

# 猴耳环水提物对水产病原菌的抑菌活性及其机制

吴文豪<sup>1</sup>, 郭梓泓<sup>1</sup>, 张家豪<sup>1</sup>, 孙龔鑫<sup>2</sup>, 唐姝<sup>3</sup>, 刘春<sup>1</sup>, 李薇<sup>1</sup>, 江飏<sup>1\*</sup>, 苏友禄<sup>1\*</sup>

1 仲恺农业工程学院 动物科技学院, 健康养殖创新研究院, 广东 广州 510225

2 佛山市西江生物科技有限公司, 广东 佛山 528220

3 广东省动物疫病预防控制中心, 广东 广州 510220

吴文豪, 郭梓泓, 张家豪, 孙龔鑫, 唐姝, 刘春, 李薇, 江飏, 苏友禄. 猴耳环水提物对水产病原菌的抑菌活性及其机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3853-3868.

WU Wenhao, GUO Zihong, ZHANG Jiahao, SUN Yanxin, TANG Shu, LIU Chun, LI Wei, JIANG Biao, SU Youlu. Inhibitory activity and mechanism of aqueous extract from *Pithecellobium clypearia* against aquatic pathogenic bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3853-3868.

**摘要:** 抗菌药物的过度使用导致细菌耐药性和水产品药物残留问题日益严重, 寻找抗菌药物替代品成为迫切需求。猴耳环作为一种具有抗菌和抗炎活性的中草药, 尚未在水产病害防控中得到充分研究。【目的】评估猴耳环水提物对水生动物病原菌的抑菌活性, 并探究其作用机制, 为水产抗菌药物开发提供新思路。【方法】采用微量肉汤法评估 107 株水生动物病原菌的耐药性, 分析猴耳环水提物的抑菌活性, 测定猴耳环水提物处理后的无乳链球菌和副溶血弧菌的胞外 K<sup>+</sup>含量及其超微结构变化。【结果】107 株病原菌对磺胺类药物的耐药率高达 67.29%, 46.73% 的病原菌表现出多重耐药性, 其中气单胞菌的耐药性最严重。猴耳环水提物在 12.50 mg/mL 浓度下对所有病原菌表现出抑制作用, 尤其对气单胞菌最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值低至 0.39 mg/mL, 并且对同一菌属不同耐药特征的菌株 MIC 值相近。与原始株相比, 水提物对人工诱导舒伯特气单胞菌恩诺沙星耐药株的抑菌效果更显著, 原始株和耐药株的 MIC 分别为 0.78 mg/mL 和 0.20 mg/mL。此外, 猴耳环水提物处理后细菌胞外 K<sup>+</sup>浓度显著增加, 细菌细胞膜结构受损, 提示猴耳环可能通过破坏菌膜结构来发挥其抑菌作用。【结论】本研究得出了猴耳环对水产病原菌具有一定的体外抑菌效果, 在防治水生动物细菌病方面具有进一步研究和开发的巨大潜力。

**关键词:** 病原菌; 耐药性; 猴耳环; 体外抑菌; 杀菌机制

资助项目: 2022 年中央成品油价格调整对渔业补助预算资金(粤财农[2022] 119 号); 广州市科技计划(2023E04J1235)  
This work was supported by the 2022 Central Refined Oil Price Adjustment Budget Fund for Fishery Subsidies (Yue Cai Nong [2022] No. 119) and the Guangzhou Science and Technology Program (2023E04J1235).

\*Corresponding authors. E-mail: JINANG Biao, jiangbiao@zhku.edu.cn; SU Youlu, youlusu@zhku.edu.cn

Received: 2024-04-09; Accepted: 2024-05-27; Published online: 2024-05-29

# Inhibitory activity and mechanism of aqueous extract from *Pithecellobium clypearia* against aquatic pathogenic bacteria

WU Wenhao<sup>1</sup>, GUO Zihong<sup>1</sup>, ZHANG Jiahao<sup>1</sup>, SUN Yanxin<sup>2</sup>, TANG Shu<sup>3</sup>, LIU Chun<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, JIANG Biao<sup>1\*</sup>, SU Youlu<sup>1\*</sup>

1 Innovative Institute of Animal Healthy Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, Guangdong, China

2 Foshan Xijiang Biotechnology Co., Ltd., Foshan 528220, Guangdong, China

3 Guangdong Animal Disease Prevention and Control Center, Guangzhou 510220, Guangdong, China

**Abstract:** The aquaculture industry has rapidly expanded in recent years in China, whereas it faces the challenge brought by bacterial diseases. Antibacterial agents have been the primary tools to combat these diseases. However, prolonged and haphazard usage of antibacterial agents in aquaculture has exacerbated antimicrobial resistance and led to severe antimicrobial residues. Considering these challenges, scholars worldwide have been exploring natural alternatives, such as Chinese herbal medicines. Among them, *Pithecellobium clypearia* stands out due to its antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory properties, coupled with its safety and lack of antimicrobial resistance. Nonetheless, the potential of *P. clypearia* in the prevention and control of aquatic diseases remains underexplored. **[Objective]** This study evaluated the *in vitro* inhibitory activity of *P. clypearia* aqueous extract against aquatic pathogenic bacteria, including an artificially induced antimicrobial-resistant strain. Additionally, we investigated changes in bacterial cell membrane permeability and observed cellular alterations by transmission electron microscopy to elucidate the mechanism of the extract. Our findings are expected to pave the way for developing *P. clypearia* as an environmentally friendly antibacterial agent, reducing antibacterial agent dependency, and mitigating pathogen resistance in aquaculture. **[Methods]** We employed the microbroth method to assess the antimicrobial resistance of 107 pathogen strains attacking aquatic animals and analyzed the inhibitory activity of *P. clypearia* aqueous extract against aquatic pathogenic bacteria, including an artificially induced antimicrobial-resistant bacterial strain. Furthermore, we determined the extracellular K<sup>+</sup> content and ultrastructural changes in *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus* after treatment with the extract. **[Results]** The resistance rate of 107 pathogen strains to sulfonamides was as high as 67.29%, and 46.73% of the strains showed multidrug resistance, among which *Aeromonas* sp. showed the most severe resistance. The aqueous extract (12.50 mg/mL) of *P. clypearia* exerted inhibitory effects on all the pathogenic bacteria, especially on *Aeromonas* sp. with the minimum inhibitory concentration (MIC) as low as 0.39 mg/mL. The MICs of the extract were similar for the strains belonging to the same genus but with different antimicrobial resistance characteristics.

The aqueous extract of *P. clypearia* showed stronger inhibitory effect on the artificially induced enrofloxacin-resistant strain of *A. schubertii* than on the original strain, with the MICs of 0.78 mg/mL on the original strain and 0.20 mg/mL on the resistant strain. In addition, the treatment with *P. clypearia* aqueous extract significantly increased the extracellular  $K^+$  concentration, leading to damage to the bacterial cell membrane structure, leakage of intracellular contents, and vacuolation of cytoplasm, which suggested that *P. clypearia* exerted the antibacterial effect by destroying the bacterial membrane structure. **[Conclusion]** *P. clypearia* exerts *in vitro* inhibitory effects on aquatic pathogenic bacteria and demonstrates great potential for further research and development in the prevention and treatment of bacterial diseases in aquatic animals. The antibacterial mechanism of *P. clypearia* appears to involve disrupting bacterial cell membranes. The application of *P. clypearia* in aquaculture promises to reduce antibiotic dependency and pathogen resistance, paving the way for a healthy and sustainable aquaculture industry.

