

康昌源,王庆奎,王静波,等. 肉桂醛脂质体对 3 种水产动物致病菌抑菌效果比较[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):176-178.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.044

肉桂醛脂质体对 3 种水产动物致病菌抑菌效果比较

康昌源¹, 王庆奎¹, 王静波², 冯俊超¹

(1. 天津农学院水产学院, 天津 300384; 2. 北京市水产技术推广站, 北京 300380)

摘要:以肉桂醛为对照,比较了肉桂醛脂质体(LEC)对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的抑菌效果。结果表明,LEC 和肉桂醛对 3 种菌均有明显的抑制作用,随着用药浓度的增大,抑菌能力增强。LEC 对副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏菌的最小抑菌浓度(MIC)折合肉桂醛浓度分别为 2.50、1.25、2.50 mg/mL,最小杀菌浓度(MBC)均为 5.00 mg/mL。对照组肉桂醛的 MIC 分别为 7.81、7.81、1.95 mg/mL, MBC 分别为 7.81、15.62、1.95 mg/mL。由于肉桂醛有难溶于水的缺点,因此易溶于水的 LEC 在水产养殖方面具有很好的应用前景。

关键词:肉桂醛;脂质体;副溶血弧菌;哈氏弧菌;迟缓爱德华氏菌;水产动物致病菌;抑菌效果

中图分类号: S941 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0176-03

副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏菌在海水环境中广泛存在,是海水养殖鱼类常见的致病菌^[1-3],其中迟缓爱德华氏菌和副溶血弧菌还是人畜共患菌。目前,对这几种致病菌引起的水产动物相关疾病的防治还主要依赖传统的化学消毒剂、抗生素等^[4-5]。这些药物虽然在动物病害防控方面见效快、效果好,但由于会使致病菌产生耐药性以及污染水环境等明显缺陷,开发安全高效的新产品或新方法已成为水产疾病防控的热点。中草药因其毒副作用小、易降解等特点已成为水产抗病防病的重要研究方向^[6]。

肉桂醛(cinnamaldehyde)别称桂皮醛、桂醛,是樟科植物肉桂的干皮及树皮经水蒸气蒸馏得到的挥发油(肉桂油)中的主要成分,分子式为 C_9H_8O ,在室温下为淡黄色油状物,难溶于水、甘油,易溶于乙醇、乙醚中^[7]。肉桂醛具有在动物体内代谢快、无残留、对养殖环境无污染、病原菌对其不易产生耐药性等优点,被认为是一种新型的绿色、环境友好型饲料添加剂^[8-9]。美国食品和药物管理局(FDA)认为,肉桂醛是一种安全的食品添加剂^[10]。研究发现,肉桂醛对许多细菌、真菌都具有抑杀作用^[11-12],不仅能胁迫杀伤动物体内的致病性大肠杆菌^[13],还能作为防腐剂抑杀食源性致病菌^[14]。肉桂醛难溶于水的特性使其无法直接在水体中应用。将肉桂醛制成脂质体后,可极大提高其在水体中的分散性。目前,肉桂醛脂质体(liposome-encapsulated cinnamaldehyde, LEC)在水产养殖中的研究很少,仅有的 1 篇研究发现用 LEC 药浴攻毒无乳链球菌(*Streptococcus*

agalactiae)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)后的斑马鱼(*Danio rerio*)能显著提高斑马鱼的存活率,并能显著降低攻毒鱼体内的菌落数^[15]。本试验比较 LEC 对副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏菌的体外抑菌效果,为肉桂醛在水产动物疾病防控中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:试验所用副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏菌由本实验室提供。

主要试剂:蛋白胨、牛肉膏、氯化钠、肉桂醛(95%)、无水乙醇,均购自日本岛津公司。

1.2 试验方法

1.2.1 营养肉汤 蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃下高压灭菌 15 min,冷却后用于培养迟缓爱德华氏菌;培养哈氏弧菌和副溶血弧菌的液体培养基在此基础上多加 10 g 海水晶。营养琼脂:在营养肉汤的基础上添加 20 g 的琼脂粉。经活化培养后的菌液用相应的肉汤稀释至 1×10^8 CFU/mL 备用。

