

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240312002

http://www.yykxjz.cn/

王春元, 王印庚, 赵伟志, 于永翔, 张正, 荣小军, 刘定远. 没食子酸对溶藻弧菌的抑菌活性及机理研究. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 212–221

WANG C Y, WANG Y G, ZHAO W Z, YU Y X, ZHANG Z, RONG X J, LIU D Y. Gallic acid bacteriostatic activity and mechanism against *Vibrio alginolyticus*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 212–221

没食子酸对溶藻弧菌的抑菌活性及机理研究*

王春元^{1,2} 王印庚^{1,2①} 赵伟志^{1,2} 于永翔^{1,2}
张 正^{1,2} 荣小军^{1,2} 刘定远^{1,2}

(1. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237)

摘要 研究没食子酸对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的抑菌活性和机理。通过测定没食子酸对溶藻弧菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)和生长曲线, 研究没食子酸对溶藻弧菌的抑菌活性; 测定不同浓度的没食子酸溶液与溶藻弧菌作用前后, 菌液上清液中碱性磷酸酶(AKP)活性、电导率, 溶藻弧菌生物被膜、运动性和聚集能力的变化, 研究没食子酸对溶藻弧菌的抗菌机理。结果显示, 没食子酸对溶藻弧菌的 MIC 和 MBC 分别为 4 mg/mL 和 8 mg/mL。没食子酸能破坏溶藻弧菌的细胞壁, 增加其细胞膜通透性, 抑制生物被膜的形成, 清除成熟的生物被膜, 抑制溶藻弧菌的运动和聚集能力。本研究为探明没食子酸抑制溶藻弧菌的作用机理奠定了良好的基础, 为其防治水生动物溶藻弧菌感染性疾病提供了理论依据。

关键词 没食子酸; 溶藻弧菌; 抑菌机理; 细胞壁; 生物膜

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)03-0212-10

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为弧菌科(Vibrionaceae)、弧菌属(*Vibrio*)的无芽孢、无荚膜的嗜盐、嗜温厌氧性革兰氏阴性细菌, 广泛分布于海水、入海口和水产养殖环境中, 对多种水产动物和人有致病性(Ahmed *et al*, 2016)。近几年, 溶藻弧菌是引起水产动物育苗期和养成期死亡的主要病原之一(Zhang *et al*, 2023), 溶藻弧菌感染鱼类可导致出血、溃疡或败血症(赖迎迢等, 2014), 感染虾类可致虾苗细菌性玻化症(bacterial vitrified syndrome, BVS) (王印庚等, 2021)或对虾急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease)(陈蒙蒙等, 2018)、黑鳃烂鳃(Vera *et al*, 1992)或白便综合征(Sandaruwan Kumara *et al*, 2017),

感染螃蟹(*Portunus tritubercularus*)可致“牛奶病”(黄增荣, 2006)或牙膏病(陈萍等, 2009), 感染海参(*Apostichopus japonicus*)可致腐皮综合征(skin ulcerative syndrome, SUS)(张文泽等, 2015)。此外, 溶藻弧菌感染还能引起贝类发病(Yang *et al*, 2021; 郑玉东等, 2024), 给海水养殖业造成巨大的经济损失。因此, 开发绿色高效的抗弧菌病药物已成为当前海水养殖动物疾病防治研究的热点之一。

本课题组曾以分离自患有细菌性玻化症虾苗的溶藻弧菌和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)为研究对象, 开展了 50 味中药的抗菌活性研究, 结果显示, 诃子(*Chebulae fructus*)、五倍子(*Galla chinensis*)、

* 国家重点研发计划(2023YFD2400703)、青岛市海洋科技创新专项(22-3-3-hygg-3-hy)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2023TD29)共同资助。王春元, Email: wangcy@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 王印庚, 研究员, Email: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-03-12, 收修改稿日期: 2024-05-13

石榴皮(*Granati pericarpium*)、地榆(*Sanguisorbae radix*)等中药的抑菌效果相对较好,以诃子为主药的处方[诃子 30 g、五味子(*Schisandra chinensis*) 20 g、香附(*Cyperus rhizome*) 20 g]对溶藻弧菌人工感染虾苗致细菌性玻化症的治疗效果也较好(赵伟志等, 2024)。鞣质是诃子(阳小勇等, 2012; 杨武杰等, 2023)、五倍子(杨寒冰等, 2016)、石榴皮(邓永等, 2021)和地榆(刘海英, 2009)等中药中非常重要的多酚类活性成分,它是由没食子酸(或其聚合物)的葡萄糖(及其他多元醇)酯、黄烷醇及其衍生物的聚合物以及二者混合共同组成。已有报道证明,没食子酸(gallic acid, GA)具有较好的抗菌(Rangel-López *et al.*, 2022)、抗炎(Pandurangan *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2024)、抗氧化(王荣等, 2023)、保护肝脏(吕云龙等, 2022)和提高免疫功能(Choubey *et al.*, 2018)等多种药理作用,其可能成为一种潜在的防病保健兽药或饲料添加剂使用。

中药可通过抑制细菌生物膜的形成和发育、破坏细菌的细胞壁和细胞膜、影响菌体蛋白质和遗传物质核酸的合成、促进氧化应激的产生以及抑制毒力因子的表达等方面的作用来抑制或杀灭细菌。虽然没食子酸已被报道对多种细菌有良好的抗菌作用,但尚未报道其对溶藻弧菌的抗菌活性和可能的作用方式。本研究探讨没食子酸对溶藻弧菌的抗菌活性及其作用机制,为筛选和研发防治水产动物弧菌感染性疾病的药物提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验菌液的制备

溶藻弧菌:菌株实验室编号为 P4A,分离自患 BVS 对虾养殖场的凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)虾苗,保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖病原库。将冻存的溶藻弧菌复苏后,以 TSB 固体培养基活化纯培养,挑取单菌落接种于 TSB 培养基,于 28 ℃、180 r/min 恒温振荡过夜培养至对数生长期。