**Keywords:** pathogenic bacterium; antimicrobial resistance; *Pithecellobium clypearia*; antibacterial activity *in vitro*; bactericidal mechanism

我国是水产养殖大国,水产养殖产量连续多年稳居世界第一<sup>[1]</sup>,2022年水产养殖产量为5 565.46万t,其中,广东省贡献显著,养殖产量占比13.79%,成为我国水产养殖的重要省份<sup>[2]</sup>。然而,随着水产养殖产业的快速发展,养殖户过度追求经济效益,导致养殖密度越来越高,进而引发水产养殖水质严重富营养化,这种环境变化为病原体繁殖提供了条件。病原体的大量繁殖和疾病发病率的上升,已成为制约水产养殖业可持续发展的主要因素之一<sup>[3-4]</sup>。根据《2023中国水生动物卫生状况报告》统计,仅2022年,水产养殖业因病害造成的经济损失高达517亿元人民币<sup>[5]</sup>。

细菌性病害是水产养殖业的一大挑战,不仅对水生动物的健康和生长构成威胁,还导致了严重的食品安全问题和巨大的经济损失。目前,抗菌药物仍是应对细菌性疾病的主要手段<sup>[6-10]</sup>,然而,由于抗菌药物在水产养殖中长期存在大量不规范的使用情况,这不仅加剧了细菌耐药性,还

引发了严重的药物残留问题<sup>[11]</sup>。细菌耐药性的不断增强使得水产养殖中的疾病治疗变得困难,病死率和治疗成本也随之攀升<sup>[12-13]</sup>。当面对病害时,养殖户只能不断加大抗菌药物剂量或多种抗菌药物联用,甚至违规使用非水产用抗菌药物。这种做法进一步加剧了细菌耐药性和食品安全问题。为了遏制抗菌药物滥用,国家相继出台了一系列政策措施,旨在规范和指导养殖户精准用药,减量用药。与此同时,科研人员也在探索针对细菌耐药性的新药研发策略,包括理解耐药机制和开发新的抗菌药物<sup>[14]</sup>。

面对细菌耐药性的挑战,国内外学者更加关注中草药这一天然资源<sup>[15-16]</sup>。大多数中草药都具有广谱抗菌等作用,对病原菌有一定的抑菌能力,我国中草药资源丰富,种类繁多,相关研究表明中草药中含有多种生物活性物质(如生物碱、有机酸、萜类、氨基酸、多糖和甙类等)。这些物质不仅具有抗病原菌作用,还能调节免疫等多种药理功效,而且不易引发病原菌产生耐药性<sup>[17]</sup>。

在农业农村部 2022 年颁布的水产养殖用药明白纸中<sup>[18]</sup>, 已有多种中药材和中成药在水产养殖中获批使用, 如大黄、三黄散和黄连解毒散等。在我国不断推进水产养殖绿色可持续高质量发展和减少养殖抗菌药物使用大环境下, 由于中草药的天然性和低耐药性风险, 在解决细菌耐药性问题方面展现了巨大的潜力和广阔的应用前景<sup>[19]</sup>。

猴耳环(*Pithecellobium clypearia*)是豆科常绿乔木, 主要分布在我国华南地区、缅甸、越南、马来西亚等<sup>[20-21]</sup>。据报道猴耳环叶、皮中富含没食子酸、槲皮素、黄酮等主要成分<sup>[22]</sup>, 具有抗病毒、抗炎活性, 因此在传统医学和现代临床实践中, 猴耳环常被作为治疗上呼吸道感染、咽炎、喉炎、急性扁桃体炎、急性胃肠炎和细菌性痢疾的处方药<sup>[23-24]</sup>。近年来的研究表明猴耳环对多种病原菌具有抑制作用, 覃旭<sup>[25]</sup>发现猴耳环提取物对柑橘溃疡病病原菌的菌落生长及其生长量均具有较强的抑制作用。李超<sup>[26]</sup>进一步研究发现, 猴耳环提取液对常见的金色葡萄球菌、大肠杆菌及沙门氏杆菌均有较强的抑杀作用。Liu 等<sup>[27]</sup>证实, 猴耳环提取物对鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌具有抑菌活性, 而且在与抗菌药物联用时存在协同作用。Liu 等<sup>[28]</sup>研究团队还发现, 猴耳环提取物可以抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*,

MRSA)的生长, 并降低临床分离株对抗菌药物的耐药性。尽管猴耳环在多个领域的应用已广受关注, 但在水产养殖中的研究尚未见报道, 因此, 探究猴耳环对水生动物病原菌的作用效果和机制, 对开发中草药防治水生动物疾病可提供重要参考数据。

本研究以猴耳环为研究对象, 研究猴耳环水提物对水产养殖中多种病原菌和人工诱导获得的耐药菌株的体外抑菌活性, 并通过细胞膜通透性变化和透射电镜进一步观察了猴耳环水提物对病原菌作用后的细菌细胞状态, 初步分析其作用机制。本研究结果以期猴耳环作为水产养殖绿色抗菌药物的开发提供新的参考, 以减少对抗菌药物的依赖和病原菌耐药性的发生, 使水产养殖业向更加健康、可持续发展的方向发展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株来源

实验所用的菌株为仲恺农业工程学院水产病害课题组和广东省动物疫病预防控制中心在 2023 年从广东省内水产养殖场分离所得, 共 107 株, 通过对其进行 16S rRNA 基因鉴定, 得到气单胞菌属 44 株, 链球菌属 34 株, 弧菌属 15 株, 爱德华氏菌属 7 株, 诺卡氏菌属 7 株, 保种于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱, 菌株详细信息见表 1。

表 1 病原菌来源情况表

Table 1 The origin of pathogenic bacteria

Genus	Region	Host	Number of bacterial (strains)
<i>Aeromonas</i> sp.	Foshan, Zhongshan, Zhaoqing	Hybrid snakehead, <i>Micropterus salmoides</i> , <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> , Grass carp, <i>Oxyeleotris marmorata</i>	44
<i>Streptococcus</i> sp.	Guangzhou, Foshan, Zhaoqing	Hybrid snakehead, <i>P. fulvidraco</i> , <i>O. marmorata</i> , <i>Lithobates catesbeiana</i>	34
<i>Vibrio</i> sp.	Foshan, Yangjiang, Zhaoqing	<i>P. fulvidraco</i> , <i>Trachinotus ovatus</i> , <i>Scatophagus argus</i> , <i>Epinephelus</i> spp.	15
<i>Edwardsiella</i> sp.	Foshan	<i>M. salmoides</i>	7
<i>Nocardia</i> sp.	Foshan	Hybrid snakehead, <i>M. salmoides</i>	7

## 1.2 实验药物及主要试剂

猴耳环干燥叶片(产地广东惠州, 人工种植采摘后由机器烘干处理), 莱泰农业(惠州)有限公司; 脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)和水解酪蛋白胨肉汤(mueller hinton broth, MH), 北京陆桥技术股份有限公司; 琼脂粉(agar), BioFroxx 公司; 马血清, 北京索莱宝科技有限公司; 清蛋白葡萄糖过氧化氢酶添加剂(oleic albumin dextrose catalase, OADC), 青岛海博生物技术有限公司; 需氧菌药敏检测板, 复星诊断科技(上海)有限公司; 96 孔细胞培养板, 广州洁特生物过滤股份有限公司; 钾(K<sup>+</sup>)测试盒, 南京建成生物工程研究所; Gluta 电镜固定液, 福州飞净生物科技有限公司; 刃天青指示剂, 上海源叶生物科技有限公司; 血琼脂平板, 广州市迪景微生物科技有限公司。

## 1.3 猴耳环水提物制备

首先将猴耳环叶放入烘箱中 37 °C 烘干 24 h, 除去残余水分, 完全干燥后放入粉碎机粉碎, 用 80 目筛去除未能粉碎的物质, 过筛后获得猴耳环粉末。准确称量 100 g 猴耳环粉末, 去离子水 1 L, 加入在锥形瓶中, 先混匀浸泡 12 h 后, 武火煮沸转文火煮 30 min, 反复煎煮 2 次后, 收集药液, 药渣中加水收集残留药液, 最终定容至 1.0 L, 此时猴耳环水提液浓度为 100 mg/mL, 121 °C 灭菌 15 min, 冷却后进行 4 °C、8 000 r/min

离心 15 min, 取上清液于 4 °C 冰箱中保存。

## 1.4 实验菌株菌液制备

将前期分离鉴定保种的病原菌从 -80 °C 冰箱中取出, 使用 BHI 琼脂平板进行复苏, 28 °C 培养 24 h, 培养完成后挑取长势良好的单菌落于新的 BHI 琼脂平板(链球菌和诺卡氏菌使用血琼脂平板)中进行划线复壮, 继续 28 °C 培养 24 h, 挑取复壮后的菌落 3-5 个, 置于 2-3 mL 灭菌生理盐水中, 用麦氏比浊仪进行比浊, 调整菌液浓度为 0.5 麦氏单位浓度(1.5×10<sup>8</sup> CFU/mL)。