1.2.2 肉桂醛脂质体(LEC) 参照 Faikoh 的方法^[15],配比稍有改动,将 40 mg/mL 肉桂醛(95%)、体积分数为 7% 的液体大豆卵磷脂、体积分数 0.5% 的维生素 E 溶解于 5% 乙醇中,在磁力加热搅拌器(Hg-4A)搅拌混匀,混合物用超高压均质机(JN-10C)处理(压力为 400 bar,流速为 10 L/h)3 次,获得肉桂醛脂质化包埋产物 LEC。制备空白脂质体(LE)时,用等量的 5% 乙醇替代肉桂醛。

1.2.3 滤纸片制备 选取吸水性好的优质滤纸(由杭州富阳北木浆纸有限公司提供,型号 102)若干,用打孔器打成直径为 6 mm 的圆形滤纸片,高温高压灭菌后备用。

1.2.4 抑菌圈测定 在洁净工作台(SW-CJ-ZFD)里进行操作,将肉桂醛与 50% 乙醇 1:3 稀释后作为第 1 个浓度,然后用 50% 乙醇不断 2 倍稀释构成共计 5 个浓度,每个滤纸片上完全吸收 5 μ L 相应浓度的药液。吸取 0.1 mL 的菌悬液,

收稿日期:2017-04-13

基金项目:天津市应用基础与前沿技术计划重点项目(编号:15JCZDJC33600、15JCZDJC34000);天津市水产产业技术体系创新团队(编号:ITFRS2017004);天津市种业科技重大专项(编号:16ZXZYN00120)。

作者简介:康昌源(1990—),男,硕士,研究方向为水产养殖。E-mail:1269848980@qq.com。

通信作者:王庆奎,副教授,研究方向为水产养殖。E-mail:wangqk@tjau.edu.cn。

用涂抹棒均匀涂布在相应的琼脂培养基表面,用无菌镊子夹取含有不同浓度肉桂醛溶液的滤纸片,贴在含菌平板上,每个梯度作 3 个滤纸片。于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径,每个抑菌圈在 2 个垂直方向上测量 2 次,取平均值。抑菌效果等级划分参照文献[16]:抑菌直径 < 8 mm 为无抑菌作用;8 ~ 10 mm 为弱抑菌作用;11 ~ 15 mm 为中等抑菌作用;≥16 mm 为强抑菌作用。

1.2.5 最小抑菌浓度 (MIC) 试验^[17] 采用 2 倍稀释法,先将肉桂醛与 50% 乙醇 1 : 3 稀释,构成工作液。将工作液不断 2 倍稀释形成共 10 个梯度用于抑菌研究。取稀释液 0.1 mL 加入到装有 0.8 mL 液体培养基的试管中,再接入 0.1 mL 含菌量为 10⁸ CFU/mL 试验菌的菌悬液,于 28 ℃ 培养 24 h 后,从各管取出 0.1 mL,分别涂布平板,继续培养 24 h 后,观察有无细菌生长,若有菌落生长,记为阳性 (+),若无菌落生长,记为阴性 (-);以无细菌生长的肉桂醛最低浓度为 MIC。以添加 0.1 mL 50% 乙醇不添加肉桂醛成分为阴性对照,以不添加 50% 乙醇和肉桂醛成分的培养基为空白对照,每种处理作 3 个平行。

LEC 的 MIC 研究则将 LEC 作为工作液,用灭菌生理盐水 2 倍稀释共 7 个浓度作用于 3 种致病菌。以添加空白脂质体 (LE) 作为阴性对照,以添加灭菌生理盐水作为空白对照。其他处理同肉桂醛的抑菌操作。

