and anticancer agent [J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, **11**(10): 5856-5872.
- [25] Olmedo-Juárez A, Briones-Robles T I, Zaragoza-Bastida A, *et al.* Antibacterial activity of compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Willd against important bacteria in public health [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019(136): 103660.
- [26] Samreen, Ahmad I. Anti-infective synergy of *Acacia nilotica* bioactive fraction and methyl gallate with meropenem against pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *3 Biotech*, 2025, **15**(7): 209.
- [27] Anzoise M L, Basso A R, Del Mauro J S, *et al.* Potential usefulness of methyl gallate in the treatment of experimental colitis [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, **26**(3): 839-849.
- [28] Correa L B, Almeida Pádua T, Alabarse P V G, *et al.* Protective effect of methyl gallate on murine antigen-induced arthritis by inhibiting inflammatory process and bone erosion [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, **30**(1): 251-266.
- [29] Ng T B, Wong J H, Tam C, *et al.* Methyl Gallate as an Antioxidant and Anti-HIV Agent [M]//Preedy V R, Watson R R (Eds.), HIV/AIDS. San Diego: Academic Press, 2018: 161-168.
- [30] Khurana S, Hollingsworth A, Piche M, *et al.* Antiapoptotic actions of methyl gallate on neonatal rat cardiac myocytes exposed to H₂O₂ [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, **2014**(1): 657512.
- [31] Zhang X, Wu W, Li L, *et al.* Genetic variation and relationships of seven sturgeon species and ten interspecific hybrids [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2013, **45**(1): 21.
- [32] Pridgeon J W, Klesius P H. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009 [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, **94**(3): 249-253.
- [33] Elsheshtawy A, Yehia N, Elkemary M, *et al.* Investigation of Nile tilapia summer mortality in Kafr El-Sheikh governorate, Egypt [J]. *Genetics of Aquatic Organisms*, 2019, **3**(1): 17-25.
- [34] Korní F M M, EL-Nahass E S, Ahmed W. An outbreak of Motile *Aeromonas Septicemia* in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with reference to hematological, biochemical and histopathological alterations [J]. *Journal of Fish Pathology*, 2017, **30**(1): 11-24.
- [35] Li J, Ni X D, Liu Y J, *et al.* Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, **110**(3): 823-830.
- [36] Li N, Guo H Z, Jiao R, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity study of a pathogen causing an acute bacterial disease in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(6): 980-987. [李楠, 郭慧芝, 焦冉, 等. 草鱼的一种急性细菌性传染病病原的分离鉴定及致病性研究 [J]. 水生生物学报, 2011, **35**(6): 980-987.]
- [37] Fečkaninová A, Koščová J, Mudroňová D, *et al.* The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2017(469): 1-8.
- [38] Wu J Y, Chen K, Xi B W, *et al.* Effects of magnolol on antioxidant factors and expression of anti-inflammatory TLR-5/MyD88 pathway genes in *Carassius auratus gibelio* infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(5): 579-590. [吴家玉, 陈凯, 习丙文, 等. 厚朴酚对嗜水气单胞菌感染异育银鲫的抗氧化因子及抗炎TLR-5/MyD88通路基因表达的影响 [J]. 中国水产科学, 2021, **28**(5): 579-590.]
- [39] Liu Y N, Liang L G, Gu W, *et al.* Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Journal of Aquatic Ecology*, 2012, **33**(5): 108-113. [刘亚楠, 梁利国, 顾伟, 等. 异育银鲫致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定与药敏特性研究 [J]. 水生态学杂志, 2012, **33**(5): 108-113.]
- [40] Canellas A L B, de Oliveira B F R, Laport M S. Hiding in plain sight: characterization of *Aeromonas* species isolated from a recreational estuary reveals the carriage and putative dissemination of resistance genes [J]. *Antibiotics*, 2023, **12**(1): 84.
- [41] Rosso F, Cedano J A, Parra-Lara L G, *et al.* Emerging carbapenem-resistant *Aeromonas* spp. infections in Cali, Colombia [J]. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2019, **23**(5): 336-342.
- [42] Yu S Y, Tian Y, Kong W H, *et al.* Research status and prospects of traditional Chinese medicine against infections [J]. *China Pharmaceuticals*, 2025, **34**(18): 139-144. [于尚玥, 田杨, 孔维华, 等. 中药抗感染研究现状与展望 [J]. 中国药业, 2025, **34**(18): 139-144.]
- [43] Yang Y H, Hou L Y, Yang Y, *et al.* Research progress on composition, biological functions and application of *Terminalia chebula* in aquaculture [J]. *Feed Research*, 2022, **45**(15): 144-148. [杨雨航, 侯璐瑶, 杨映, 等. 诃子的成分、生物学功能及其在水产养殖领域中应用的研究进展 [J]. 饲料研究, 2022, **45**(15): 144-148.]