## 1.5 抗菌药物对病原菌的最小抑菌浓度(MIC)测定

在进行药敏实验前, 采用标准菌株大肠杆菌 ATCC 25922 对药敏板进行质控。这些药敏板分别包含多种抗菌药物, 具体为恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、多西环素、氟甲喹、磺胺间甲氧嘧啶钠以及甲氧苄啶/磺胺甲噁唑。

取 1.4 节制备的菌液 60 μL, 滴入无菌加样槽中, 加 MH 肉汤培养液(12 mL), 充分混匀(链球菌试验需要额外添加马血清 600 μL, 诺卡氏菌试验额外添加 OADC 增菌液 600 μL)。用微量移液器吸取稀释菌液 100 μL, 加入药敏板(药物浓度见表 2)中除阴性对照孔以外的 95 个孔, 阴性对照孔加无菌 MH 肉汤培养液 100 μL, 28 °C 培养 16-24 h 后, 观察实验结果, 参照 NCCLS 抗菌药物敏感性试验解释标准记录 MIC 值。

表 2 药敏检测板浓度梯度表

Table 2 The concentration gradient table of drug sensitivity detection plate (μg/mL)

Antibacterial agents	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Enrofloxacin	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015
Neomycin sulfate	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Thiamphenicol	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
Florfenicol	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
Doxycycline	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062 5
Flumequine	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Sulfamonomethoxine sodium	1 024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	Positive control
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	64/1 216	32/608	16/304	8/152	4/76	2/38	1/19	0.5/9.5	0.25/4.8	0.125/2.4	0.06/1.2	Negative control

### 1.6 水产主要病原菌敏感性判定转折点

参考 CLSI 药敏标准(M45、M100、VET02)和欧盟药敏标准 EUCAST, 实验用 8 种抗菌药物耐药性判定折点结果见表 3, 其中链球菌仅有多西环素和复方磺胺甲噁唑 2 种抗菌药物有明确的药敏判定标准, 气单胞菌、爱德华氏菌和弧菌除氟甲喹外的 7 种抗菌药物均有明确的耐药性判定标准。

### 1.7 猴耳环水提物对病原菌的最小抑菌浓度(MIC)测定

使用二倍稀释法在无菌 96 孔板上对猴耳环水提物进行依次稀释, 在每行第一孔中加入猴耳环水提物 200  $\mu\text{L}$ , 其余孔中分别加入 MH 肉汤培养液 100  $\mu\text{L}$ , 然后再逐次倍比稀释至第 10 列(每孔液体终体积是 100  $\mu\text{L}$ ), 最后猴耳环水提物浓度变为原始浓度的 1/2、1/4、1/8……1/1 024。取 1.4 节制备的菌液 60  $\mu\text{L}$ , 滴入无菌加样槽中, 加 MH 肉汤培养液(12 mL), 充分混匀。使用微量移液器在除第 11 列的阴性对照孔中全部加入稀释菌液 100  $\mu\text{L}$ , 阴性对照添加无菌 MH 肉汤培养液 100  $\mu\text{L}$ , 每孔液体终体积为 200  $\mu\text{L}$ , 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 16–24 h 后, 参照 NCCLS 抗菌药物敏感性试验解释标准记录 MIC 值。

### 1.8 猴耳环水提物对病原菌的抑菌圈测定

使用特异性引物或者 *gyrB* 基因在 1.1 节属水平基础上进行定种, 挑选 9 株不同菌种的病原菌, 分别为舒伯特气单胞菌、嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、迟缓爱德华氏菌、杀鱼爱德华氏菌、副溶血弧菌、海豚链球菌、无乳链球菌和鲷鱼诺卡氏菌, 采用牛津杯法测定猴耳环水提物的抑菌圈大小, 按照 1.4 节的方法制备菌液, 然后稀释 10 倍( $1.5 \times 10^7$  CFU/mL), 取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 MH 琼脂平板, 放置上孔内径为 6 mm 的无菌牛津杯, 每个平板内放置 4 个牛津杯, 其中 3 孔为试验组生物学重复, 每个试验孔内加入 100  $\mu\text{L}$  猴耳环水提物, 第 4 孔为阴性对照, 内为无菌水。将平板正置于恒温培养箱内, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h。选取 3 个不同角度测量抑菌圈直径大小。

### 1.9 猴耳环水提物对耐药菌株的抑菌效果测定

舒伯特气单胞菌耐药菌株来自水产病害课题组, 前期采用不断提高浓度的恩诺沙星诱导并保存, 恩诺沙星对其的 MIC 由诱导前 0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$  变为诱导后 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用纸片法测定猴耳环对舒伯特气单胞菌耐药菌株的抑菌效果, 将耐药菌株和敏感菌株按照 1.4 节的方法进行制备, 然

表 3 病原菌抗菌药物耐药性折点

Table 3 The break point of antibacterial agents resistance of pathogenic bacteria ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Antibacterial agents	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Edwardsiella</i> sp., <i>Vibrio</i> sp.			<i>Streptococcus</i> sp.		
	S	I	R	S	I	R
Enrofloxacin	$\leq 0.5$	1–2	$\geq 4$	–	–	–
Neomycin sulfate	$\leq 4$	8	$\geq 16$	–	–	–
Thiamphenicol	$\leq 8$	–	$\geq 16$	–	–	–
Florfenicol	$\leq 2$	4	$\geq 8$	–	–	–
Doxycycline	$\leq 4$	8	$\geq 16$	$\leq 1$	–	$\geq 2$
Flumequine	–	–	–	–	–	–
Sulfamonomethoxine sodium	$\leq 256$	–	$\geq 512$	–	–	–
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	$\leq 2/38$	–	$\geq 4/76$	$\leq 1/19$	–	$\geq 2/38$

S: 敏感; I: 中介; R 耐药; –: 无对应药物的耐药折点

S: Sensitivity; I: Intermediary; R: Resistance; –: The resistance break point for no corresponding drug.

后稀释 10 倍后( $1.5 \times 10^7$  CFU/mL)取 100  $\mu$ L 均匀涂布于 MH 琼脂平板, 放置直径为 6 mm 的无菌空白药敏纸片, 然后往其中滴加 10  $\mu$ L 猴耳环水提物, 每个平板内放置 3 个生物学重复, 阳性对照使用恩诺沙星药敏片(10  $\mu$ g/tablet) (原始株对恩诺沙星敏感而耐药株对恩诺沙星耐药, 可以直观地展现出它们对恩诺沙星敏感性)。将平板正置于恒温培养箱内, 28  $^{\circ}$ C 培养 12 h。选取 3 个不同角度测量抑菌圈直径大小。

采用二倍稀释法测定猴耳环水提物对舒伯特气单胞菌原始株和耐药株的 MIC, 操作同 1.7 节所述。在培养 12 h 后, 往孔内加入 10  $\mu$ L 刃天青指示剂, 然后再继续培养 2 h 进行结果观察。刃天青指示剂颜色变化可判断药物的抑菌效果, 刃天青的减少与细菌数量的增加存在直接关系, 在有细菌存在的时候, 加入刃天青的孔会由蓝紫色变为粉红色甚至无色, 若加入的物质存在杀菌效果, 则不会改变其颜色<sup>[29]</sup>。

### 1.10 猴耳环水提物对细菌细胞膜通透性影响的测定

挑选革兰氏阳性菌无乳链球菌(FS23091905as)和革兰氏阴性菌副溶血弧菌(YJ2307004), 分别与终浓度为其对应的 MIC 的猴耳环水提物共培养 24 h。将培养后的菌液 4  $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 15 min, 得到上清液, 使用钾测试盒测定细菌胞外的  $K^+$  浓度。

### 1.11 透射电镜观察猴耳环水提物杀菌机制

实验菌株同 1.10 节, 分别与终浓度为其对应 MIC 的猴耳环水提物共培养 6 h (较短时间的培养可得到细菌介于未破坏和完全破坏之间的状态)。将培养后的菌液 4  $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清培养基后加入电镜固定液, 将菌体吹散悬浮于固定液内, 4  $^{\circ}$ C 避光固定过夜。样品后期按顺序进行的漂洗、固定、漂洗、脱水、浸透、包埋及超薄切片, 均在中山大学生命科学学院透射电镜研究室进行。