1.2 药液的制备

没食子酸:纯度 99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品。以 PBS 将没食子酸配制成 16 mg/mL 的药液,过滤除菌,并用 PBS 倍比稀释制成不同浓度的没食子酸溶液,4 ℃ 保存备用。

1.3 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定

采用二倍稀释法测定。取对数生长期的溶藻弧菌,用 TSB 培养基稀释至 1×10^6 CFU/mL。分别取 100 μ L

不同浓度的没食子酸溶液加入 96 孔板,并加入等量的 1×10^6 CFU/mL 菌液,再以菌液加等量 PBS 为阳性对照组,TSB 培养基加等量 PBS 为空白对照组。实验组和对照组分别加入氯化三苯四氮唑(TTC) 10 μ L,以检验细菌是否生长。每组设 3 个平行。将 96 孔板置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养,当阳性对照组变红时,记录没食子酸的抑菌效果,实验组变色孔的上一个孔所对应的浓度即为 MIC。从未变红的实验组各孔取样 100 μ L,分别涂布于 TSB 琼脂平板,28 ℃ 恒温培养箱培养 24 h,观察结果。琼脂平板上细菌菌落数少于 5 且药液浓度最低的,即为 MBC。

1.4 生长曲线测定

测定不同浓度没食子酸对溶藻弧菌生长的影响。按 1.3 中的方法配制菌液。取 1×10^6 CFU/mL 溶藻弧菌菌液 100 μ L,分别加入不同浓度的没食子酸溶液,使药物终浓度分别为 2MIC、1MIC、1/2MIC 和 1/4MIC。以菌液加等量 PBS 为阳性对照组,TSB 加等量 PBS 为空白对照组,每组设 3 个平行。在全自动微生物生长曲线测定仪中 28 ℃ 培养 24 h,每隔 2 h 在 600 nm 波长下测定各组吸光值。

1.5 碱性磷酸酶(AKP)活性测定

参考张凯睿等(2021)的方法测定不同浓度没食子酸溶液在不同时间对溶藻弧菌细胞壁的影响。取对数生长期的溶藻弧菌 5 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 重悬配制成 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液。实验组为在 10 mL 1×10^6 CFU/mL 溶藻弧菌菌液中分别加入 10 mL 不同浓度的没食子酸溶液,使药物终浓度分别为 2MIC、1MIC、1/2MIC、1/4MIC。以菌液加等量的 PBS 为阳性对照组。每组设 3 个平行。溶藻弧菌在 28 ℃、180 r/min 摇床振荡培养,分别在 0、2、4、6、8 h 时各组的每个平行取样 1 mL,在 4 ℃、6 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液备用,使用 AKP 试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司)测定上清液在 520 nm 波长下的吸光值,并按说明书计算各组 AKP 活性。

1.6 电导率测定

参考赵君微等(2023)的方法测定不同浓度没食子酸在 2 h 时对溶藻弧菌细胞膜的影响。各组处理方法参照 1.5。溶藻弧菌在 28 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 2 h,各组分别取样 9 mL,在 4 ℃、6 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液,用酶标仪在 450 nm 波长下测定菌体培养液的电导率。

1.7 生物被膜的形成

参考 Kang 等(2018)实验方法,采用结晶紫染色法测定不同浓度没食子酸对溶藻弧菌生物被膜形成的影响。菌液配制方法参照 1.3。分别取 100 μL 不同浓度的没食子酸溶液加入到 96 孔板中,并加入等量的 1×10^6 CFU/mL 菌液,使没食子酸溶液的终浓度分别为 2MIC、1MIC、1/2MIC、1/4MIC。以菌液加等量的 PBS 为阳性对照组。每组设 3 个平行。溶藻弧菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 后,将孔中液体吸出,并用无菌 PBS 冲洗去除浮游细菌,添加 200 μL 甲醇固定 15 min,加入 200 μL 0.5% 的结晶紫溶液,室温静置 20 min,吸出结晶紫溶液,无菌蒸馏水冲洗并风干。加入 200 μL 33% 的醋酸溶液溶解,静置 15 min 后,用酶标仪测定 595 nm 条件下的吸光值,以 33% 醋酸溶液为空白对照。

1.8 生物被膜的清除

参考李芬等(2020)采用结晶紫染色法测定不同浓度没食子酸溶液对成熟生物被膜清除的影响。菌液配制方法如 1.3。在 96 孔板各孔中分别加入 200 μL 1×10^6 CFU/mL 菌液。28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 后,将孔中液体吸出,并用无菌 PBS 轻柔冲洗 2 次,晾干后得到成熟生物被膜。在形成生物被膜的各孔中,分别各添加 200 μL 2MIC、1MIC、1/2MIC、1/4MIC 的没食子酸溶液作为实验组,添加 200 μL PBS 作为对照组。每组设 3 个平行。28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 后将孔中液体吸出,并用无菌 PBS 冲洗 2 次,200 μL 甲醇固定 15 min,加入 200 μL 0.5% 的结晶紫溶液,室温静置 20 min,吸出结晶紫溶液,无菌蒸馏水冲洗并风干。用 200 μL 33% 醋酸溶液溶解,15 min 后用酶标仪测定 595 nm 处的吸光值,以 33% 醋酸溶液为空白对照。

1.9 泳动能力测定

参考余生玲等(2022)测定不同浓度没食子酸对溶藻弧菌泳动能力的影响。按 1.3 中的方法配制菌液。配制含浓度为 2MIC、1MIC、1/2MIC、1/4MIC 没食子酸的 0.3% 琼脂 LB 半固体平板。含等量 PBS 的 0.3% 琼脂 LB 半固体平板作为对照组。取 2 μL 1×10^6 CFU/mL 的菌液接种于平板中心,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h 后,采用十字交叉法测定细菌运动直径大小。

1.10 聚集能力测定

参考唐玉霞(2015)的方法测定不同浓度没食子酸对溶藻弧菌的聚集能力的影响。按 1.3 中的方法配制菌液。实验组为取 10 mL 1×10^6 CFU/mL 溶藻弧菌

