



研究报告

乌梅提取物对溶藻弧菌的抑制效应与机理

展文豪 司梦雅 崔青曼* 袁春莹

天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457

摘要:【背景】溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)能够感染鱼、虾、贝等海洋经济动物,给海水养殖业带来了严重的经济损失,对公众健康及食品安全也构成较大威胁。【目的】通过研究乌梅(*Fructus mume*)对溶藻弧菌的抑菌效应及其机理,为乌梅在水产养殖中的进一步开发利用提供理论依据。

【方法】采用试管二倍稀释法测定乌梅提取物(*Fructus mume* Extract, FME)对溶藻弧菌的最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)和最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC),电导率仪检测溶藻弧菌的相对电导率,分光光度法分析溶藻弧菌的核酸泄露和呼吸链脱氢酶活性及生物膜抑制率,蛋白质电泳检测溶藻弧菌的蛋白质合成情况,扫描电子显微镜观察溶藻弧菌的亚显微结构。【结果】乌梅提取物对溶藻弧菌的 MIC 和 MBC 分别为 1.953 mg/mL 和 3.906 mg/mL;乌梅提取物显著增加了溶藻弧菌的相对电导率和核酸泄露,明显降低了溶藻弧菌蛋白质的合成能力,对于弧菌的亚显微形态产生了较大影响。同时乌梅提取物显著抑制了溶藻弧菌生物膜的形成和呼吸链脱氢酶的活性。【结论】乌梅提取物通过增加溶藻弧菌细胞膜通透性及显著抑制生物膜的生成、呼吸链脱氢酶活性及蛋白质的合成,实现抑制及杀灭溶藻弧菌的目的。

关键词: 乌梅, 溶藻弧菌, 抑菌效应, 膜通透性, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 扫描电子显微镜

Inhibitory effect and mechanism of *Fructus mume* extracts on *Vibrio alginolyticus*

ZHAN Wenhao SI Mengya CUI Qingman* YUAN Chunying

College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Background] *Vibrio alginolyticus* infects fish, shrimp, shellfish, and other economic marine animals, which has brought great economic losses to the mariculture industry and posed a great threat to public health and food safety. [Objective] The study aims to investigate the inhibitory effect of *Fructus mume* on *V. alginolyticus* and the mechanism, which is expected to lay a theoretical basis for the further development and utilization of *F. mume*. [Methods] The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *F. mume* extracts (FME) on *V. alginolyticus* were determined with the tube double dilution method, the relative conductivity of *V. alginolyticus* by a conductivity meter, and the nucleic acid

Foundation items: Tianjin Science and Technology Project (20YFZCSN00140); Innovation Team for Tianjin Modern Agricultural Industry Technical System (ITTMR2021009); National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900400)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60601462; E-mail: cqm80@163.com

Received: 02-03-2021; Accepted: 07-04-2021; Published online: 24-05-2021

基金项目: 天津市科技计划(20YFZCSN00140); 天津市现代农业产业技术体系创新团队(ITTMR2021009); 国家重点研发计划(2020YFD0900400)

*通信作者: Tel: 022-60601462; E-mail: cqm80@163.com

收稿日期: 2021-03-02; 接受日期: 2021-04-07; 网络首发日期: 2021-05-24

leakage, respiratory chain dehydrogenase activity, and biofilm inhibition rate of *V. alginolyticus* by spectrophotometry. The protein synthesis of *V. alginolyticus* was analyzed by electrophoresis, and the submicroscopic structure of it was observed under a scanning electron microscope. **[Results]** The MIC and MBC of FME on *V. alginolyticus* were 1.953 mg/mL and 3.906 mg/mL, respectively. FME significantly increased the relative conductivity and nucleic acid leakage, significantly reduced the protein synthesis, and had great impact on the submicroscopic morphology of *V. alginolyticus*. Meanwhile, FME significantly inhibited the biofilm formation and the respiratory chain dehydrogenase activity of it. **[Conclusion]** The FME could inhibit and even kill *V. alginolyticus* by increasing the membrane permeability, inhibiting the biofilm formation, respiratory chain dehydrogenase activity, and protein synthesis of *V. alginolyticus*.