### 1.12 数据分析

使用 GraphPad Prism 9 和 Adobe Photoshop 2023 软件进行图片处理, SPSS 26 软件进行单因素方差分析数据显著性差异, 数据为平均值 $\pm$ 标准差表示,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)测定结果

对 107 株病原菌进行 8 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)测定, 结果显示不同菌株的药物敏感性差异较大。5 个菌属的病原菌均对磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑表现出较高的耐药性。气单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、多西环素、磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的耐药率高于其他病原菌, 分别为 38.63%、11.36%、54.55%、50.00%、20.45%、93.18%和 65.90%。爱德华氏菌和诺卡氏菌对甲砒霉素的耐药率高达 100.00%, 表现出了完全耐药。弧菌对除磺胺间甲氧嘧啶钠外的其他几类抗菌药物均较敏感。链球菌无恩诺沙星、硫酸新霉素等 5 种抗菌药物的耐药折点, 无法计算耐药率(表 4)。

将 107 株病原菌进行多重耐药性分析, 2023 年广东省主要水产养殖区水产动物 107 株病原菌中有 78 株菌株出现耐药情况, 占比 72.90%, 共表现出 21 种耐药谱, 其中 44 株气单胞菌均表现出耐药特征, 占比 56.41%。耐药谱结果表明, 单独耐药类型有 3 种共 28 株, 双重耐药有 6 种共 20 株, 三重耐药有 4 种共 8 株, 四重耐药有 3 种共 7 株, 五重耐药有 3 种共 12 株, 六重耐药 1 种共 2 株, 七重耐药 1 种共 1 株, 其中对磺胺间甲氧嘧啶钠和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑的单独耐药率最高为 13.08% (14/107)和 9.35% (10/107), 耐药最严重的一株菌株为嗜水气单胞菌, 对 7 种抗菌药物均表出耐药特征(表 5)。

表 4 病原菌对不同抗菌药物的耐药率

Table 4 The resistance rate of pathogenic bacteria to different antibacterial agents (%)

Antibacterial agents	<i>Aeromonas</i> sp. (n=44)	<i>Vibrio</i> sp. (n=15)	<i>Edwardsiella</i> sp. (n=7)	<i>Streptococcus</i> sp. (n=34)	<i>Nocardia</i> sp. (n=7)
Enrofloxacin	38.63	0.00	14.29	–	0.00
Neomycin sulfate	11.36	0.00	0.00	–	0.00
Thiamphenicol	54.55	6.67	100.00	–	100.00
Florfenicol	50.00	6.67	0.00	–	14.29
Doxycycline	20.45	0.00	0.00	11.76	0.00
Sulfamonomethoxine sodium	93.18	60.00	85.71	–	28.57
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	65.90	6.67	0.00	32.35	14.29

–: 无对应药物的耐药折点; n: 菌株数量; 诺卡氏菌属参考气单胞菌属的耐药折点

–: The resistance break point for no corresponding drug; n: Number of strains; The resistance break point for *Nocardia* sp. is based on that of *Aeromonas* sp.

表 5 病原菌多重耐药情况

Table 5 The multiple drug resistance of pathogenic bacteria

Drug resistance spectrum	Number of strains	Percentage (%)	Drug resistance spectrum	Number of strains	Percentage (%)
SMM	14	13.08	FFC+SMM+SXT	1	0.93
SXT	10	9.35	ENR+THI+SMM	1	0.93
THI	4	3.74	THI+FFC+SMM+SXT	5	4.67
THI+SMM	9	8.41	THI+FFC+DOX+SMM	1	0.93
DOX+SXT	4	3.74	ENR+DOX+SMM+SXT	1	0.93
ENR+SMM	3	2.80	THI+FFC+DOX+SMM+SXT	3	2.80
SMM+SXT	2	1.87	ENR+THI+FFC+SMM+SXT	8	7.48
ENR+THI	1	0.93	ENR+THI+FFC+SMM+SXT	1	0.93
THI+FFC	1	0.93	ENR+THI+FFC+DOX+SMM+SXT	2	1.87
NEO+SMM+SXT	3	2.80	ENR+NEO+THI+FFC+DOX+SMM+SXT	1	0.93
THI+FFC+SMM	3	2.80			

ENR: 恩诺沙星; NEO: 硫酸新霉素; THI: 甲砒霉素; FFC: 氟苯尼考; DOC: 多西环素; SMM: 磺胺间甲氧嘧啶钠; SXT: 甲氧苄啶/磺胺甲噁唑

ENR: Enrofloxacin; NEO: Neomycin sulfate; THI: Thiamphenicol; FFC: Florfenicol; DOC: Doxycycline; SMM: Sulfamonomethoxine sodium; SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

## 2.2 猴耳环水提物的最小抑菌浓度(MIC)测定结果

猴耳环水提物的最低抑菌浓度(MIC)测定试验发现, 其对 107 株病原菌均具有抑菌效果, 而且同一菌属的 MIC 相近。气单胞菌属的 MIC 分布在 0.78–3.12 mg/mL, 链球菌属的 MIC 分布在 6.25–12.50 mg/mL, 弧菌属的 MIC 分布在 1.56–6.25 mg/mL, 爱德华氏菌属的 MIC 分布在 3.12–6.25 mg/mL, 诺卡氏菌属的 MIC 均为 6.25 mg/mL (表 6)。猴耳环水提液对各类病原菌的 MIC<sub>50</sub> 为 6.25 mg/mL, MIC<sub>90</sub> 为 12.50 mg/mL。

## 2.3 猴耳环水提物对病原菌的抑菌圈测定

从猴耳环水提液对病原菌的 MIC 测定结果中, 挑选 9 株不同种类的病原菌, 采用牛津杯扩散法进行了抑菌试验, 结果显示, 猴耳环水提物对挑选的菌株均表现出体外抑菌活性(图 1), 抑菌圈测定结果为舒伯特气单胞菌(29.94±0.35) mm、嗜水气单胞菌(21.02±0.73) mm、海豚链球菌(19.33±0.09) mm、迟缓爱德华氏菌(19.12±0.06) mm、维氏气单胞菌(17.36±0.44) mm、鲰鱼诺卡氏菌(16.43±0.50) mm、杀鱼爱德华氏菌(15.32±0.18) mm、无乳链球菌(14.68±0.41) mm 和副溶血弧菌(14.66±0.47) mm (图 2)。



表 6 病原菌在不同猴耳环水提物浓度下 MIC 的菌株数

Table 6 The number of strains with MIC of pathogenic bacteria at different concentrations of water extracts from *Pithecellobium clypearia*

Concentrations (mg/mL)	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Vibrio</i> sp.	<i>Edwardsiella</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Nocardia</i> sp.
12.50	2	—	—	14	—
6.25	5	6	5	20	7
3.12	22	6	2	—	—
1.56	4	3	—	—	—
0.78	10	—	—	—	—
0.39	1	—	—	—	—

—: 在该药物浓度下无相应菌株

—: There is no corresponding strain at this drug concentration.