菌液,分别加入等量不同浓度的没食子酸溶液,使药物终浓度为 2MIC、1MIC、1/2MIC、1/4MIC。阳性对照组为在菌液中加入等量 PBS。每组设 3 个平行。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。待培养结束,在静止状态下,各管分别吸取 3 mL 菌液测定其在 600 nm 处的吸光度,再将各管剩余菌液振荡悬浮,测定其在 600 nm 处的吸光度。计算公式为:

$$\text{聚集能力} = \frac{\text{悬浮OD}_{600\text{ nm}} - \text{静止OD}_{600\text{ nm}}}{\text{悬浮OD}_{600\text{ nm}}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 没食子酸对溶藻弧菌的抑菌作用

采用二倍稀释法和平板计数法测定没食子酸对溶藻弧菌的抑菌效果。实验结果显示,没食子酸对溶藻弧菌的 MIC 和 MBC 分别为 4 mg/mL 和 8 mg/mL。不同浓度的没食子酸对溶藻弧菌生长的影响效果见图 1。2MIC 和 1MIC 的没食子酸能完全抑制溶藻弧菌生长,OD 值显著低于不加药物的阳性对照组。1/2MIC 的没食子酸能显著抑制溶藻弧菌生长,菌株在 8 h 左右达到平台期,平台期菌液浓度明显低于阳性对照组。1/4MIC 的没食子酸对溶藻弧菌生长无明显影响。综上所述,1/2MIC 以上浓度的没食子酸对溶藻弧菌生长有良好的抑制作用,且抑制效果随浓度增加逐渐增强。

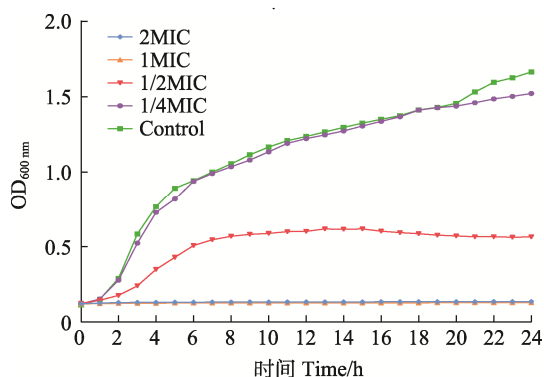


图 1 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌生长的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of gallic acid on the growth of *V. alginolyticus*

2.2 没食子酸对溶藻弧菌细胞壁完整性的影响

细胞壁是细菌维持形态、保护菌体的重要结构。AKP 位于细胞壁和细胞膜之间,在细胞壁未受损时,胞外无法检测到 AKP,当细胞壁被破坏受损时,AKP 从细胞中漏出(Cao et al, 2019),AKP 可以作为评价细胞壁通透性的指标。不同浓度没食子酸对溶藻弧菌细胞壁的影响见图 2。结果显示,1/4MIC、1/2MIC、1MIC

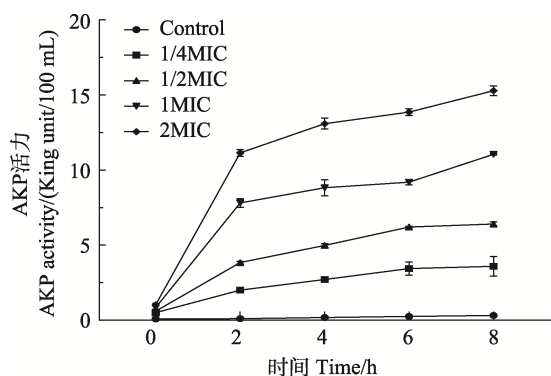


图2 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌细胞壁的影响
Fig.2 Effect of different concentrations of gallic acid on the cell wall of *V. alginolyticus*

和2MIC处理组的细菌培养液中AKP含量前2 h迅速上升,之后呈逐渐稳定上升的趋势。结果表明,1、2、4、8 mg/mL浓度的没食子酸在2 h内均能破坏溶藻弧菌细胞壁或增加细胞壁的通透性,导致AKP渗出。没食子酸溶液浓度越高、作用时间越长,对溶藻弧菌细胞壁的破坏程度越大。与处理组相比,阳性对照组的AKP含量始终处于较低水平,且无明显变化。其在4~8 h的含量上升,推测可能是细菌正常生命活动过程中的裂解死亡所致。

2.3 没食子酸对溶藻弧菌电导率的影响

细胞膜是细菌强有力的保护屏障,而细胞膜的导电性是细胞膜通透性的重要指标,当细菌细胞膜完整性被破坏,渗透性增加,细胞中的 Na^+ 、 K^+ 泄漏,导致上清液的电导率变大。不同浓度的没食子酸对溶藻弧菌电导率影响结果见图3。结果显示,1/2MIC、1MIC和2MIC处理组的细菌培养液在2 h时, $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 显

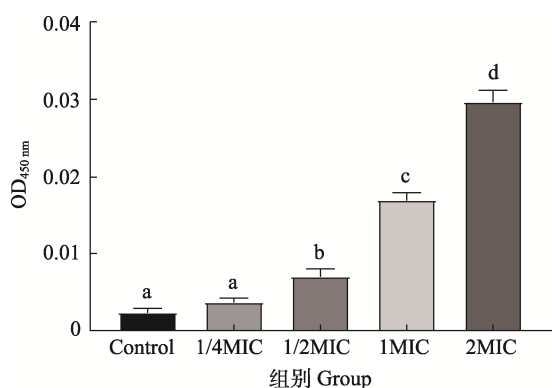


图3 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌细胞膜的影响
Fig.3 Effect of different concentrations of gallic acid on the cell membrane of *V. alginolyticus*

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below.