Keywords: *Fructus mume*, *Vibrio alginolyticus*, antibacterial effect, membrane permeability, polyacrylamide gel electrophoresis, scanning electron microscope

乌梅(*Fructus mume*)又名干枝梅、酸梅,由蔷薇科杏树植物梅(*Prunus mume*)未成熟果实干燥后经烟熏制得^[1]。乌梅入药历史悠久,最早记载于《神农本草经》,具有生津止渴、明目益气等功效。乌梅主要含有机酸、氨基酸、糖类、生物碱、甾醇等,乌梅提取物具有抑菌、抗癌及增强免疫等多种生物学功能^[2-4]。

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为嗜盐革兰氏阴性菌,是海洋环境中的一种条件致病菌,能够感染鱼、虾、贝等海洋经济动物,给海水养殖业带来了严重的经济损失^[5-6]。不仅如此,溶藻弧菌对公众健康及食品安全构成较大威胁,吴晓峰等^[7]指出杭州市市售菲律宾蛤仔中食源性致病菌检出率为 83.33%,主要为溶藻弧菌和铜绿假单胞菌,高璐等^[8]的研究结果也表明贝类样品中存在溶藻弧菌污染问题。水产养殖中抗生素的滥用导致细菌耐药性增加,致使细菌性疾病的防控越来越困难^[9]。中草药与化学药物相比具有绿色低毒、不易产生耐药性等特点。徐晓津等^[10]研究表明乌梅对溶藻弧菌具有良好的抑制作用,但抑制机理不详。本文通过研究乌梅对溶藻弧菌的抑菌作用及其机理,以期对乌梅的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

溶藻弧菌菌株 ATCC 3378 由天津市水产研究

所惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

乌梅提取物(*Fructus mume* Extract, FME)制备:乌梅购自北京同仁堂药店,称取 50 g 乌梅,用粉碎机进行粉碎,加 500 mL 纯水浸泡 2 h,大火煮开,小火煎煮 30 min,用 6 层纱布过滤,滤渣再次加入 500 mL 纯水煎煮 30 min,重复此步骤 2 次,合并 3 次滤液,加热蒸发浓缩至 50 mL,浓缩液浓度为 1 g/mL, 1.2×10^5 Pa 灭菌 20 min 后存放于 4 °C 备用。

酵母提取物、考马斯亮蓝 R-250、丙烯酰胺、结晶紫、彩虹 180 广谱蛋白 Marker,北京索莱宝生物科技有限公司;氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium, TTC),天津光复精细化工研究所;十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS),Sigma 公司。扫描电子显微镜,日立高新技术公司;紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;电导率仪, JENCO 公司;酶标仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

LB 培养基:酵母提取物 5.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,氯化钠 30.0 g/L, pH 7.8。

1.2 方法

1.2.1 最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)和最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

采用试管二倍稀释法测定 FME 对溶藻弧菌(1×10^6 CFU/mL)的 MIC 值。取 15 只无菌试管,编

号 1-15, 每只试管内加入 2 mL 无菌 LB 培养基, 在第一管内加入 1 g/mL 药液 2 mL, 使药液浓度为 500 mg/mL, 振荡摇匀, 然后从 1 号管取 2 mL 加入 2 号管, 向下依次稀释到 13 号管, 14 号、15 号管分别作为阴性对照和阳性对照, 设 3 组重复。最高稀释管中无细菌生长对应的药液浓度即为 FME 对溶藻弧菌的 MIC 值。从无明显细菌生长的各管取出 200 μ L, 分别涂布于无菌 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 平板上无细菌生长的最小药液浓度定为最低杀菌浓度(MBC)。

1.2.2 FME 对溶藻弧菌生长的抑制作用

取处于对数生长期(OD_{600} 约为 1.0)的菌液, 8 000 r/min 离心 10 min, 用 1.2×10^5 Pa 灭菌 PBS (pH 7.4)洗涤 3 次, LB 培养基重悬, 加入 FME 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 不加 FME 的菌悬液为对照组, 每组 3 个重复。将 200 μ L 混合液转入 96 孔板, 30 $^{\circ}$ C 孵育, 600 nm 波长下用酶标仪每隔 2 h 测定一次吸光值, 共孵育 12 h。