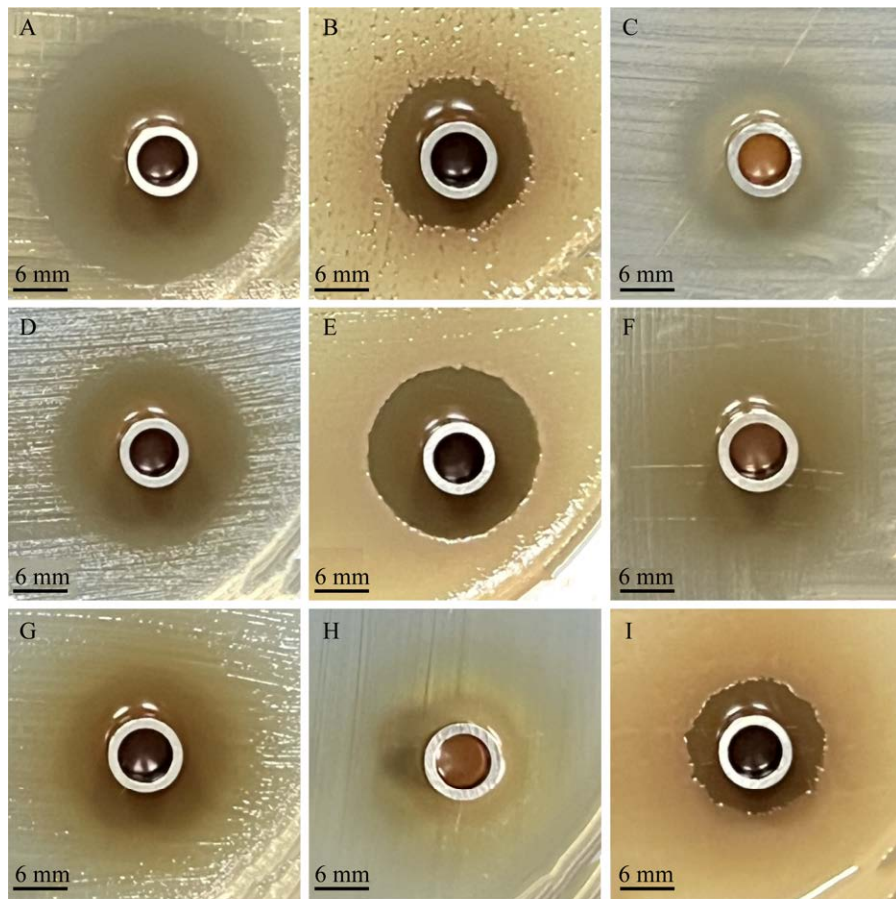
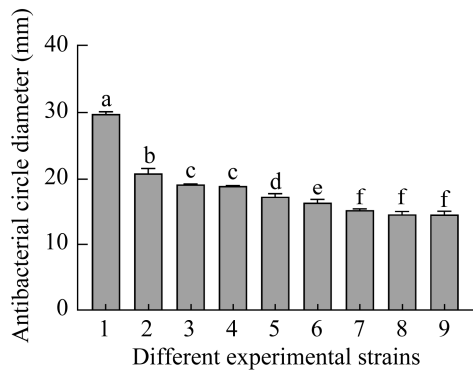


图 1 猴耳环水提物牛津杯法抑菌试验结果

Figure 1 The antibacterial test results of water extract of *Pithecellobium clypearia* using Oxford cup method. A: *Aeromonas schubertii*. B: *Aeromonas hydrophila*. C: *Streptococcus iniae*. D: *Edwardsiella tarda*. E: *Aeromonas veronii*. F: *Nocardia seriolae*. G: *Edwardsiella piscicida*. H: *Streptococcus agalactiae*. I: *Vibrio parahaemolyticus*.

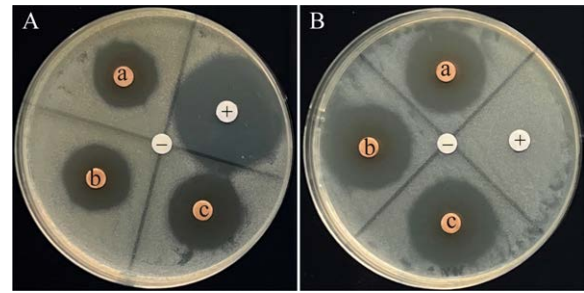


**图 2** 猴耳环水提取物抑菌作用的比较分析 1: 舒伯特气单胞菌; 2: 嗜水气单胞菌; 3: 海豚链球菌; 4: 迟缓爱德华氏菌; 5: 维氏气单胞菌; 6: 鳟鱼诺卡氏菌; 7: 杀鱼爱德华氏菌; 8: 无乳链球菌; 9: 副溶血弧菌. 不同字母表示差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )

Figure 2 The comparative analysis of antibacterial effects of water extracts from *Pithecellobium clypearia*. 1: *Aeromonas schubertii*; 2: *Aeromonas hydrophila*; 3: *Streptococcus iniae*; 4: *Edwardsiella tarda*; 5: *Aeromonas veronii*; 6: *Nocardia seriolae*; 7: *Edwardsiella piscicida*; 8: *Streptococcus agalactiae*; 9: *Vibrio parahaemolyticus*. Different letters indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ).

#### 2.4 猴耳环水提取物对耐药菌株的抑菌效果

通过琼脂扩散法发现,猴耳环水提取物对舒伯特气单胞菌原始敏感菌株(WL23S)和其恩诺沙星耐药菌株(WL23R)均具有抑菌效果(图 3),猴耳环水提取物对原始敏感菌株和恩诺沙星耐药株



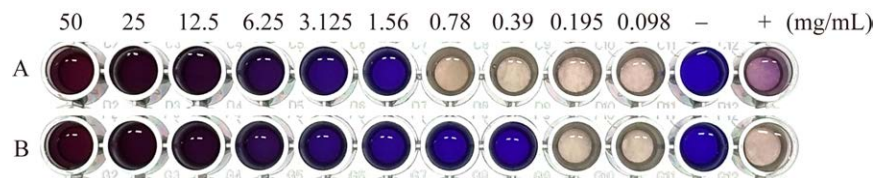
**图 3** 猴耳环水提取物对恩诺沙星耐药菌株和原始敏感菌株的抑菌效果

Figure 3 The antibacterial effects of water extract from *Pithecellobium clypearia* on drug-resistant and primitive strains. A: WL23S. B: WL23R. a, b, c: The water extract from *P. clypearia*; -: Negative control (sterile water); +: Positive control (enrofloxacin).

的抑菌圈直径分别为( $22.76\pm 0.23$ ) mm 和 ( $28.34\pm 0.12$ ) mm,猴耳环水提取物对恩诺沙星耐药菌株的抑菌效果更为显著( $P<0.05$ )。微量肉汤稀释法测得猴耳环水提取物对原始敏感菌株的 MIC 为 0.78 mg/mL,对恩诺沙星耐药株的 MIC 为 0.20 mg/mL (图 4)。

#### 2.5 细菌胞外钾离子浓度测定结果

无乳链球菌在 MIC 对应浓度的猴耳环水提取物处理后细菌胞外  $K^+$  的浓度由( $9.14\pm 0.11$ ) mmol/L 显著增加至( $10.49\pm 0.11$ ) mmol/L ( $P<0.05$ ),副溶血弧菌在 MIC 对应浓度的猴耳环水提取物处理后细菌胞外  $K^+$  的浓度由( $3.93\pm 0.01$ ) mmol/L 显著增加至( $6.55\pm 0.38$ ) mmol/L ( $P<0.05$ ) (图 5)。



**图 4** 猴耳环水提取物对恩诺沙星耐药菌株和原始敏感菌株的抑菌效果

Figure 4 The antibacterial effect of water extract from *Pithecellobium clypearia* on drug-resistant and primitive strains. A: WL23S. B: WL23R. The number is the concentration of water extract from *P. clypearia* (mg/mL); -: Negative control; +: Positive control.