著高于对照组($P < 0.05$);1/4MIC处理组的细菌培养液在2 h时, $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 与对照组无显著差异($P > 0.05$)。1/2MIC以上浓度的没食子酸可显著增强溶藻弧菌细胞膜的通透性,且其作用强度随没食子酸浓度增加而增强。

2.4 没食子酸对溶藻弧菌生物被膜形成的影响

生物膜是细菌重要的生存策略,具有抵抗外界环境压力、提供营养支持、促进表面粘附和传导信号等作用(Wang et al, 2023)。不同浓度没食子酸对溶藻弧菌生物被膜形成的影响如图4所示。与阳性对照组相比,1/4MIC、1/2MIC、1MIC和2MIC浓度没食子酸对溶藻弧菌生物被膜的形成均有显著抑制作用($P < 0.05$),抑制率分别为16.61%、32.37%、77.80%和83.26%。结果表明,没食子酸能有效抑制溶藻弧菌生物被膜的形成,抑制作用随其浓度的增加而增强。

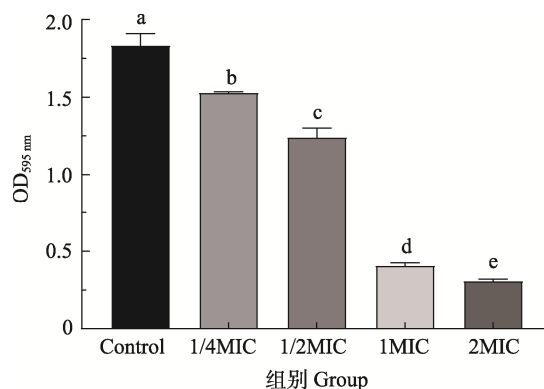


图4 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌生物被膜形成的影响
Fig.4 Effect of different concentrations of gallic acid on biofilm formation of *V. alginolyticus*

2.5 没食子酸对溶藻弧菌生物被膜的清除作用

不同浓度没食子酸对溶藻弧菌成熟生物被膜清除的影响如图5所示。与对照组相比,1/2MIC、1MIC和2MIC的没食子酸溶液能显著清除成熟的溶藻弧菌

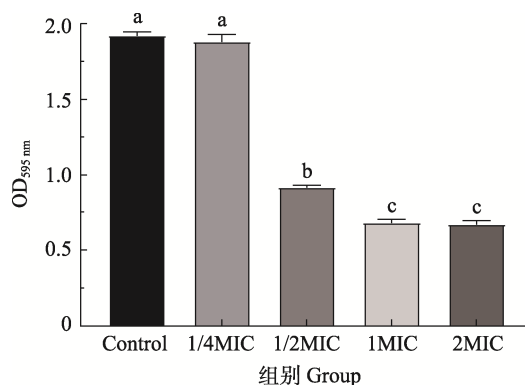


图5 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌生物被膜的清除效果
Fig.5 Effect of different concentrations of gallic acid on the biofilm removal of *V. alginolyticus*

生物被膜($P<0.05$),清除率分别为 54.5%、67.54%和 68.01%。结果表明,1/2MIC 以上浓度的没食子酸对溶藻弧菌成熟的生物被膜清除作用明显,且清除作用随其浓度的增加而增强。

2.6 没食子酸对溶藻弧菌泳动能力的影响

没食子酸对溶藻弧菌泳动的影响如图 6、7 所示。1/2MIC 和 1/4MIC 浓度的没食子酸对溶藻弧菌泳动能力有显著的抑制作用($P<0.05$),较对照组分别减少 60.41%($P<0.05$)和 51.78%($P<0.05$),2MIC 和 1MIC 浓度的没食子酸能完全抑制溶藻弧菌的生长,平板上未见细菌生长。结果表明,1/4MIC 以上浓度的没食子酸能显著抑制溶藻弧菌的泳动能力,且抑制作用随浓度的增加而增强。

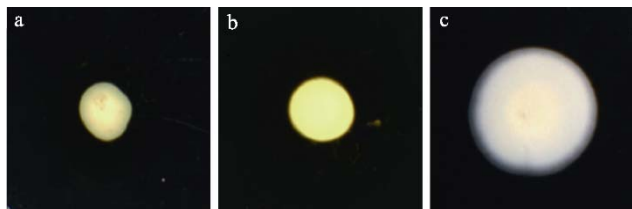


图 6 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌泳动圈的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of gallic acid on the swimming circle of *V. alginolyticus*

a: 1/2MIC; b: 1/4MIC; c: 未添加。
a: 1/2MIC; b: 1/4MIC; c: No addition.

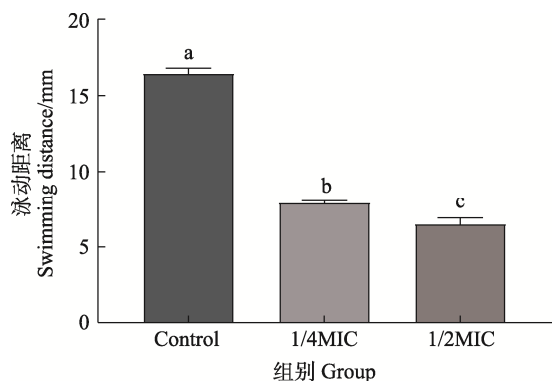


图 7 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌泳动能力的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of gallic acid on the swimming ability of *V. alginolyticus*

2.7 没食子酸对溶藻弧菌聚集能力的影响

不同浓度没食子酸对溶藻弧菌聚集能力的影响如图 8 所示。阳性对照组细菌间的聚集能力为 44.08%,1/4MIC、1/2MIC、1MIC 和 2MIC 浓度的没食子酸能显著降低溶藻弧菌的聚集能力,聚集能力分别被降至 37.41%、25.70%、19.19%和 18.68%,与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

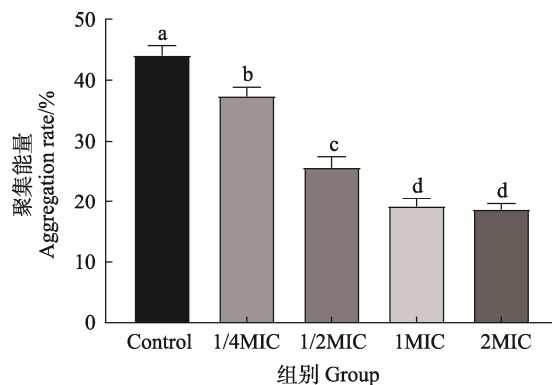


图 8 不同浓度没食子酸对溶藻弧菌聚集能力的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of gallic acid on the aggregation capacity of *V. alginolyticus*