1.2.3 相对电导率测定

根据 Diao 等^[11]的方法略做修改。溶藻弧菌在 30 $^{\circ}$ C、60 r/min 培养 12 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 5%葡萄糖溶液洗至菌液的相对电导率与 5%葡萄糖溶液的相对电导率相当, 此菌液作为等渗菌液。5%葡萄糖溶液中加入 FME, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 测其相对电导率记为 L_1 。在等渗菌液中加入 FME, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 不添加 FME 为对照组, 30 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 每 1 h 取出测定相对电导率, 记为 L_2 。将悬于 5%葡萄糖溶液的菌液沸水浴 5 min, 冷却后测定相对电导率记为 L_0 。相对电导率计算公式: 相对电导率(%)=(L_2-L_1)/ $L_0 \times 100$ 。

1.2.4 细菌发酵液中核酸的测定

溶藻弧菌液 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 1.2×10^5 Pa 灭菌 PBS (pH 7.4)冲洗 3 次后重悬于 PBS 溶液中。取 100 mL 菌悬液加入 FME,

使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 不添加 FME 为对照组, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 h, 8 000 r/min 离心 3 min, 取上清液测定 260 nm 波长处的吸光值。

1.2.5 溶藻弧菌蛋白质分析

培养至对数生长期的溶藻弧菌菌体 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 并用 1.2×10^5 Pa 灭菌 PBS (pH 7.4)清洗 3 次, LB 培养基重悬, 加入 FME, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 不添加 FME 为对照组, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 12 h, 8 000 r/min 离心 5 min, 相同体积的 PBS 重悬, 将菌液与上样缓冲液混合煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色过夜后观察拍照。

1.2.6 溶藻弧菌亚显微形态观察

取 10 mL 处于对数生长期(OD_{600} 约为 1.0)菌液, 分别与 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 浓度的 FME 及不添加 FME 为对照组, 30 $^{\circ}$ C 静置孵育 6 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 细菌沉淀用灭菌 PBS 冲洗 2 次, 加入戊二醛溶液, 4 $^{\circ}$ C 固定 12 h, 然后用梯度浓度的酒精溶液(30%、50%、70%、80%、90%、100%)脱水, 干燥后镀金, 扫描电子显微镜观察。

1.2.7 溶藻弧菌生物膜抑制率测定

采用 Kang 等^[12]的方法稍加修改。96 孔板中每个孔加入 180 μ L 的菌悬液, 再加入 20 μ L FME, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 不添加 FME 为对照组, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h。将孔中液体吸出, 并用无菌 PBS 冲洗 2 次, 加入 0.3%的结晶紫溶液 220 μ L, 室温孵育 15 min, 吸出结晶紫溶液, 无菌生理盐水冲洗并风干。用 33%的醋酸水溶液溶解, 15 min 后用酶标仪在 590 nm 测定吸光值, 以 33%的醋酸水溶液为空白对照。

生物膜抑制率(%)=[(对照组 OD_{590} -试验组 OD_{590})/对照组 $OD_{590}] \times 100$

1.2.8 溶藻弧菌呼吸链脱氢酶活性测定

采用 Liu 等^[13]的方法并略微修改。将处于对

数生长期(OD_{600} 约为 1.0)的溶藻弧菌 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 无菌生理盐水洗涤 3 次, 加入生理盐水重悬, 调节菌液浓度为 10^6 CFU/mL, 加入 FME, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC, 不添加 FME 为对照组。取上述菌液 1 mL, 加入 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 8.6) 2 mL、0.1 mol/L 的葡萄糖溶液 2 mL、1 mg/mL 的氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液 2 mL, 30 °C 静置恒温孵育 5 h, 加入 0.5 mL 浓硫酸终止反应, 加入 5 mL 甲苯振荡萃取, 测定有机相的 OD_{490} , 以甲苯为空白对照。

1.3 数据分析

结果以平均值 \pm 标准差表示, 数据使用 SPSS 22.0 软件进行 ANOVA 单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 方法, “**”表示 $P<0.01$, 即有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 FME 对溶藻弧菌的抑制作用

FME 对溶藻弧菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)分别为 1.953 mg/mL 和 3.906 mg/mL。以 MIC 为基础, 设计 4 个 FME 浓度, 探讨其对溶藻弧菌生长的影响, 结果见图 1。1/4 MIC 和 1/2 MIC 浓度的 FME 明显抑制溶藻弧菌的生长, 1 MIC 和 2 MIC 浓度的 FME 完全抑制溶藻弧菌的生长。