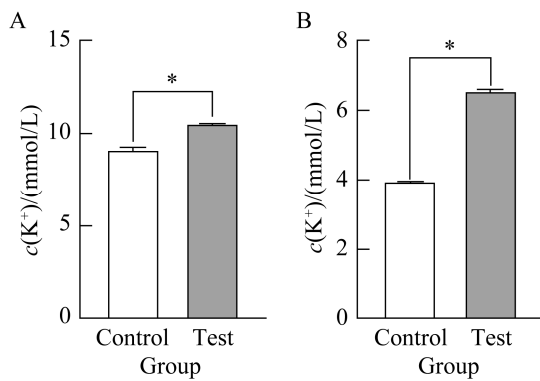


图 5 猴耳环水提物处理后的菌液中钾离子浓度测定

Figure 5 The determination of K<sup>+</sup> concentration in bacterial solution after treatment with water extract from *Pithecellobium clypearia*. A: *Streptococcus agalactiae*. B: *Vibrio parahaemolyticus*. \*: Indicates significant difference compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

### 2.6 透射电镜观察

在透射电镜下观察,无乳链球菌呈卵圆形球状细菌,外形饱满,细胞壁及胞膜结构完整,细胞质均匀,状态良好;而猴耳环水提物处理后的无乳链球菌细胞壁完整性破损严重,出现胞膜结

构模糊和菌体溶解,细胞内容物外流,严重受损,红色箭头所示。副溶血弧菌形态呈细长的弧形,细胞壁结构完整规则,细胞质均匀,状态良好;而猴耳环水提物处理后菌体变形,细胞膜向胞质内凹陷折叠,细胞质固缩,菌体内出现空腔,细胞受损严重蓝色箭头所示(图 6)。

### 3 讨论与结论

细菌性病害一直是水产养殖业面临的一大挑战,而抗菌药物则被视为主要的解决策略,然而,随着抗菌药物的不规范使用,耐药性问题日益严重<sup>[5-10]</sup>。本研究结果显示,2023 年广东省内不同地区分离到的不同菌株对 8 种抗菌药物的耐药率存在一定差异,但整体而言耐药程度均处于较高水平。其中,不同菌株普遍对磺胺类药物表现出耐药性,特别是气单胞菌对两种磺胺类药物的耐药率高达 93.18%和 65.90%。磺胺类是应用最早的一类人工合成抗菌药物之一,因其高水溶性和广谱抑菌性在水产养殖业中得到广泛应用,其高耐药率的出现可能与养殖场常使用磺胺

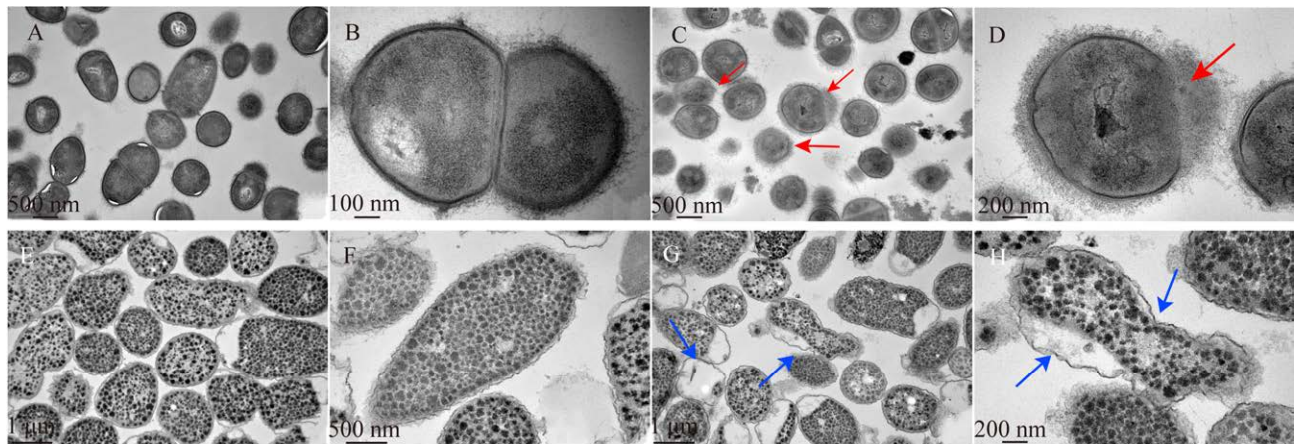


图 6 猴耳环水提物处理的无乳链球菌和副溶血弧菌的透射电镜图

Figure 6 The transmission electron microscopy images of *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus* treated with water extract from *Pithecellobium clypearia*. A–B: Represents untreated *S. agalactiae*. C–D: Represents *S. agalactiae* treated with *P. clypearia*. E–F: Represents untreated *V. parahaemolyticus*. G–H: Represents *V. parahaemolyticus* treated with *P. clypearia*.

类药物来治疗细菌性病害的用药习惯有关<sup>[30]</sup>。此外,磺胺类药物还能诱导菌株耐药基因(ARGs)的表达,ARGs可以通过水平基因转移作用从环境菌株中转移至致病菌,一旦致病菌产生耐药性,控制和治理细菌性病害会更加困难<sup>[31]</sup>。气单胞菌是引起水产养殖病害的最常见致病菌之一,抗菌药物的不合理使用、革兰氏阴性菌不对称双层外膜的特点以及耐药基因的传播,导致气单胞菌耐药问题突出,许多研究表明从水生动物中分离的气单胞菌具有耐药现象普遍、耐药谱广和耐药率高的特点<sup>[32-34]</sup>。本研究从病原菌数量和整体耐药情况也得出了同样的结果,分离数量最多的气单胞菌表现出了最高耐药率,其多重耐药情况也最为严重,占多重耐药菌的56.41%,其中一株嗜水气单胞菌表现出了七重耐药特征,几乎对水产用药明白纸上的抗菌药物完全耐药。因此,可见水产养殖中耐药细菌的广泛流行,迫切需要开发新型环境友好的治疗方法。

中草药因具有易分解、残留少、价格低廉和不易产生耐药性等特点,已成为水产养殖中细菌性病害防控的有力替代方案<sup>[35-39]</sup>。猴耳环作为一种天然药物,凭借其抗菌、抗病毒和抗炎活性备受瞩目<sup>[24,27-28,40-42]</sup>。本研究发现,当猴耳环水提物浓度为12.50 mg/mL时,对全部107株实验菌株均显示出较好的抑制作用,对气单胞菌的抑菌效果尤为突出,其MIC低至0.39 mg/mL。与其他研究相比,高晓华等<sup>[43]</sup>发现40种中草药对美洲鲈源温和气单胞菌的体外抑菌MIC范围为7.81-31.25 mg/mL,以及王宝屯等<sup>[44]</sup>报道的76味中草药对无乳链球菌体外抑菌MIC范围为3.9-250.0 mg/mL,猴耳环在较低浓度下即展现出对不同菌属病原菌的优异抑菌效果。这表明猴耳环在水产养殖细菌性病害防控方面具有巨大的开发潜力,有望为水产绿色抗菌药物的开发提供新的参考。

耐药性使细菌对抗菌药物的敏感性降低或丧失,常规治疗剂量的抗菌药物无法有效抑制或杀灭细菌,从而导致治疗失败和感染持续<sup>[45]</sup>。本研究发现猴耳环水提物对107株具有不同耐药特征的病原菌均具有抑菌效果,对同一菌种中不同耐药性的菌株抑菌效果相近。进一步评估了猴耳环水提物对人工诱导的舒伯特气单胞菌恩诺沙星耐药株的抑菌效果,结果显示猴耳环水提物对耐抗菌药物菌株具有良好的抑菌效果,猴耳环水提物对耐药菌株(MIC为0.20 mg/mL)的抑菌效果优于对应的原始敏感菌株(MIC为0.78 mg/mL)。这一发现与Liu等<sup>[27]</sup>的研究结果相似,该研究也观察到猴耳环提取物对临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌具有显著抑菌作用。多项研究表明恩诺沙星耐药菌株的耐药机制与外排泵作用相关,这些耐药细菌能够通过外排系统,将抗菌药物排出细胞外,从而阻止药物在细菌内累积,达到有效的抑菌浓度<sup>[46-48]</sup>。基于以上研究,我们推测猴耳环的杀菌机制可能不受菌株耐药机制的影响,耐药菌株的外排系统无法将猴耳环水提物排出胞外,从而具有较好的抑菌效果。深入开展中草药猴耳环的研究,有望为抗耐药细菌的治疗提供新思路和方法。

多项研究发现,中草药主要通过破坏细菌细胞膜结构起到杀菌抑菌效果<sup>[15,27-28,48-49]</sup>。本研究也发现类似结果,并且发现猴耳环水提物对革兰氏阴性菌的抑制效果明显优于革兰氏阳性菌,这可能是由于两类菌株的外膜结构差异所致。革兰氏阳性菌具有较厚的由肽聚糖组成的细胞壁<sup>[50]</sup>,因此其对猴耳环的抵抗能力较强。进一步的研究发现,经猴耳环水提物处理后,细菌胞外 $K^+$ 浓度显著增加,这反映了细胞成分的渗漏和细胞膜的损伤,从而增加细胞通透性,导致胞内 $K^+$ 外流。这一结果与Liu等<sup>[28]</sup>的研究相吻合,他们观察到猴耳环提取物能够破坏金黄色葡萄球菌的

