

## 研究报告

## 植物精油对大菱鲆弧菌的体外和体内抗菌活性

崔惠敬<sup>1</sup> 孟玉霞<sup>1</sup> 徐永平<sup>2</sup> 赵前程<sup>1</sup> 姜龙<sup>1</sup> 马永生<sup>1\*</sup>

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院 辽宁 大连 116023)

(2. 大连理工大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116024)

**摘要:**【目的】研究天然植物精油对大菱鲆弧菌的体外和体内抗菌活性。【方法】采用纸片扩散法和微量肉汤稀释法对 14 种植物精油或其组分的体外抑菌活性进行检测;通过细菌形态透射电镜观察、胞内乳酸脱氢酶及核酸释放研究山苍子精油对大菱鲆弧菌的膜损伤作用;采用大菱鲆人工攻毒感染实验研究山苍子精油的体内抗菌作用。【结果】14 种植物精油或其组分对大菱鲆弧菌具有不同程度的抑制效果,其中肉桂醛的抗菌活性最强,最低抑菌浓度为 0.25  $\mu\text{L/mL}$ ;百里香酚、丁香酚、柠檬醛和山苍子的抗菌活性次之,最低抑菌浓度为 0.5  $\mu\text{L/mL}$ ;山苍子精油可破坏大菱鲆弧菌的细胞膜,并导致胞内蛋白酶和核酸外泄;经 200  $\mu\text{L/L}$  山苍子精油浸浴后,大菱鲆攻毒后死亡率由对照组 50%降至 0。【结论】富含芳香醛、芳香酚和柠檬醛的植物精油对大菱鲆弧菌具有良好抗菌活性,有望替代抗生素用于大菱鲆弧菌病的防治。

**关键词:** 大菱鲆, 大菱鲆弧菌, 植物精油, 抗菌活性

*In vitro and in vivo antibacterial activity of essential oils against  
Vibrio scophthalmi isolated from farmed turbot Scophthalmus maximus*

CUI Hui-Jing<sup>1</sup> MENG Yu-Xia<sup>1</sup> XU Yong-Ping<sup>2</sup> ZHAO Qian-Cheng<sup>1</sup>  
JIANG Long<sup>1</sup> MA Yong-Sheng<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

**Abstract:** [Objective] To evaluate the antibacterial activity of essential oils against *Vibrio scophthalmi* HZ-C1 isolated from farmed turbot *Scophthalmus maximus* *in vitro* and *in vivo*. [Methods] The paper disc diffusion method and microbroth dilution technique were employed to determine the antibacterial activity of 14 essential oils. Cell membrane disruption induced by *Litsea cubeba* oil was examined by transmission electron microscopy (TEM), and by measuring the release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) and 260 nm absorbing material. Meanwhile, antibacterial activity of *Litsea cubeba* oil *in vivo* was investigated using a turbot model of vibriosis.

**Foundation item:** Doctoral Research Fund of Liaoning Province (No. 20131010); Key Technologies R&D Program of China (No. 2015BAD16B08)

\*Corresponding author: Tel: 86-411-84763557; E-mail: mayo@dlou.edu.cn

Received: September 13, 2016; Accepted: November 25, 2016; Published online (www.cnki.net): December 05, 2016  
基金项目: 辽宁省博士启动基金项目(No. 20131010); 国家科技支撑计划项目(No. 2015BAD16B08)

\*通讯作者: Tel: 86-411-84763557; E-mail: mayo@dlou.edu.cn

收稿日期: 2016-09-13; 接受日期: 2016-11-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-12-05

by intraperitoneal injection. **[Results]** The 14 essential oils showed different antibacterial activities against *V. scophthalmi* HZ-C1, and cinnamaldehyde had the highest activity with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.25  $\mu\text{L/mL}$ , followed by thymol, eugenol, citral and *Litsea cubeba* oil with a MIC of 0.5  $\mu\text{L/mL}$ . *Litsea cubeba* oil can disrupt the plasma membrane of *V. scophthalmi* HZ-C1 and cause the leakage of protease and nucleic acid. After immersing in a bath containing 200  $\mu\text{L/L}$  *Litsea cubeba* oil, the mortality of turbot infected by *V. scophthalmi* was reduced from 50% to 0. **[Conclusion]** Essential oils rich in aromatic aldehyde, phenolic compounds and citral show high antibacterial activities against *V. scophthalmi* HZ-C1, and thus have the potential to replace the use of antibiotics for treating vibriosis in farmed turbot.