2.2 FME 对溶藻弧菌细胞膜通透性的影响

FME 加入溶藻弧菌后发酵液相对电导率的变化结果见图 2, 除对照组外, 随着时间的推移, FME 组发酵液的相对电导率均逐渐增加, 3 h 后增长缓慢, 5 h 后缓慢下降, 而且所有 FME 组发酵液的相对电导率均显著地高于对照组($P<0.01$); 2 MIC 组相对电导率在 4 h 最高, 为 86.6%。

溶藻弧菌细胞膜的损伤可以增加膜通透性, 导致细胞内物质(包括核酸、蛋白质及离子等)的泄漏, 通过测定弧菌发酵液在 260 nm 处的吸光值, 间接评估溶藻弧菌核酸的泄漏情况, 结果如图 3 所示, 与对照组相比, 各 FME 浓度组溶藻弧菌发

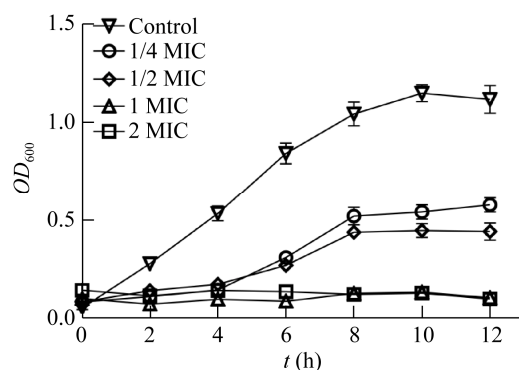


图 1 FME 对溶藻弧菌生长的影响

Figure 1 The effect of FME on the growth of *Vibrio alginolyticus*

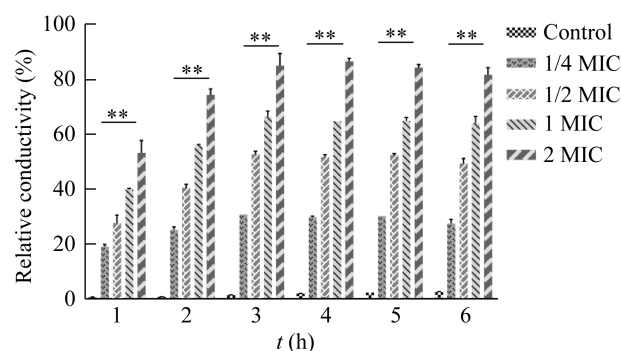


图 2 FME 对溶藻弧菌培养液相对电导率的影响

Figure 2 The effect of FME on the relative conductivity of *Vibrio alginolyticus* culture solution

Note: **: $P<0.01$

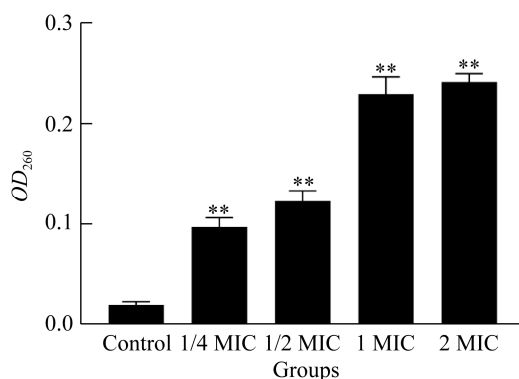


图 3 FME 对溶藻弧菌核酸泄漏的影响

Figure 3 The effect of FME on nucleic acid leakage of *Vibrio alginolyticus*

Note: **: $P<0.01$

酵液的 OD_{260} 均显著高于对照组($P<0.01$), 1 MIC 和 2 MIC 组弧菌的核酸泄漏更为严重, 分别是对照组的 11.483 倍和 12.083 倍。

2.3 FME 对溶藻弧菌蛋白质的影响

SDS-PAGE 电泳图谱结果见图 4。对照组蛋白条带清晰, 条带数目多; 随着 FME 浓度的增加, 溶藻弧菌蛋白的条带数逐渐减少, 而且条带明显变浅或消失, 推测 FME 对溶藻弧菌的蛋白质合成