- [44] Phadke S A, Kulkarni S D. Screening of *in vitro* antibacterial activity of *Terminalia chebula*, *Eclapta alba* and *Ocimum sanctum* [J]. *Indian Journal of Medical Sciences*,

- 1989, **43**(5): 113-117.
- [45] Kannan P, Ramadevi S R, Hopper W. Antibacterial activity of *Terminalia chebula* fruit extract [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, **3**(4): 180-184.
- [46] Gupta M, Mazumder U K, Manikandan L, et al. Antibacterial activity of *Terminalia pallida* [J]. *Fitoterapia*, 2002, **73**(2): 165-167.
- [47] Sun Y G, Li Z Y, Qiang L, et al. In vitro antibacterial effect of 72 single Chinese herbal medicines against *Aeromonas veronii* isolated from snakehead (*Channa argus*) [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2024, **52**(8): 157-165. [孙云贵, 李泽昱, 强璐, 等. 72种单方中草药对乌鳢源维氏气单胞菌的体外抑菌效果 [J]. 江苏农业科学, 2024, **52**(8): 157-165.]
- [48] Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, et al. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori* [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001, **18**(1): 85-88.
- [49] Bai D Q, Xing K Z, Chen C X, et al. Preliminary study on the feeding attraction effect of Chinese herbal medicines on *Litopenaeus vannamei* [J]. *China Science and Technology Achievements*, 2009, **10**(14): 22-23. [白东清, 邢克智, 陈成勋, 等. 中草药对凡纳滨对虾诱食效果的初步研究 [J]. 中国科技成果, 2009, **10**(14): 22-23.]
- [50] Zhou K, Jian P, Liang W Y, et al. Chemical composition analysis of Tibetan medicine *Terminalia chebula* and *Terminalia bellirica* by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2020, **41**(3): 254-267. [周坤, 简平, 梁文仪, 等. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS分析藏药诃子与毛诃子化学成分 [J]. 质谱学报, 2020, **41**(3): 254-267.]
- [51] Pfundstein B, El Desouky S K, Hull W E, et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities [J]. *Phytochemistry*, 2010, **71**(10): 1132-1148.
- [52] Sánchez E, Heredia N, Camacho-Corona M D R, et al. Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, **115**(6): 1307-1316.
- [53] Liang H, Huang Q, Zou L, et al. Methyl gallate: Review of pharmacological activity [J]. *Pharmacological Research*, 2023(194): 106849.
- [54] Huang Z L. In vitro antibacterial test of traditional Chinese medicines against *Aeromonas hydrophila* from carp [J]. *Heilongjiang Fisheries*, 2023, **42**(6): 437-440. [黄章连. 中药对鲤源嗜水气单胞菌的体外抑菌试验 [J]. 黑龙江水产, 2023, **42**(6): 437-440.]
- [55] Su M Z, Li C J, Ouyang X H, et al. In vitro antibacterial effects of 59 traditional Chinese medicines against pathogens in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2025, **52**(4): 98-109. [苏美珍, 李彩娟, 欧阳贤华, 等. 59种中药对大口黑鲈病原菌的体外抑菌作用 [J]. 广东农业科学, 2025, **52**(4): 98-109.]
- [56] Xie X P, Ding Y X, Liao C Y, et al. Antibacterial effects of 36 traditional Chinese medicine extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus warneri* in tilapia [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2022, **41**(6): 55-59. [谢星朋, 丁月霞, 廖翠怡, 等. 36种中药提取物对罗非鱼大肠杆菌和华纳葡萄球菌的抑菌效果研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2022, **41**(6): 55-59.]
- [57] Rathinamoorthy R, Thilagavathi G. *Terminalia chebula*-review on pharmacological and biochemical studies [J]. *International Journal of PharmTech Research*, 2014, **6**(1): 97-116.
- [58] Chattopadhyay R R, Bhattacharyya S K. PHCOG REV: plant review. *Terminalia chebula*: An update [J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2007, **1**(1): 151-156.
- [59] Yu L, Beta T. Identification and antioxidant properties of phenolic compounds during production of bread from purple wheat grains [J]. *Molecules*, 2015, **20**(9): 15525-15549.
- [60] Fahrioglu U, Dodurga Y, Elmas L, et al. Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells *in vitro* [J]. *Gene*, 2016, **576**(1 Pt 3): 476-482.
- [61] Liu N N. Effects of *Aeromonas hydrophila* and its combination with fipronil on oxidative stress, immunity, autophagy, and apoptosis in carp [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2020. [刘娜娜. 嗜水气单胞菌及其联合氟虫腈对鲤的氧化应激、免疫、自噬和凋亡的影响 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2020: 25-27.]
- [62] Jiao J B, Huang L, Lin F, et al. Identification and antibiotic susceptibility test of hypervirulent *Aeromonas hydrophila* in a recirculating aquaculture system [J]. *Journal of Hydroecology*, 2023, **44**(3): 136-143. [焦锦彪, 黄雷, 林锋, 等. 循环水养殖系统中高毒力嗜水气单胞菌的鉴定与药敏试验 [J]. 水生态学杂志, 2023, **44**(3): 136-143.]