**Keywords:** *Scophthalmus maximus*, *Vibrio scophthalmi*, Essential oils, Antibacterial activity

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)俗称“多宝鱼”, 自从 1992 年由英国引入我国后, 大菱鲆的养殖规模和产量逐年扩大, 目前已成为我国海水养殖鱼类产量最大的品种<sup>[1]</sup>。但随着高密度工厂化养殖的迅速发展, 病害问题日趋严重, 严重制约了大菱鲆养殖产业的持续健康发展。细菌性疾病对养殖大菱鲆危害最为严重, 其中弧菌属细菌为主要病原之一<sup>[2]</sup>, 如哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)<sup>[3]</sup>、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)<sup>[4]</sup>和大菱鲆弧菌(*V. scophthalmi*)<sup>[5]</sup>等。目前对弧菌的控制主要依赖于抗生素和消毒剂等化学药物, 但由此会带来养殖水体污染及海产品中药物残留问题。因此, 随着人们对海产品质量安全要求的日益提高, 迫切需要寻求一种高效安全的天然抗菌剂用于养殖大菱鲆细菌性病害的防控, 以期从源头解决养殖大菱鲆中药物残留问题。

植物精油(Essential oils)也称作植物挥发油, 是从芳香植物中提取的具有挥发性和浓郁香味的脂溶性天然化合物, 具有多种生物学活性, 如抗菌、抗氧化及杀虫等。鉴于植物精油的高效抗菌活性, 近年来被视为潜在的抗生素替代品并用于防治水产动物细菌性疾病。如利用肉桂精油和柠檬草精油防治罗非鱼链球菌病(*Streptococcus*)<sup>[6]</sup>; 利用牛至精油控制斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染<sup>[7]</sup>以及利用印度苦楝(*Azadirachta indica*)精油防治鲑鱼杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)感染<sup>[8]</sup>等。

大菱鲆弧菌(*V. scophthalmi*)是最早由西班牙学者<sup>[9]</sup>从养殖大菱鲆幼苗肠道中分离并鉴定为弧菌属的一个新种, 早期研究认为该菌为健康大菱

鲆肠道中的优势菌群<sup>[10]</sup>, 且对大菱鲆具有宿主特异性。不过后续从患病牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[11]</sup>、大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)<sup>[12]</sup>及死亡的蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)肾脏中<sup>[13]</sup>也分离出该菌。最近韩国学者研究证实大菱鲆弧菌是一种条件致病菌<sup>[11]</sup>, 易感染养殖牙鲆, 某些养殖场病鱼样本中大菱鲆弧菌的分离率高达 60.1%<sup>[14]</sup>。国内有研究认为大菱鲆弧菌可能是大菱鲆腹水症和白便的潜在病原之一<sup>[5]</sup>, 本实验室前期也从大连地区某养殖场患病大菱鲆肠道内分离出一株大菱鲆弧菌, 并发现其对大菱鲆具有较强致病性且对抗生素存在多重耐药性。基于此, 本研究拟通过体外和体内实验研究天然植物精油对大菱鲆弧菌的抗菌活性, 期望为海水养殖鱼类弧菌病防治提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大菱鲆购自辽宁省大连市天正实业有限公司; 大菱鲆弧菌 HZ-C1 株为本实验前期分离并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