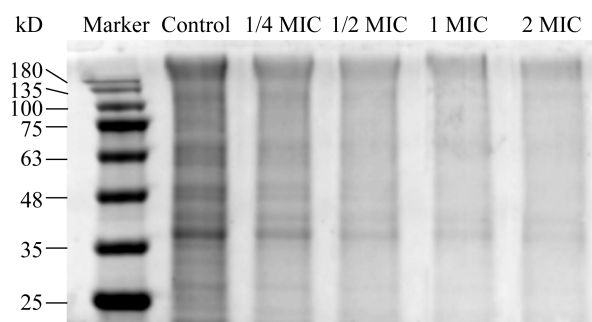


图 4 FME 对溶藻弧菌蛋白质的影响

Figure 4 The effect of FME on the protein of *Vibrio alginolyticus*

有一定的抑制作用, 降低了蛋白总量的表达。同时, 可能是由于细胞膜受到破坏, 导致胞内蛋白质泄漏, 引起蛋白条带的模糊与缺失。

2.4 FME 对溶藻弧菌亚显微形态的影响

用扫描电子显微镜观察不同处理组溶藻弧菌的结果见图 5。对照组的菌体饱满, 未出现破损; FME 组溶藻弧菌出现细胞皱缩、内陷, 细胞膜明显破裂, 随着浓度的增加, 破碎现象更为明显, 甚至出现空洞。FME 显然对溶藻弧菌的细胞膜具有较大的损伤作用。

2.5 FME 对溶藻弧菌生物膜形成的抑制作用

细菌可通过群体感应系统形成生物膜结构, 具有胞间通讯、增加耐药性等作用。由图 6 结果可知, FME 对溶藻弧菌的生物膜产生较好的抑制效果, 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 这 4 组抑制率分别为 42.9%、57.8%、65.3% 和 72.5%。通过组间比较, 发现 1/4 MIC 组生物膜抑制率显著低于其他 3 组($P<0.01$), 1/2 MIC 组抑制率显著低于

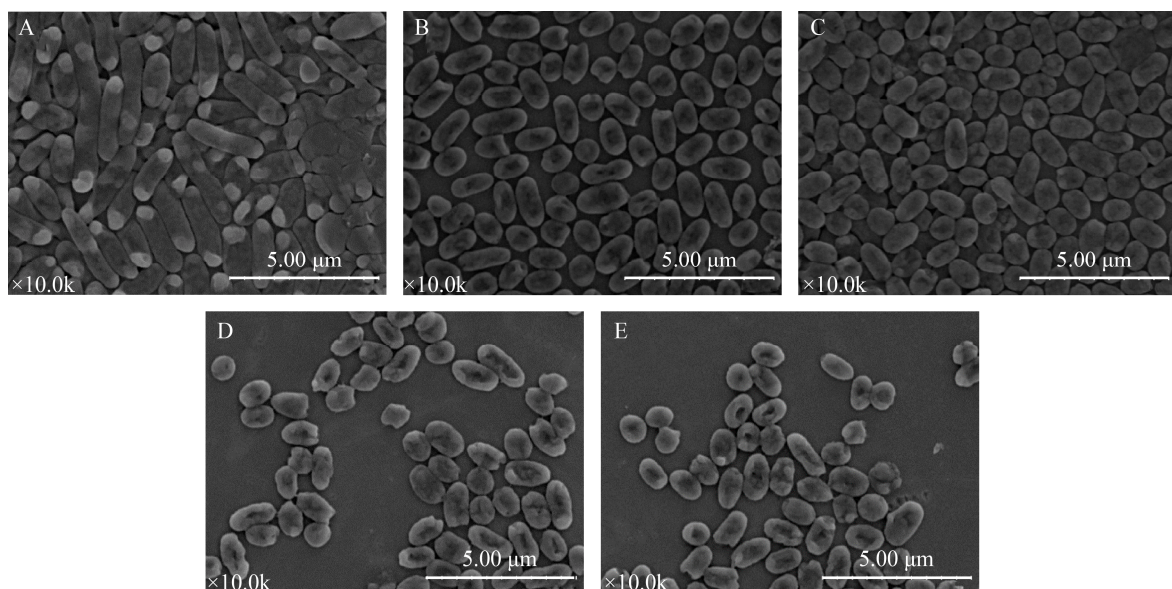


图 5 FME 对溶藻弧菌亚显微形态的影响

Figure 5 The effect of FME on the submorphology of *Vibrio alginolyticus*

注: A、B、C、D、E 分别为对照组、1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 乌梅提取物组溶藻弧菌亚显微形态