3 讨论

随着生活水平的提高,人们对于食品安全的关注度越来越高,2021 年 1 月农业农村部印发了《关于加强水产养殖用投入品监管的通知》,其中指出开展水产养殖用兽药、饲料和饲料添加剂相关违法行为三年专项整治,在全国试行水产养殖用投入品使用白名单制度。但目前合规的水产动物疾病防治药物较少,加之养殖模式和病原区系特征的不断变化,寻找绿色高效的防治药物成为当前水产病害防治的研究热点之一。

没食子酸作为一种多酚类化合物,广泛存在于植物中,也可通过生物或化学合成方式大量获得,具有较好的抗菌活性。郑曙明等(2010)研究证实,没食子酸对迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)和豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)等 4 种水产动物致病菌的抑菌圈直径可达 25~30 mm。徐臻(2023)研究结果显示,没食子酸对副溶血弧菌的 MIC 为 3 mg/mL。本研究结果显示,没食子酸对溶藻弧菌的 MIC 和 MBC 分别为 4 mg/mL 和 8 mg/mL, MBC/MIC 为 2,说明没食子酸对溶藻弧菌具有良好的杀菌作用(O'Neill *et al*, 2004);生长曲线测定结果表明,4 mg/mL 以上浓度的没食子酸能完全抑制溶藻弧菌生长,2 mg/mL 的没食子酸明显抑制溶藻弧菌的快速生长,生长平台期菌液浓度明显低于阳性对照组,提高没食子酸药物浓度可缩短药物的抑菌作用时间,说明没食子酸对溶藻弧菌的抑制效果呈剂量依赖性,因此,选用没食子酸抑制溶藻弧菌生长时,应选用 4 mg/mL 及以上浓度方能达到良好的抑菌作用。

当细菌的细胞壁和细胞膜遭到破坏时,细胞膜通透性增高,细胞内容物流出,细菌胞外的 AKP 活性和电导率会显著升高。张雅丽等(2013)研究发现,没食子酸能使高敏感菌单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)出现凹陷、破损、细胞原生质泄漏。地榆提取物能破坏多重耐药大肠埃希氏菌(multidrug-resistant *Escherichia coli*)的细胞壁,显著提高胞外的 AKP 含量(张凯睿等, 2021)。本研究中 1、2、4、8 mg/mL 浓度的没食子酸能在 2 h 内破坏溶藻弧菌的细胞壁,导致 AKP 漏出;没食子酸能使溶藻弧菌培养物的电导率增加,说明没食子酸也可破坏溶藻弧菌细胞膜的完整性,导致通透性增加,且破坏程度呈剂量依赖性。

生物被膜是由细菌分泌的胞外多聚物(EPS)组成,如蛋白质、胞外多糖、脂质和细胞外 DNA(周文渊等, 2014),生物被膜有利于微生物黏附,能提高细菌对外界不良环境的抵抗能力,同时增加细菌对抗菌药物的抗性。多项研究指出,细菌的运动性和聚集能力在细菌早期粘附、生物被膜形成和细菌定殖过程中发挥着重要作用(Harshey, 2003; Zhu *et al*, 2013),细菌通过运动相互聚集,借助 EPS 粘附更多的游离菌,从而更加有利于生物被膜的形成,同时细菌间的聚集可促进其粘附,使生物被膜结构更加坚固。研究发现,多酚类物质能通过破坏细胞壁和细胞膜、减少生物被膜形成(Vazquez-Armenta *et al*, 2023)、干扰细菌运动(McCall *et al*, 2013)和聚集能力等发挥对细菌的抑制效果。没食子酸可诱导大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的生物被膜特性发生不可逆变化(Li *et al*, 2019)。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和肉桂醛衍生物能抑制副溶血弧菌的运动能力和生物被膜形成(Faleye *et al*, 2021; Wang *et al*, 2022)。虾壳壳聚糖-表没食子儿茶素没食子酸酯共聚物(COS-EGCG) 0.256 mg/mL 能显著抑制单增李斯特菌的泳动和群集(Buatong *et al*, 2023)。本研究中,1 mg/mL 和 2 mg/mL 的没食子酸能显著抑制溶藻弧菌的运动性,降低溶藻弧菌的聚集能力,且没食子酸溶液浓度越高,溶藻弧菌的运动性和聚集能力越低;同时,没食子酸能高效抑制生物被膜的形成,4 mg/mL 和 8 mg/mL 浓度的没食子酸对溶藻弧菌生物被膜的形成的抑制率可达 77.80%和 83.26%,对成熟溶藻弧菌生物被膜的清除率分别为 67.54%和 68.01%,表明没食子酸可能通过抑制溶藻弧菌的运动和聚集能力来抑制生物被膜的形成。生物被膜消除后,细菌对抗菌药物的抵抗力将显著下降,当没食子酸与抗生素联用时,可增加后者在大肠埃希氏菌菌体内累积而表现

出抗生素增效剂作用(Tian *et al*, 2022)。没食子酸也可通过破坏细胞膜完整性和调控 *ica* 基因家族而发挥抗菌作用,这种独特的抗菌机制几乎不会诱导细菌耐药性的产生(Lu *et al*, 2016; Liu *et al*, 2017)。因此,没食子酸不仅可作为一种抗菌效果较好的药物添加剂使用,还可能作为一种抗菌增效剂联合抗生素进行疾病的治疗。

4 结论

没食子酸对溶藻弧菌的抑菌效果较好,可以通过破坏溶藻弧菌细胞壁,增加细胞膜通透性,抑制生物被膜的形成,清除成熟的生物被膜,通过抑制溶藻弧菌的运动和聚集能力抑制或杀灭溶藻弧菌,此研究结果将为水产动物弧菌感染性疾病的防治提供新的思路。