1.2.6 最小杀菌浓度 (MBC) 试验^[18] 在 MIC 的基础上,从无菌生长的试管中取 0.1 mL 培养液加入到 10 mL 液体培养基中,混匀,28 ℃ 继续培养 24 h,再用平板涂布法观察有无细

菌生长,无菌生长的最小浓度即为 MBC。对照组同 MIC 试验,每种处理作 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 肉桂醛和 LEC 的抑菌直径

由图 1 可知,肉桂醛和 LEC 对所选的 3 种菌均有明显的抑制效果,随着肉桂醛浓度增大,抑菌圈直径逐渐增大,抑菌效果更加明显。迟缓爱德华氏菌的抑菌直径比另 2 种菌的抑菌直径在相同肉桂醛浓度下表现更为明显,副溶血弧菌的抑菌直径范围在 3 种菌中跨幅最小。进一步分析可知,在肉桂醛组中,浓度为 15.62 mg/mL 的肉桂醛对副溶血弧菌无抑菌作用,而对哈氏弧菌为弱抑菌作用,对迟缓爱德华氏菌则为中等抑菌作用。肉桂醛浓度为 31.25 mg/mL 时对副溶血弧菌为弱抑菌作用,而对哈氏为中等抑菌作用,对迟缓爱德华氏菌则为强抑菌作用。浓度为 62.50 mg/mL 的肉桂醛对副溶血弧菌表现为中等抑菌作用,而对另 2 种菌则表现为强抑菌作用。肉桂醛浓度在 125.00、250.00 mg/mL 时对 3 种菌都表现出强抑菌作用。

在 LEC 组中,肉桂醛浓度为 2.50、5.00 mg/mL 时对迟缓爱德华氏菌为弱抑菌作用,对副溶血弧菌和哈氏弧菌均无抑菌作用。浓度为 10.00 mg/mL 的肉桂醛对副溶血弧菌和哈氏弧菌为弱抑菌作用,浓度为 20.00 mg/mL 时对这 2 种菌均为中等抑菌作用;而迟缓爱德华氏菌在这 2 个肉桂醛浓度下均表现为中等抑菌作用。当肉桂醛浓度在 40.00 mg/mL 时,肉桂醛对 3 种菌都表现为强抑菌作用。

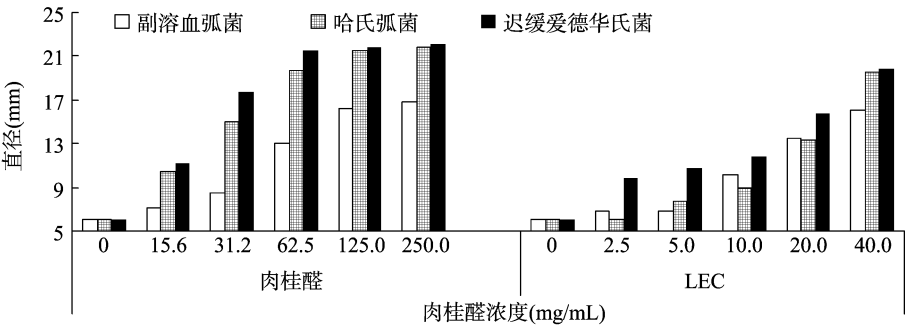


图1 肉桂醛和 LEC 对 3 种菌的抑菌直径

2.2 MIC

由表 1 可知,肉桂醛组 MIC 结果中,肉桂醛浓度为 7.81 mg/mL 时,副溶血弧菌和哈氏弧菌不生长;肉桂醛浓度为 1.95 mg/mL 时,迟缓爱德华氏菌不生长。说明肉桂醛对副溶血弧菌和哈氏弧菌的最小抑菌浓度为 7.81 mg/mL,对迟缓爱德华氏菌的最小抑菌浓度为 1.95 mg/mL。