Note: A, B, C, D, and E are the submicroscopic morphology of *Vibrio alginolyticus* in the control group, 1/4 MIC, 1/2 MIC, 1 MIC and 2 MIC FME group

1 MIC 和 2 MIC 组($P<0.01$), 1 MIC 和 2 MIC 相比无显著性差异。说明 FME 可以抑制溶藻弧菌生物膜的形成。

2.6 FME 对溶藻弧菌呼吸链脱氢酶活力的影响

TTC 是一种脂溶性光敏复合物, 由于 TTC 的分子足够小, 可以自由地穿过细胞膜, 进入细胞后, 通过呼吸链脱氢酶, 无色的 TTC 被还原为红色的三苯基甲(Triphenylformazan, TF)^[14]。TF 在波长 490 nm 处具有最大吸收峰, 通过测定 TF 在 490 nm 处的吸光值可反映呼吸链脱氢酶的活性。结果如图 7 所示, 与对照组相比, FME 显著降

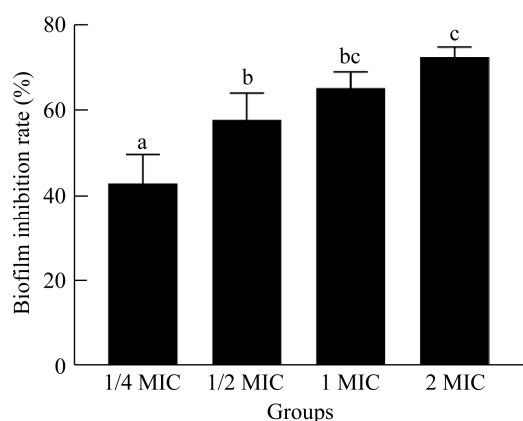


图 6 FME 对溶藻弧菌生物膜的抑制效果

Figure 6 The inhibitory effect of FME on *Vibrio alginolyticus* biofilm

注: 不同字母表示显著性差异($P<0.01$)

Note: Different letters indicate significant differences ($P<0.01$)

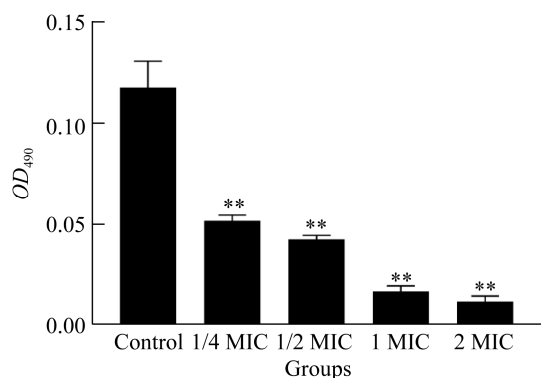


图 7 FME 对溶藻弧菌呼吸链脱氢酶的影响

Figure 7 The effect of FME on the respiratory chain dehydrogenase of *Vibrio alginolyticus*

Note: **: $P<0.01$

低了溶藻弧菌的呼吸链脱氢酶活性($P<0.01$), 4 个 FME 组呼吸链脱氢酶活性较对照组分别降低了 55.93%、63.84%、85.59%和 89.83%, 推测 FME 通过降低溶藻弧菌的呼吸链脱氢酶活性起到抑制其生长的作用。

3 讨论与结论

乌梅提取物具有广泛的抑菌效果。沈红梅等^[15]发现乌梅水提取物对痢疾杆菌、绿脓杆菌等 6 种肠道致病菌具有抑制作用; 刘梦茵等^[16]通过研究发现乌梅醇提物对类芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、荧光假单胞菌等具有较好的抑制作用; 乌梅提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌和白假丝酵母菌的抗菌活性明显^[17]; 乌梅提取物对李斯特菌也具有较好的抑制效果, 最小抑菌浓度为 0.625 mg/mL^[18]; 乌梅提取物对溶藻弧菌也有良好的抑制作用, 抑菌圈直径达 29.46 mm^[10]。本研究也得到类似的结果, 乌梅提取物对溶藻弧菌同样具有较强的抑制作用, 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)分别为 1.953 mg/mL 和 3.906 mg/mL。