参 考 文 献

- AHMED R, RAFIQUZAMAN S M, HOSSAIN M T, *et al*. Species-specific detection of *Vibrio alginolyticus* in shellfish and shrimp by real-time PCR using the groEL gene. *Aquaculture International*, 2016, 24(1): 157-170
- BUATONG J, MITTAL A, MITTRAPARP-ARTHORN P, *et al*. Bactericidal action of shrimp shell chitooligosaccharide conjugated with epigallocatechin gallate (COS-EGCG) against *Listeria monocytogenes*. *Foods*, 2023, 12(3): 634
- CAO J R, FU H J, GAO L H, *et al*. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiologica*, 2019, 64(6): 899-906
- CHEN M M, DONG X, QIU L, *et al*. Quantitative analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease causing *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) in infected *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 93-100 [陈蒙蒙, 董宣, 邱亮, 等. 凡纳滨对虾感染致急性肝胰腺坏死病副溶血弧菌(Vp_{AHPND})的定量分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 93-100]
- CHEN P, WANG Q Y, LI J, *et al*. Effects on lysozyme and phosphatase activities of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(2): 78-82 [陈萍, 王清印, 李健, 等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2009, 30(2): 78-82]
- CHOUBEY S, GOYAL S, VARUGHESE L R, *et al*. Probing Gallic acid for its broad spectrum applications. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2018, 18(15): 1283-1293
- DENG Y, LIU D H. Effects of ultrasound treatment on extraction of pomegranate peel polyphenols. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(1): 65-69, 77 [邓永, 刘东红. 超声处理对石榴皮多酚提取效果的影

- 响. 食品科学技术学报, 2021, 39(1): 65–69, 77]
- FALEYE O S, SATHIYAMOORTHY E, LEE J H, *et al.* Inhibitory effects of cinnamaldehyde derivatives on biofilm formation and virulence factors in *Vibrio* species. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12): 2176
- HARSHEY R M. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 249–273
- HUANG Z R. Identification the bacterial pathogen of the milk disease of cultured swimming crab *Portunus tritubercularus* (Portunidae) and study on the histopathology. Master's Thesis of Northwest A & F University, 2006 [黄增荣. 三疣梭子蟹(*Portunus tritubercularus*)“牛奶病”病原的鉴定及其组织病理学研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2006]
- KANG J M, LI Q Q, LIU L, *et al.* The specific effect of Gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating *pgaABCD* genes expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(4): 1837–1846
- LAI Y T, TAO J F, SUN C W, *et al.* Biological characteristics and histopathological observation of *Vibrio alginolyticus* from diseased fish. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(11): 1378–1384 [赖迎迢, 陶家发, 孙承文, 等. 鱼源溶藻弧菌生物学特性和病理组织学观察. 微生物学报, 2014, 54(11): 1378–1384]
- LI F, FAN Y T, WANG L J, *et al.* Biofilm formation and antibiotics resistance of *Escherichia coli* isolated from milk. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2020, 29(7): 983–989 [李芬, 范玉堂, 王丽娟, 等. 牛乳源大肠杆菌生物被膜形成及抗生素的作用. 西北农业学报, 2020, 29(7): 983–989]
- LI K J, GUAN G L, ZHU J X, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan–Gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 2019, 96: 234–243
- LIU H Y. Component analysis and functional study of polyphenols from radix *Sanguisorbae*. Doctoral Dissertation of Shaanxi Normal University, 2009 [刘海英. 地榆多酚的组分分析及功能研究. 陕西师范大学博士研究生学位论文, 2009]
- LIU M H, WU X X, LI J K, *et al.* The specific anti-biofilm effect of Gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *Ica* operon. *Food Control*, 2017, 73: 613–618
- LU J, WANG Z N, REN M R, *et al.* Antibacterial effect of Gallic acid against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* through damaging membrane integrity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2016, 17(13): 1153–1158
- LÜ Y L, YIN Q, LUO Y Y, *et al.* Protective effects and mechanisms of quercetin and Gallic acid from active constituents of *Penthorum* on acute liver injury induced by CCl_4 in mice. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*, 2022, 32(4): 352–356 [吕云龙, 殷强, 罗沿源, 等. 赶黄草活性成分槲皮素和没食子酸对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(4): 352–356]
- MCCALL J, HIDALGO G, ASADISHAD B, *et al.* Cranberry impairs selected behaviors essential for virulence in *Proteus mirabilis* HI4320. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(6): 430–436
- O'NEILL A J, CHOPRA I. Preclinical evaluation of novel antibacterial agents by microbiological and molecular techniques. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2004, 13(8): 1045–1063
- PANDURANGAN A K, MOHEBALI N, NORHAIZAN M E, *et al.* Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 9: 3923–3934
- RANGEL-LÓPEZ L, RIVERO-PEREZ N, VALLADARES-CARRANZA B, *et al.* Antibacterial potential of *Caesalpinia coriaria* (jacq) willd fruit against *Aeromonas* spp. of aquaculture importance. *Animals*, 2022, 12(4): 511
- SANDARUWAN KUMARA K R P, HETTIARACHCHI M. White faeces syndrome caused by *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio fluvialis* in shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798)-multimodal strategy to control the syndrome in Sri Lankan grow-out ponds. *Asian Fisheries Science*, 2017, 30(4): 245–261
- TANG Y X. The active compounds and inhibition mechanism of burdock leaf against foodborne pathogen biofilm. Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 [唐玉霞. 牛蒡叶组分抑制食源性致病菌生物膜的活性成分及机理研究. 江南大学硕士研究生学位论文, 2015]
- TIAN Q M, WEI S M, SU H R, *et al.* Bactericidal activity of Gallic acid against multi-drug resistance *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 173: 105824
- VAZQUEZ-ARMENTA F J, AROS-CORRALES M O, ALVAREZ-AINZA M L, *et al.* Antibacterial and anti-virulence potential of plant phenolic compounds against *Vibrio parahaemolyticus*. *F1000Research*, 2023, 12: 1256
- VERA P, NAVAS J I, QUINTERO M C. Experimental study of the virulence of three species of *Vibrio* bacteria in *Penaeus japonicus* (Bate 1881) juveniles. *Aquaculture*, 1992, 107(2/3): 119–123
- WANG H, ZOU H, WANG Y, *et al.* Inhibition effect of epigallocatechin gallate on the growth and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 75(1): 81–88
- WANG R, SONG C, CHEN Q Q, *et al.* Study on antioxidant effect of paeonol, chlorogenic acid and Gallic acid