- [63] Chang C L, Lin C S. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* retzius extracts [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(2012): 125247.
- [64] Naik G H, Priyadarsini K I, Naik D B, et al. Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector [J]. *Phytomedicine*, 2004, **11**(6): 530-538.
- [65] Hsieh T J, Liu T Z, Chia Y C, et al. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, **42**(5): 843-850.

- [66] Rahman N, Jeon M, Kim Y S. Methyl gallate, a potent antioxidant inhibits mouse and human adipocyte differentiation and oxidative stress in adipocytes through impairment of mitotic clonal expansion [J]. *BioFactors*, 2016, **42**(6): 716-726.
- [67] Correa L B, Almeida Pádua T, Seito L N, *et al.* Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophages [J]. *Journal of Natural Products*, 2016, **79**(6): 1554-1566.
- [68] Zhou P, Lai J, Li Y, *et al.* Methyl gallate alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(22): 14024.
- [69] Lee W J, Kim M J, Choi H W, *et al.* Effect of methyl gallate on 1-nitropyrene-induced keratinocyte toxicity in a human and canine skin model [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, **32**(7): 869-876.
- [70] Feng X H, Xu H Y, Wang J Y, *et al.* *In vivo* hepatoprotective activity and the underlying mechanism of chebulinic acid from *Terminalia chebula* fruit [J]. *Phytomedicine*, 2021(83): 153479.
- [71] Wang C H, Safwan S, Cheng M C, *et al.* Protective evaluation of compounds extracted from root of *Rhodiola rosea* L. against methylglyoxal-induced toxicity in a neuronal cell line [J]. *Molecules*, 2020, **25**(12): 2801.
- [72] Kamatham S, Kumar N, Gudipalli P. Isolation and characterization of Gallic acid and methyl gallate from the seed Coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. *Toxicology Reports*, 2015(2): 520-529.
- [73] Tiwari M, Barooah M S. A comprehensive review on the ethno-medicinal and pharmacological properties of *Terminalia chebula* fruit [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2024, **23**(1): 125-145.

ANTIBACTERIAL AND PREVENTIVE EFFECTS OF *TERMINALIA CHEBULA* AND METHYL GALLATE AGAINST *AEROMONAS HYDROPHILA* ISOLATED FROM *ALOSA SAPIDISSIMA*

TANG Hai-Jun¹, ZHENG Yao^{1,2}, SUN Yi², XI Bing-Wen^{1,2}, CHEN Kai² and XU Gang-Chun^{1,2}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: To explore effective approaches for preventing and controlling *Aeromonas hydrophila* infection in *Alosa sapidissima*, the pathogenic strain YML1 was first isolated from diseased fish and confirmed as an *A. hydrophila* resistant to β -lactam and tetracycline antibiotics. Antimicrobial susceptibility tests revealed that the water extract of *Terminalia chebula* and methyl gallate produced inhibition zone diameters of (21.00 $\pm$ 0.75) and (24.00 $\pm$ 1.50) mm, respectively, indicating high sensitivity. The minimum inhibitory concentration (MIC) were 5.00 mg/mL for *T. chebula* and 0.16 mg/mL for methyl gallate, while the minimum bactericidal concentration (MBC) was 40.00 mg/mL and 5.00 mg/mL respectively, demonstrating favorable in vitro antibacterial activity. Further investigation was conducted on the effects of dietary supplementation with *T. chebula* and methyl gallate on immune and antioxidant functions of *A. sapidissima* following challenge with *A. hydrophila*. The results showed that both treatments significantly improved survival rate, with *T. chebula* exhibiting more pronounced effects. Methyl gallate demonstrated potential as an immunostimulant, synergistically upregulating immune-related genes (*lyz*, *tap2a*, *psmb9a*) and antioxidant genes (*gss*, *nrfl*, *cat*), while simultaneously activating the complement system (C3, C4), lysozyme (LZM), and antioxidant enzyme activities (SOD, GSH-Px), thereby establishing a multi-level defense network. *T. chebula* enhanced basal immunity and pathogen recognition capacity of *A. sapidissima* through a multi-pathway, progressive mode by concurrently upregulating antioxidant genes (*gss*, *cat*), innate immune genes (*lyz*, *tlr3*), and antigen processing genes (*tap2a*), and significantly boosting their corresponding enzyme activities (T-SOD, GSH-Px, LZM, C3, C4). This approach effectively established robust defenses while avoiding excessive stress. In conclusion, both *T. chebula* and methyl gallate can effectively alleviate the stress and damage caused by *A. hydrophila* infection by modulating the immune-biochemical indicators and related gene expression in *A. sapidissima*, showing promise as potential feedadditives for bacterial disease prevention in this species.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; *Terminalia chebula*; Methyl gallate; Immune regulation; Antioxidant; *Alosa sapidissima*