如果抗菌剂损害了细菌细胞膜, 细胞内的成分, 包括蛋白质、离子和核苷酸就会泄露, 细菌电导率也会发生变化^[19-20]。周茜等^[21]研究发现乌梅醇提取物明显增加了金黄色葡萄球菌细胞壁、细胞膜的通透性, 培养液中核酸分子、 Ca^{2+} 含量增加。我们通过研究发现, 乌梅提取物对溶藻弧菌的相对电导率、核酸泄漏均具有显著的增加作用, 对于蛋白质合成具有明显的抑制作用。扫描电镜观察发现, 经乌梅提取物处理后, 溶藻弧菌出现细胞皱缩、甚至破裂, 这也验证了乌梅提取物对溶藻弧菌细胞膜通透性具有增加作用。

生物膜可以保护微生物种群免受恶劣环境、抗菌治疗及噬菌体和变形虫的捕食。细菌的呼吸链失活意味着氧化磷酸化失活, 从而导致细菌因生长缺乏能量而死亡。薄晓玮等^[22]发现乌梅醇提物强烈地抑制金黄色葡萄球菌的生物膜形成, 最

高可达 74%。Liu 等^[13]研究结果表明芳樟醇可通过降低铜绿假单胞菌的呼吸链脱氢酶活力抑制其生长。本研究表明, 乌梅提取物对溶藻弧菌生物膜的形成具有显著的抑制作用, 同时还对呼吸链脱氢酶的活性有显著的抑制效果。