- compound on aging model of mice induced by D-galactose. *Journal of Shaanxi University of Chinese Medicine*, 2023, 46(2): 95–99 [王荣, 宋闯, 陈庆庆, 等. 丹皮酚、绿原酸和没食子酸复配物对 D-半乳糖致小鼠衰老模型的抗氧化作用研究. *陕西中医药大学学报*, 2023, 46(2): 95–99]
- WANG S C, ZHAO Y T, BRESLAWEK A P, *et al.* Strategy to combat biofilms: A focus on biofilm dispersal enzymes. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2023, 9(1): 63
- WANG Y G, YU Y X, LIU X, *et al.* Pathogen and pathological analysis of bacterial vitrification (BVS) in *Litopenaeus vannamei* larvae. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(9): 1563–1573 [王印庚, 于永翔, 刘潇, 等. 凡纳滨对虾细菌性玻化症(BVS)的病原、病理分析. *水产学报*, 2021, 45(9): 1563–1573]
- XU Z. Study on synergistic inhibition of carvacrol essential oil and gallic acid on *Vibrio parahaemolyticus*. Master's Thesis of Bohai University, 2023 [徐臻. 香芹酚精油和没食子酸对副溶血性弧菌协同抑制的研究. 渤海大学硕士研究生学位论文, 2023]
- YANG B, ZHAI S Y, LI X, *et al.* Identification of *Vibrio alginolyticus* as a causative pathogen associated with mass summer mortality of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture*, 2021, 535: 736363
- YANG H B, YANG W Q, SONG M, *et al.* Phenolic constituents of *Galla chinensis* and their antiviral activities. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2016, 47(5): 566–569 [杨寒冰, 杨文强, 宋敏, 等. 五倍子中酚性化学成分及其抗病毒活性. *中国药科大学学报*, 2016, 47(5): 566–569]
- YANG W J, HAO J, JU C G, *et al.* Optimization of processing methods for *Terminalia chebula* based on fingerprint, antioxidant spectrum-effect correlation and multi-component contents. *China Pharmacy*, 2023, 34(19): 2371–2377 [杨武杰, 郝季, 鞠成国, 等. 基于指纹图谱、抗氧化谱效相关性及其多成分含量的诃子炮制方法优选. *中国药房*, 2023, 34(19): 2371–2377]
- YANG X Y, TANG R P. Studies on chemical components of chebulinic. *Journal of Xichang College (Natural Science)*, 2012, 26(2): 65–66 [阳小勇, 唐荣平. 诃子化学成分的研究. *西昌学院学报(自然科学版)*, 2012, 26(2): 65–66]
- YU S L, SHEN G H, HUANG T, *et al.* Inhibitory effect of *Zanthoxylum bungeanum* essential oil on the biofilm of *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a. *Microbiology China*, 2022, 49(6): 2135–2151 [余生玲, 申光辉, 黄廷, 等. 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制作用. *微生物学通报*, 2022, 49(6): 2135–2151]
- ZHANG K R, LIU Z Y, WANG L L, *et al.* Antibacterial activity and mechanism study of *Sanguisorba officinalis* L. extracts against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(10): 61–65 [张凯睿, 刘增援, 王利利, 等. 地榆提取物对多重耐药大肠埃希氏菌的抑菌活性及机制研究. *动物医学进展*, 2021, 42(10): 61–65]
- ZHANG W Z, WANG Y G, LIAO M J, *et al.* Isolation and identification of the pathogenic bacteria of skin ulcerative syndrome(SUS) from *Apostichopus japonicus* juveniles in summer and study on its pathogenic threshold. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 79–87 [张文泽, 王印庚, 廖梅杰, 等. 夏季保苗期刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合征病原菌的分离鉴定及其致病阈值. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 79–87]
- ZHANG X, HUANG B W, ZHENG Y D, *et al.* Identification and characterization of infectious pathogens associated with mass mortalities of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in northern China. *Biology*, 2023, 12(6): 759
- ZHANG Y L, LI J K, LIU L. Antimicrobial activities of Gallic acid *in vitro*. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(11): 81–84 [张雅丽, 李建科, 刘柳. 没食子酸的体外抑菌作用研究. *食品工业科技*, 2013, 34(11): 81–84]
- ZHAO J W, YANG S, YUAN J, *et al.* *In vitro* antibacterial effect and mechanism of *Terminalia chebula* extract on three pathogenic bacteria. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2023, 42(2): 63–70 [赵君微, 杨帅, 袁婧, 等. 诃子提取物对 3 种致病菌的体外抑菌效果及其机制研究. *华中农业大学学报*, 2023, 42(2): 63–70]
- ZHAO W Z, WANG Y G, YU Y X, *et al.* Chinese herbal compound screening and its pharmacodynamic efficacy evaluation against shrimp postlarva bacterial vitrified syndrome (BVS) induced by *Vibrio alginolyticus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 175–186 [赵伟志, 王印庚, 于永翔, 等. 基于溶藻弧菌感染的虾苗细菌性玻化症(BVS)及其防控中药筛选和药效学评价. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 175–186]
- ZHAO X Y, ZHANG L, WU N, *et al.* Gallic acid acts as an anti-inflammatory agent via PPAR γ -mediated immunomodulation and antioxidation in fish gut-liver axis. *Aquaculture*, 2024, 578: 740142
- ZHENG S M, HUANG J J, WU Q, *et al.* Studies on separation and antibacterial activity of the effective components of Chinese herbal compounds gallnut for fishery antimicrobial agent. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1): 57–64 [郑曙明, 黄建军, 吴青, 等. 复方五倍子有效成分的分离鉴定及抑菌活性研究. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 57–64]
- ZHENG Y D, ZHANG X, YAO M L, *et al.* Study on multi-locus sequence typing, virulence genes and drug resistance of *Vibrio alginolyticus* from shellfish and culture environment. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(1): 211–223 [郑玉东, 张翔, 姚梦丽, 等. 养殖环境及贝源溶藻弧菌 MLST 分型及其毒力基因、耐药性分析. *渔业科学进展*, 2024, 45(1): 211–223]
- ZHOU W Y, ZHANG H M, JIANG Y, *et al.* Inhibiting effect

of three nature products on biofilm formation. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(2): 171–176
[周文渊, 张宏梅, 姜燕, 等. 三种食品添加剂抑制菌体生物被膜形成. 食品与生物技术学报, 2014, 33(2):