主要试剂和仪器: 柠檬草及花椒精油由本实验室通过水蒸气蒸馏法提取获得, 孜然、薄荷、山苍子、大蒜、八角、甜橙、柠檬醛、陈皮及柠檬精油购自江西省吉安市中香天然植物有限公司; 肉桂醛购自上海生物工程股份有限公司; 百里香酚和丁香酚购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乳酸脱氢酶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 酶标仪(Bioteck Synergy H<sub>1</sub>/H<sub>1</sub>M)为美国伯腾仪器有限公司生产; 透射电镜 JEM-1200EX 为日本电子株式

会社生产; Leica DMI3000B 倒置荧光显微镜为 Leica 微系统股份有限公司生产。

## 1.2 方法

**1.2.1 植物精油提取:** 采用水蒸气蒸馏法提取花椒与柠檬草精油, 称取 20 g 经研磨后的粉末原料, 装入放有沸石的 1 L 圆底烧瓶中, 加入 300 mL 蒸馏水, 加热蒸馏 2 h, 冷却后收集上层淡黄色油状液体, 经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水后避光保存。购买的孜然、薄荷、山苍子、大蒜等精油用同样方法蒸馏提纯一次。抗菌实验前精油用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2 植物精油或其组分抑菌圈测定:** 参照 Stefanakis 等<sup>[15]</sup>法, 采用纸片扩散法检测 14 种植物精油或其组分对大菱鲆弧菌的抑菌效果。简述之, 取振荡培养过夜的大菱鲆弧菌菌液, 用 2216E 液体培养基<sup>[16]</sup>稀释至  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 用无菌棉签蘸取菌液, 均匀涂布于 2216E 琼脂培养基表面。待平板上的水分被琼脂完全吸收, 取无菌滤纸片, 滴加 2  $\mu\text{L}$  精油后, 将纸片贴在平板表面。在恒温培养箱中 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后, 测量抑菌圈直径, 实验重复 3 次, 计算平均值。

**1.2.3 植物精油或其组分对大菱鲆弧菌最低抑菌浓度测定:** 以 Othman 等<sup>[17]</sup>方法为参照, 采用微量肉汤稀释法测定植物精油或其组分的最低抑菌浓度, 简述如下, 将溶解于无水乙醇的精油用 2216E 培养基稀释至 8、4、2、1、0.5、0.25 和 0.125  $\mu\text{L/mL}$ , 再依次加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 每个

$$\text{LDH 释放率}(\%) = \frac{\text{精油处理后菌体细胞 LDH 释放时吸光度} - \text{对照菌体吸光度}}{\text{菌体细胞中 LDH 完全释放时吸光度} - \text{对照菌体吸光度}} \times 100。$$

**1.2.6 体内抗菌保护实验:** 将大菱鲆弧菌接种于 2216E 液体培养基中, 25  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养过夜。将菌液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 $\times g$  离心 10 min, 弃上清液, 加入同体积无菌生理盐水洗涤两遍, 再用无菌生理盐水重悬, 并将菌液稀释至设定浓度备用。平均体重约为 50 g/尾的健康大菱鲆购自大连天正实业有限公司, 暂养 1 周后进行实验; 养殖过程中水温控制在  $18 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ , 每日喂食 2 次, 换水 1 次。实验时将大菱鲆随机分为 3 组, 每组 10 尾;

浓度梯度设置 3 个平行, 另设不含精油的为空白对照组, 并设 8  $\mu\text{L/mL}$  乙醇为溶剂对照组。再取经振荡培养过夜的大菱鲆弧菌, 将菌液用 2216E 培养基稀释至  $2 \times 10^6$  CFU/mL, 转入前述含精油培养基的 96 孔板中, 每孔加 100  $\mu\text{L}$ ; 将 96 孔板置入酶标仪中, 在 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下振荡培养, 每隔 30 min 自动检测一次 600 nm 处吸光值( $OD_{600}$ ), 连续测定 20 h, 绘制细菌生长曲线, 最低抑菌浓度定义为完全抑制细菌生长时的最低精油浓度。