细胞膜结构, 从而促进了  $K^+$  的外流。此外, 本研究还通过透射电镜观察发现, 猴耳环水提物处理后的细菌形态和细胞膜结构遭到破坏, 随后导致细胞收缩和细胞裂解, 内容物流出, 最终导致细胞死亡。Liu 等<sup>[27]</sup> 也通过透射电镜结果发现, 猴耳环提取物通过破坏细菌细胞壁起到杀菌效果。这表明猴耳环主要通过破坏细胞膜和细胞壁的结构, 影响细胞的通透性, 进而增加胞内  $K^+$  的外流, 最终导致细菌的死亡, 说明猴耳环具有杀菌作用。这些发现为我们更深入地理解猴耳环的杀菌抑菌机制提供了重要依据。

综上所述, 猴耳环已展现出对不同种类病原菌和耐药株的较好的体外抑菌效果, 进一步的研究揭示, 其主要通过破坏细胞膜结构导致细菌死亡, 从而在防治水生动物细菌性病害方面具有巨大的开发潜力。然而, 目前关于猴耳环在水产养殖中的实际应用尚无研究, 对其具体的抑菌作用机制研究也不够深入。因此仍需对猴耳环在鱼体内的药物代谢、安全性、副作用以及实际防治效果等多种因素进行全面而细致的评估, 以期为其在未来水产养殖中的广泛应用提供坚实的科学依据。

## 参考文献

- [1] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2022[EB/OL]. (2022-07-01) [2024-05-22]. [http://www.lmcwater.org.cn/authoritative\\_opinion/study/202207/t20220701\\_35915.html](http://www.lmcwater.org.cn/authoritative_opinion/study/202207/t20220701_35915.html).
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 18. Fisheries and Fisheries Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fisheries Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 18 (in Chinese).
- [3] REVERTER M, SARTER S, CARUSO D, AVARRE JC, COMBE M, PEPEY E, POUYAUD L, VEGA-HEREDÍA S, de VERDAL H, GOZLAN RE. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1870.
- [4] 刘堂水, 魏丽英, 李远国, 艾桃山. 水产养殖动物疾病防治实用新技术专题讲座 第一篇 水产养殖动物疾病防治现状与对策(下)[J]. 渔业致富指南, 2010(2): 59-60. LIU TS, WEI LY, LI YG, AI TS. Special lecture on practical new technologies for disease prevention and control of aquaculture animals part I current situation and countermeasures for disease prevention and control of aquaculture animals (part II)[J]. Fishery Guide to Be Rich, 2010(2): 59-60 (in Chinese).
- [5] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站编. 2023 中国水生动物卫生状况报告[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023. Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center. 2023 Aquatic Animal Health in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023 (in Chinese).
- [6] DADAR M, DHAMA K, VAKHARIA VN, HOSEINIFAR SH, KARTHIK K, TIWARI R, KHANDIA R, MUNJAL A, SALGADO-MIRANDA C, JOSHI SK. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends[J]. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2017, 25(3): 184-217.
- [7] ASSEFA A, ABUNNA F. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish[J]. Veterinary Medicine International, 2018: 5432497.
- [8] PÉREZ-SÁNCHEZ T, MORA-SÁNCHEZ B, BALCÁZAR JL. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(11): 896-903.
- [9] SOLIMAN WS, SHAAPAN RM, MOHAMED LA, GAYED SSR. Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy[J]. Open Veterinary Journal, 2019, 9(3): 190-195.
- [10] CHEN JM, SUN RX, PAN CG, SUN Y, MAI BX, LI QX. Antibiotics and food safety in aquaculture[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(43): 11908-11919.

- [11] SUBASINGHE R. Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: the issues, prospects and challenges[J]. *Options Méditerranéennes*, 2009, 86: 5-11.
- [12] 王亚楠, 胡永飞, 朱宝利, 焦新安, 高福. 养殖动物及其相关环境耐药组的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1226-1233.  
WANG YN, HU YF, ZHU BL, JIAO XA, GEORGE GAO F. Antibiotic resistance in farm animals and their related environments: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(8): 1226-1233 (in Chinese).
- [13] 史晓敏, 王少林. 食品动物养殖环境中细菌耐药性研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1234-1245.  
SHI XM, WANG SL. Antibiotic resistance in environment of animal farms[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(8): 1234-1245 (in Chinese).
- [14] 柴霜, 赵文卓, 杨芳, 王小清, 于正森. 细菌耐药性及抗菌新药研发策略[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2021, 42(4): 204-208.  
CHAI S, ZHAO WZ, YANG F, WANG XQ, YU ZS. Bacterial resistance and strategies for new antimicrobial drugs development[J]. *World Notes on Antibiotics* 2021, 42(4): 204-208.
- [15] CHAN EWL, GRAY AI, IGOLI JO, LEE SM, GOH JK. Galloylated flavonol rhamnosides from the leaves of *Calliandra tergemina* with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Phytochemistry*, 2014, 107: 148-154.
- [16] 刘泉, 曹征征, 崔潞晴, 郭凯旋, 张凡, 戴梦红. 抗细菌耐药性策略: 质粒消除[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2023, 44(3): 185-191.  
LIU Q, CAO ZZ, CUI LQ, GUO KX, ZHANG F, DAI MH. Strategies to combat bacterial resistance: plasmid curing[J]. *World Notes on Antibiotics*, 2023, 44(3): 185-191 (in Chinese).
- [17] 黄春红, 李婷, 邓萍萍, 乔金宇. 中草药及其提取物在水产动物养殖中的研究进展[J]. *饲料研究*, 2023, 46(17): 152-156.  
HUANG CH, LI T, DENG PP, QIAO JY. Research progress of Chinese medicinal herb and extracts in aquatic animals[J]. *Feed Research*, 2023, 46(17): 152-156 (in Chinese).
- [18] 农业农村部渔业渔政管理局. 关于发布《水产养殖用药明白纸 2022 年 1、2 号》宣传材料的通知. [EB/OL]. (2021-11-15) [2024-05-22]. [http://www.yyj.moa.gov.cn/gzdt/202211/t20221115\\_6415528.htm](http://www.yyj.moa.gov.cn/gzdt/202211/t20221115_6415528.htm).  
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. The notice regarding the release of the promotional materials for "Aquatic Medication Guidelines 2022 No. 1 & 2"[EB/OL]. (2021-11-15) [2024-05-22]. [http://www.yyj.moa.gov.cn/gzdt/202211/t20221115\\_6415528.htm](http://www.yyj.moa.gov.cn/gzdt/202211/t20221115_6415528.htm).
- [19] 郭焕裕, 王亮, 葛海霞. 中草药在抗水产动物致病菌中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(2): 19-22.  
GUO HY, WANG L, GE HX. Application of Chinese herbal medicine in pathogenic bacteria of aquatic animals[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2022, 50(2): 19-22 (in Chinese).
- [20] YIN ML, CHEN HX, HE YZ, GAO X, HUANG SB, WANG J. First report of *Fusarium oxysporum* causing *Fusarium* dieback on *Archidendron clypearia* in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 105(2): 500.
- [21] 邱道寿, 邓乔华, 范会云. 绿色抗生素: 猴耳环[J]. *生命世界*, 2020(9): 46-47.  
QIU DS, DENG QH, FAN HY. Green antibiotic: *Pithecellobium clypearia*[J]. *Life World*, 2020(9): 46-47 (in Chinese).
- [22] 张志坚, 李镜友, 李国强. 猴耳环研究进展[J]. *中国药业*, 2010, 19(18): 82-84.  
ZHANG ZJ, LI JY, LI GQ. Research progress of *Archidendron clypearia*[J]. *China Pharmaceuticals*, 2010, 19(18): 82-84 (in Chinese).
- [23] BAO L, YAO XS, XU JK, GUO XY, LIU HW, KURIHARA H. Effects of *Pithecellobium clypearia* Benth extract and its main components on inflammation and allergy[J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(6): 349-353.
- [24] LI YL, OOI LSM, WANG H, BUT PPH, OOI VEC. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern China[J]. *Phytotherapy Research*, 2004, 18(9): 718-722.
- [25] 覃旭. 柑橘溃疡病防治药剂的研究[D]. 桂林: 广西师范大学硕士学位论文, 2010.  
QIN X. Study on the control agents of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrii*[D]. Guilin: Master's Thesis of Guangxi Normal University, 2010 (in Chinese).
- [26] 李超. 猴耳环提取方法和体外抑菌活性研究[J]. *四川畜牧兽医*, 2018, 45(1): 27-28.  
LI C. Study on the extraction method and antibacterial activity *in vitro* of *Pithecellobium clypearia*[J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2018, 45(1): 27-28 (in Chinese).
- [27] LIU C, HUANG H, ZHOU Q, LIU BY, WANG YG, LI PB, LIAO K, SU WW. Antibacterial and antibiotic synergistic activities of the extract from *Pithecellobium clypearia* against clinically important