LEC 组的 MIC 结果 (表 2) 显示,肉桂醛浓度为 2.50 mg/mL 时,副溶血弧菌和迟缓爱德华氏菌不生长;肉桂醛浓度为 1.25 mg/mL 时,哈氏弧菌不生长。说明 LEC 中肉桂醛对副溶血弧菌和迟缓爱德华氏菌的最小抑菌浓度为 2.50 mg/mL,对哈氏弧菌的最小抑菌浓度为 1.25 mg/mL。

2.3 MBC

肉桂醛和 LEC 均能杀灭副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏菌。由图 2 可知,肉桂醛组中,3 种菌对肉桂醛的耐受性不同,哈氏弧菌耐受性最强,最小杀菌浓度为 15.62 mg/mL;

表 1 肉桂醛对 3 种菌的 MIC

肉桂醛浓度 (mg/mL)	副溶血弧菌	哈氏弧菌	迟缓爱德华氏菌
空白对照	+	+	+
阴性对照	+	+	+
0.49	+	+	+
0.98	+	+	+
1.95	+	+	-
3.91	+	+	-
7.81	-	-	-
15.62	-	-	-
31.25	-	-	-
62.50	-	-	-
125.00	-	-	-
250.00	-	-	-

注:“+”表示有菌生长;“-”表示无菌生长。下同。

表 2 LEC 对 3 种菌的 MIC

肉桂醛浓度 (mg/mL)	副溶血弧菌	哈氏弧菌	迟缓爱德华氏菌
空白对照	+	+	+
阴性对照	+	+	+
0.62	+	+	+
1.25	+	-	+
2.50	-	-	-
5.00	-	-	-
10.00	-	-	-
20.00	-	-	-
40.00	-	-	-

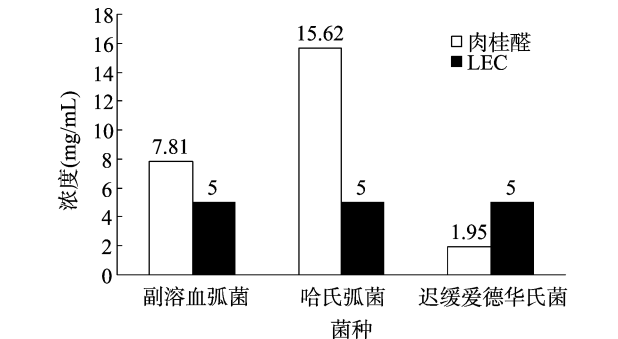


图2 肉桂醛对 3 种菌的 MBC

其次是副溶血弧菌,最小杀菌浓度为 7.81 mg/mL;敏感性相对最强的是迟缓爱德华氏菌,最小杀菌浓度为 1.95 mg/mL。在 LEC 试验组中,肉桂醛对 3 种菌的最小杀菌浓度均为 5 mg/mL。

3 讨论与结论

将肉桂醛经包埋、均质处理制成的脂质体(LEC),具有易溶于水的优良特性。本试验中,LEC 对 3 种致病菌都有显著的抑菌、杀菌作用,这为肉桂醛在水体中的应用提供了有益借鉴,扩大了肉桂醛的应用前景。

研究表明,天然植物精油对生产中的许多致病菌都有很好的抑制作用。本试验中肉桂醛对 3 种革兰氏阴性菌都有抑制作用,这与王帆等对大肠杆菌和绿脓杆菌这 2 种阴性菌的抑菌结果^[19]一致。本试验抑菌直径结果表明,肉桂醛的抑菌效果与其浓度呈正相关,随着浓度的增大,肉桂醛对副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏菌抑菌能力越来越强。研究认为肉桂醛的抑菌作用是由于其具有一定的疏水性,可穿透细胞壁,与细胞膜相互作用,使细胞膜的透性增强^[20]。本研究发现,不同受试菌对肉桂醛和 LEC 敏感性不同,副溶血弧菌在相同肉桂醛浓度下抑菌直径相对较小。与肉桂醛相比,LEC 能使肉桂醛在更低浓度下即能表现出显著的抑菌效果。