171–176]

ZHU S W, KOJIMA S, HOMMA M. Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 410

(编辑 马瑾艳)

Gallic Acid Bacteriostatic Activity and Mechanism Against *Vibrio alginolyticus*

WANG Chunyuan^{1,2}, WANG Yingeng^{1,2①}, ZHAO Weizhi^{1,2}, YU Yongxiang^{1,2},
ZHANG Zheng^{1,2}, RONG Xiaojun^{1,2}, LIU Dingyuan^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China)

Abstract *Vibrio alginolyticus* is a primary etiological agent for aquatic animal death. *V. alginolyticus* can infect fish, causing bleeding, ulcer, and blood poisoning; shrimps, causing shrimp post-larvae bacterial vitrified syndrome, acute hepatopancreatic necrosis disease, rotted gill disease, and white fecal syndrome; crabs, causing milk and toothpaste diseases; sea cucumbers, causing skin ulcer syndrome; and shellfish, thereby leading to substantial economic loss in the marine aquaculture industry. Antibiotics, disinfectants, and microecologies are usually used in the aquaculture to prevent or cure such infectious diseases however, their outcomes remain unsatisfactory. In addition, irrational drug use increases risks, such as environmental pollution, bacterial drug resistance, and drug residue. Compared with antibiotics, traditional Chinese medicines (TCMs) present certain advantages, such as antibacterial properties, immunoregulation, slight toxic and side effect, and low drug resistance or residue. Therefore, TCMs have garnered increasing attention in recent years.

Using *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* isolated from penaeid shrimp larvae with bacterial vitrified syndrome as research objects, we screened the bacteriostatic activity of 50 TCMs. Four kinds of TCM, namely *Terminalia chebula*, *Galla chinensis*, pomegranate peel, and *Sanguisorba officinalis*, demonstrated good bacteriostatic effects. Gallic acid (GA) is a main active component of these four TCM compounds. GA has good antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, and antioxidative properties and can protect the liver and improve the immunological function of the body, thus it may be used to treat and prevent multiple animal diseases.

Although GA has antibacterial effects on various bacteria, the bacteriostatic activity and possible mechanism against *V. alginolyticus* remains unelucidated. By measuring the minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC), and growth curve of GA against *V. alginolyticus*, we evaluated the bacteriostatic activity of GA against *V. alginolyticus*. Moreover, the changes in the AKP activity and electrical conductivity of the supernatant fluid of bacteria solution and biofilms, moveability, and aggregation capacity of *V. alginolyticus* were determined before and after GA treatment to investigate the bacteriostatic mechanism of GA against *V. alginolyticus*.

The MIC and MBC of GA against *V. alginolyticus* were 4 mg/mL and 8 mg/mL, respectively. These two GA concentrations could completely inhibit *V. alginolyticus* growth, while 2 mg/mL GA significantly suppressed *V. alginolyticus* growth, suggesting that the inhibitory effect of GA on *V. alginolyticus* was

① Corresponding author: WANG Yingeng, Email: wangyg@ysfri.ac.cn

dose-dependent. Thus, GA concentrations greater than 4 mg/mL should be selected and used to achieve an effective bacteriostatic effect on *V. alginolyticus*.

The bacterial cell wall is an important structure that maintains cell morphology and facilitates cell protection. Biofilms comprise various extracellular materials, such as proteins, exopolysaccharides, lipids, and extracellular DNA. Biofilms not only enhance the resistance of bacteria to adverse external environment, but also increase their resistance to antibacterial agents. However, TCM can restrain bacterial biofilm formation and development, destroy their cell wall and membrane, affect protein and nucleic acid synthesis, promote oxidative stress, and inhibit virulent factor expression to ultimately suppress or kill bacteria. The changes in AKP and electrical conductivity of bacterial culture serve as an index to verify whether the bacterial cell wall was destroyed or whether its permeability increased. GA (1, 2, 4, and 8 mg/mL) destroyed the cell wall within 2 h and caused AKP leakage. Furthermore, the degree of *V. alginolyticus* cell wall destruction was positively correlated with GA concentrations; 2, 4, and 8 mg/mL GA could remarkably increase electrical conductivity of the supernatant fluid of *V. alginolyticus*; compared with the positive control group, 4 and 8 mg/mL GA had a significant inhibitory effect on the formation of the biofilms of *V. alginolyticus*, with an inhibition ratio of 83.26% ($P<0.05$) and 77.80% ($P<0.05$), respectively. Meanwhile, 4 and 8 mg/mL GA notably eliminated mature biofilms, with an elimination ratio of 68.01% ($P<0.05$) and 67.54% ($P<0.05$), respectively; 4 and 8 mg/mL GA completely suppressed *V. alginolyticus* growth on LB swimming motility agar plates; and 1, 2, 4, and 8 mg/mL GA significantly inhibited *V. alginolyticus* aggregation capacity, with aggregation rates reduced to 18.68% ($P<0.05$), 19.19% ($P<0.05$), 25.70% ($P<0.05$), and 37.41% ($P<0.05$), respectively.

In conclusion, GA has a strong inhibitory effect on *V. alginolyticus* by growth restraint, cell wall destruction, cell membrane permeability increase, biofilm formation suppression, mature biofilm elimination, and moveability and aggregation inhibition. This study presents a foundation for exploring the action mechanism of GA in suppressing *V. alginolyticus* growth and provides a theoretical basis for GA in preventing and curing infectious diseases caused by *V. alginolyticus* in aquatic animals.

Key words Gallic acid; *Vibrio alginolyticus*; Bacteriostatic mechanism; Cell wall; Biofilms