综上所述, 乌梅提取物通过增加溶藻弧菌细胞膜通透性及显著抑制生物膜的生成、呼吸链脱氢酶活性及蛋白质的合成, 实现抑制及杀灭溶藻弧菌的目的。

REFERENCES

- [1] Ruan YM. Review of the chemical components and pharmacological effects of *Fructus mume*[J]. Chinese Journal of Medicinal Guide, 2008, 10(5): 793-794 (in Chinese)
阮毅铭. 乌梅的化学成份及药理作用概述[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(5): 793-794
- [2] Zhang DD, Jiang XT. Extraction and antibacterial activity of *Fructus mume* organic acids[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, 16(3): 47-52 (in Chinese)
张丹丹, 姜修婷. 乌梅有机酸的提取工艺及其抑菌活性[J]. 生物加工过程, 2018, 16(3): 47-52
- [3] Wang ZY, Sun YG, Wang L, Ma ZY, Han G. Research progress on pharmacological activity of *Fructus mume*[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2015, 19(19): 200-202 (in Chinese)
王智云, 孙玉刚, 王麟, 马正云, 韩刚. 乌梅的药理活性研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(19): 200-202
- [4] Bailly C. Anticancer properties of *Prunus mume* extracts (Chinese plum, Japanese apricot)[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 246: 112215
- [5] Wang FQ, Sun YZ, Ren LH, Jiang XY, Jiang F, Cui YM, Liu LJ. Research progress on the main pathogenic *Vibrio* affecting aquatic animals in mariculture[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2018, 8(2): 49-56 (in Chinese)
王凤青, 孙玉增, 任利华, 姜向阳, 姜芳, 崔艳梅, 刘丽娟. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(2): 49-56
- [6] Zeng FY, Su ZH, Zhou SH, Xie M, Pang HY. Prokaryotic expression of the PEPCK protein of *Vibrio alginolyticus* and identification of its acetylation and succinylation[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(6): 8-15 (in Chinese)
曾福源, 苏泽辉, 周诗慧, 谢妙, 庞欢瑛. 溶藻弧菌 PEPCK 蛋白原核表达及其乙酰化、琥珀酰化修饰的鉴定[J]. 生物技术通报, 2021, 37(6): 8-15
- [7] Wu XF, Bao SW, Zhou ZH, Huang SY, Jin Y. Investigation on hygiene status of *R. philippinarum* sold in Hangzhou[J]. Journal of Preventive Medicine, 2019, 31(9): 943-945, 949 (in Chinese)
吴晓峰, 鲍思雯, 周正豪, 黄思源, 金燕. 杭州市市售菲律宾蛤仔卫生状况调查[J]. 预防医学, 2019, 31(9): 943-945, 949
- [8] Gao L, Tao XY, Chen JC, Rao SQ, Fang WM, Yang ZQ. Distribution of *Vibrio alginolyticus* in aquatic products in Jiangsu Province[J]. Journal of Microbiology, 2015, 35(6): 82-85 (in Chinese)
高璐, 陶晓雅, 陈峻琛, 饶胜其, 方维明, 杨振泉. 江苏省水产品中溶藻弧菌分布情况[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(6): 82-85
- [9] Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(3/4): 310-317
- [10] Xu XJ, Li XH, Ma YF, Li HY, Qi X, Chen YN, Lu HL, Yan QP. *In vitro* bacteriostasis of 49 kinds of Chinese herbs, antibiotics and their compound prescriptions against *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(6): 30-38 (in Chinese)
徐晓津, 李秀华, 马一帆, 李慧耀, 祁欣, 陈郁浓, 吕海龙, 鄢庆彬. 49 味中药及其复方与抗生素对溶藻弧菌的体外抑菌作用[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(6): 30-38
- [11] Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)[J]. Food Control, 2014, 35(1): 109-116
- [12] Kang JM, Liu L, Liu MH, Wu XX, Li JK. Antibacterial activity of gallic acid against *Shigella flexneri* and its effect on biofilm formation by repressing *mdoH* gene expression[J]. Food Control, 2018, 94: 147-154
- [13] Liu X, Cai JX, Chen HM, Zhong QP, Hou YQ, Chen WJ, Chen WX. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 141: 103980
- [14] Richter AK, Frossard E, Brunner I. Polyphenols in the woody roots of Norway spruce and European beech reduce TTC[J]. Tree Physiology, 2007, 27(1): 155-160
- [15] Shen HM, Qiao CZ, Su ZW, Li CH. Effects of harvesting, processing and plant origin on the bacteriostasis of *Fructus mume*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1994(8): 24-27 (in Chinese)
沈红梅, 乔传卓, 苏中武, 李承祜. 采收、加工、植物基原对乌梅抑菌作用的影响[J]. 中药材, 1994(8): 24-27
- [16] Liu MY, Liu F, Zhou T, Zhu YZ, Xu WM. Anti-*Bacillus cereus* mechanisms of *Fructus mume* extract[J]. Food Science, 2012(1): 103-105 (in Chinese)
刘梦茵, 刘芳, 周涛, 诸永志, 徐为民. 乌梅提取物对蜡状芽孢杆菌的抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2012(1):

- 103-105
- [17] Song B, Liu T, Lv LY, Zhao D, Jiang RX, Xia ML, Tong YY. The antibacterial activities of *Sophora*, *Scutellaria* and *Ume* on *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Candida albicans*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(6): 507-508,513 (in Chinese)
宋波, 刘颀, 吕丽艳, 赵丹, 蒋瑞雪, 夏美玲, 佟玉瑶. 苦参、黄芩、乌梅对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和白假丝酵母菌抗菌活性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(6): 507-508,513
- [18] Geng F, Wang W, Zhou T. Antibacterial mechanisms of fructus mume extract against *Listeria innocua*[J]. Food Science, 2011(15): 88-93 (in Chinese)
耿飞, 王伟, 周涛. 乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2011(15): 88-93
- [19] Devi KP, Nisha SA, Ravi S, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130: 107-115
- [20] Liu H, Wang Y, Cao JJ, Jiang HY, Yao JJ, Gong GL, Chen XF, Xu WS, He XX. Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*[J]. Aquaculture, 2020, 515: 734578
- [21] Zhou Q, Wang WL, Guo XX, Yang G, Zhao W. Antibacterial effect of *Fructus mume* ethanol extracts on *Staphylococcus aureus*[J]. Food Research and Development, 2016, 37(15): 34-37 (in Chinese)
周茜, 王唯霖, 郭晓晓, 杨光, 赵文. 乌梅醇提物对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(15): 34-37
- [22] Bo XW, Yang ZP, Qi GH. Optimization of extraction conditions of organic acids from *Prunus mume* and its inhibition on biofilm formation[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(13): 118-122 (in Chinese)
薄晓玮, 杨志萍, 綦国红. 乌梅有机酸提取条件优化及其对生物膜形成的抑制作用[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(13): 118-122