- multidrug-resistant Gram-negative bacteria[J]. European Journal of Integrative Medicine, 2019, 32: 100999.
- [28] LIU C, HUANG H, ZHOU Q, LIU B, WANG Y, LI P, LIAO K, SU W. *Pithecellobium clypearia* extract enriched in gallic acid and luteolin has antibacterial activity against MRSA and reduces resistance to erythromycin, ceftriaxone sodium and levofloxacin[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(4): 848-859.
- [29] 崔乃菠, 马境谦, 余河水, 李正, 何永志, 别松涛. 基于刃天青微平板法检测金黄色葡萄球菌对天然产物的敏感性[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(6): 774-779.
- CUI NB, MA JQ, YU HS, LI Z, HE YZ, BIE ST. Susceptibility tests of *Staphylococcus aureus* to natural products using the resazurin method[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 41(6): 774-779 (in Chinese).
- [30] 邓玉婷, 谭爱萍, 张瑞泉, 赵飞, 姜兰. 广东主要水产养殖地区气单胞菌耐药状况的调查分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(11): 2375-2383.
- DENG YT, TAN AP, ZHANG RQ, ZHAO F, JIANG L. Antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from aquaculture areas in Guangdong[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(11): 2375-2383 (in Chinese).
- [31] 孙宇洁, 孟令轩, 朱琳, 帅馨怡, 林泽俊, Tiimub Benjamin Makimilua, 陈红. 水产养殖尾水中抗生素抗性基因的去除及磺胺类耐药细菌研究[J]. 环境科学学报, 2022, 42(5): 286-295.
- SUN YJ, MENG LX, ZHU L, SHUAI XY, LIN ZJ, MAKIMILUA TB, CHEN H. Removal of antibiotic resistance genes and sulfonamides resistant bacteria in aquaculture tail water[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(5): 286-295 (in Chinese).
- [32] 耿昕颖, 葛铮, 孔令聪, 朱世馨, 单晓枫, 马红霞, 高云航. 52 株不同淡水鱼类维氏气单胞菌耐药表型的分析[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(6): 1-5.
- GENG XY, GE Z, KONG LC, ZHU SX, SHAN XF, MA HX, GAO YH. Analysis of resistance phenotype to 52 *Aeromonas veronii* from different freshwater fish[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(6): 1-5 (in Chinese).
- [33] 任亚林, 李耘, 韩刚, 朱锋, 刘畅, 宋金龙. 水产品中嗜水气单胞菌耐药性研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 759-765.
- REN YL, LI Y, HAN G, ZHU F, LIU C, SONG JL. Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(5): 759-765 (in Chinese).
- [34] LI LL, YAO R, OLSEN RH, ZHANG Y, MENG HC. Antibiotic resistance and polymyxin B resistance mechanism of *Aeromonas* spp. isolated from yellow catfish, hybrid snakeheads and associated water from intensive fish farms in Southern China[J]. LWT, 2022, 166: 113802.
- [35] 王洪彬, 朱利霞, 杨楠, 吴同垒, 张志强, 高桂生, 史秋梅. 常用中草药对水产动物致病菌体外抑菌效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(5): 1357-1366.
- WANG HB, ZHU LX, YANG N, WU TL, ZHANG ZQ, GAO GS, SHI QM. Study on antibacterial effects of common Chinese herbs against aquatic animal pathogens *in vitro*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(5): 1357-1366 (in Chinese).
- [36] 杨泽禹, 黎慧, 吴志强, 王李宝, 史文军, 郑飞, 刘殿春, 万夕和. 水产动物致病菌耐药性研究现状与防控对策[J]. 中国渔业质量与标准, 2023, 13(5): 39-45.
- YANG ZY, LI H, WU ZQ, WANG LB, SHI WJ, ZHENG F, LIU DC, WAN XH. Current status, prevention and control strategies on antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in aquatic animals[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2023, 13(5): 39-45 (in Chinese).
- [37] ZHANG WN, ZHAO JP, MA YF, LI J, CHEN XH. The effective components of herbal medicines used for prevention and control of fish diseases[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 126: 73-83.
- [38] SEMWAL A, KUMAR A, KUMAR N. A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture[J]. Heliyon, 2023, 9(3): e14088.
- [39] ABDUL KARI Z, WEE W, MOHAMAD SUKRI SA, CHE HARUN H, HANIF REDUAN MF, IRWAN KHOO M, van DOAN H, WEN GOH K, WEI LS. Role of phytobiotics in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals: a mini-review[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 1023784.
- [40] LI YL, LEUNG KT, YAO FH, OOI LSM, OOI VEC. Antiviral flavans from the leaves of *Pithecellobium clypearia*[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(5): 833-835.

- [41] LOU LL, LI LG, LIU QB, LI DQ, LIU ZX, HUANG XX, SONG SJ. 3,3'-neolignans from *Pithecellobium clypearia* Benth and their anti-inflammatory activity[J]. *Fitoterapia*, 2016, 112: 16-21.
- [42] KANG J, LIU C, WANG HQ, LI BM, LI C, CHEN RY, LIU AL. Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Pithecellobium clypearia* Benth[J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 4479-4490.
- [43] 高晓华, 高玮, 张明辉. 40 种中草药对美洲鲟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.  
GAO XH, GAO W, ZHANG MH. The antibacterial effect of 40 kinds of Chinese herbal medicines on *Aeromonas sobria* from *Alosa sapidissima* *in vitro*[J]. *Feed Industry*, 2023, 44(12): 67-73 (in Chinese).
- [44] 王宝屯, 郭晗, 王梦雅, 胡建美, 冯娟, 林鑫, 苏友禄. 76 味中草药对无乳链球菌体外抑菌作用[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2021, 42(5): 67-71.  
WANG B, GUO H, WANG MY, HU JM, FENG J, LIN L, SU YL. Antibacterial effect of 76 kinds of Chinese herbal medicine on *Streptococcus agalactiae* from tilapia *in vitro*[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2021, 42(5): 67-71 (in Chinese).
- [45] 尹业师, 陈华海, 曹林艳, 唐林, 何福林. 细菌耐药性应对策略研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1346-1360.
- YIN YS, CHEN HH, CAO LY, TANG L, HE FL. Progress in strategies to combat antimicrobial resistance[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(8): 1346-1360 (in Chinese).
- [46] ALDRED KJ, KERNS RJ, OSHEROFF N. Mechanism of quinolone action and resistance[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(10): 1565-1574.
- [47] TANG K, ZHAO H. Quinolone antibiotics: resistance and therapy[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2023, 16: 811-820.
- [48] HUANG SR, CHEN XJ, YAN R, HUANG M, CHEN DF. Isolation, identification and antibacterial mechanism of the main antibacterial component from pickled and dried mustard (*Brassica juncea* coss. var. *foliosa* bailey)[J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2418.
- [49] 苏薇薇, 刘翀, 李沛波, 吴灏, 饶鸿宇. 中药猴耳环抗耐药菌药效及作用机制研究[M]. 广州: 中山大学出版社, 2021.  
SU WW, LIU C, LI PB, WU H, RAO HY. Study on the Efficacy and Mechanism of Chinese Medicine *Pithecellobium clypearia* Against Drug-resistant Bacteria[M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 2021 (in CHINESE).
- [50] KIM SJ, CHANG J, SINGH M. Peptidoglycan architecture of Gram-positive bacteria by solid-state NMR[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1848: 350-362.