对比 LCE 和肉桂醛的 MIC 和 MBC 结果可知,相较于迟缓爱德华氏菌而言,副溶血弧菌和哈氏弧菌对 LEC 表现出更高的敏感性,这可能与弧菌属和爱德华菌属的生物构成差异有关,其抑菌机理有待进一步研究。

LEC 和肉桂醛对副溶血弧菌、哈氏弧菌和迟缓爱德华氏

菌均有明显的抑菌、杀菌作用,且随着用药浓度的增大,抑菌能力增强。LEC 在水体致病菌的防控中具有良好的开发应用前景。

参考文献:

[1] 白方方,兰建新,王 燕,等. 迟缓爱德华氏菌间接 ELISA 快速检测法[J]. 中国水产科学,2009,16(4):619-624.

[2] 陈吉祥,杨 慧,颜显辉,等. 致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测[J]. 中国水产科学,2005,12(5):581-586.

[3] 徐 敏. 副溶血弧菌细胞膜脂肪酸组成的气相色谱研究[J]. 青岛:中国海洋大学,2013.

[4] 宋协法,康萌萌,彭 磊,等. 益生菌对半滑舌鳎养殖水质及仔稚鱼生长的影响研究[J]. 渔业现代化,2011,38(6):30-34.

[5] 高权新,施兆鸿,彭士明. 益生菌在水产养殖中的研究进展[J]. 海洋渔业,2013,35(3):364-371.

[6] 王庆奎,陈成勋,郭永军,等. 7 种中草药对斑点叉尾鲷生理生化指标的影响[J]. 安徽农业科学,2011,39(15):9305-9308.

[7] 冯雅君,李文静,王 鑫,等. 中药桂皮醛对粪肠球菌的抑制作用[J]. 河北医药,2011,33(21):3324-3325.

[8] 张文平,王小丽,黄 真,等. 肉桂醛体外诱导白色念珠菌耐药的实验[J]. 中国临床康复,2006,10(35):148-150.

[9] 孙罗美,邹胜龙. 肉桂醛的研究与应用[J]. 广东饲料,2012,21(12):29-32.

[10] Wei Q Y, Xiong J J, Jiang H, et al. The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 150:164-170.

[11] 薛京昌,徐晓怡,郑海松. 肉桂醛对 4 种常见细菌的体外抑菌试验研究[J]. 检验检疫学刊,2013,23(4):50-53.

[12] 谢小梅,龙 凯,方建茹,等. 肉桂醛、柠檬醛抑制黄曲霉生长机制研究[J]. 中国公共卫生,2007,23(3):301-302.

[13] 王雨琼,勾长龙,付莹莹,等. 植物提取物肉桂醛的抗菌作用及其在动物生产中的应用[J]. 中国兽医杂志,2014,50(3):53-54.

[14] 穆宏磊,邵海燕,陈杭君,等. 肉桂醛复合保鲜剂对南美白对虾贮藏品质的影响[J]. 农业机械学报,2011,42(6):161-166.

[15] Faikoh E N, Hong Y H, Hu S Y. Liposome - encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (Danio rerio) immunity and survival when challenged with Vibrio vulnificus and Streptococcus agalactiae[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1):15-24.

[16] 马玉和,王庆奎,郭永军,等. 5 种中草药对迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌抑菌效果的比较[J]. 饲料工业,2014,35(16):51-54.

[17] 渔用抗菌药物药效试验技术规范:GB/T 27623.1—2011[S].

[18] 中华人民共和国农业部公告第 2017 号附件 5[S]. 2013:59-62.

[19] 王 帆,杨静东,王春梅,等. 肉桂醛对大肠杆菌和绿脓杆菌的作用机制[J]. 江苏农业学报,2011,27(4):888-892.

[20] 张贻彬,刘笑宇,姜萍萍,等. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J]. 现代食品科技,2015,31(5):31-35.