**1.2.4 细菌形态电镜观察:** 将山苍子精油加入大菱鲆弧菌过夜培养物中至终浓度为 2  $\mu\text{L/mL}$ , 置恒温培养箱中 25  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 1 h。将处理前后的菌液用铜网捞取后晾干, 再用 2.5% (质量体积比) 磷钨酸负染约 3 min, 通风橱中晾干后, 置于透射电镜下观察菌体形态。

**1.2.5 胞外乳酸脱氢酶和紫外吸收物质的测定:** 将山苍子精油加入大菱鲆弧菌过夜培养物中至终浓度为 0.5  $\mu\text{L/mL}$ , 25  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡孵育, 分别于 5、10、20、30、60、90、120、180 min 各取 1 mL 菌液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$  离心 10 min, 取上清液, 再分别测定上清中乳酸脱氢酶(LDH)活力和 260 nm 处吸光值, 其中 LDH 酶活测定按试剂盒提供方法进行; 实验以未被精油处理的菌体细胞作为对照。为获得细菌胞内 LDH 的全部释放量, 将菌液在功率 50 W、工作时间 5 s、间隔时间 5 s、连续 90 次超声。LDH 相对释放量计算公式如下:

攻毒组(2 组)大菱鲆每尾腹腔注射 50  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌液, 攻毒后立即将大菱鲆置于含 200  $\mu\text{L/L}$  精油的海水中浸浴 3 min, 每日浸浴 1 次, 连续处理 3 d, 同时设不含精油的海水浸浴作为对照; 另设空白对照组, 每尾注射 50  $\mu\text{L}$  无菌生理盐水, 随后同样进行精油浸浴处理, 连续 20 d 记录发病及死亡情况。

**1.2.7 大菱鲆组织切片观察:** 取大菱鲆肝脏和肠道组织(幽门盲囊与直肠间的肠段中部), 用 10% 福尔

马林溶液进行固定,经乙醇脱水、石蜡包埋、切片、烘干、HE 染色以及封片后在光学显微镜下观察并拍照。

1.3 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析。实验数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,大菱鲃各组间死亡率采用 Fish 精确检验法进行统计分析, $P<0.05$  表示统计学差异显著。

2 结果与分析

2.1 植物精油对大菱鲃弧菌的抑菌效果

首先通过纸片扩散法初步检测 14 种植物精油或其组分对大菱鲃弧菌的抗菌活性,结果如表 1 所示,可见不同精油之间的抗菌活性存在明显差异,其中肉桂醛和百里香酚的抗菌活性最强;丁香酚、孜然、柠檬醛、柠檬草及山苍子精油的抗菌活性次之;甜橙、八角、花椒和薄荷抗菌活性较弱,而大蒜、陈皮及柠檬精油未呈现明显抑菌圈。

纸片扩散法的优点在于能够方便快捷的对精

油抗菌活性进行筛选,且与牛津杯法和琼脂打孔法相比实验重复性更好<sup>[17]</sup>。然而,纸片扩散法产生的抑菌圈大小除与精油或其组分抗菌活性相关外,还受精油组分的极性及其在琼脂中的扩散性质影响,因此还需进一步通过肉汤稀释法对其抗菌活性进行定量检测。

2.2 植物精油或其组分最低抑菌浓度(MIC)的测定

通过纸片扩散法我们初筛出对大菱鲃弧菌具有抗菌活性的精油,在此基础上,采用微量肉汤稀释法进一步对肉桂醛、百里香酚、丁香酚、孜然、柠檬醛、柠檬草和山苍子 7 种精油或其组分的 MIC 进行测定,结果如图 1 所示。可见 7 种精油均能明显抑制大菱鲃弧菌的生长,且抑菌作用随着精油浓度增加而增强。溶剂乙醇在最大浓度 4  $\mu\text{L/mL}$  时对大菱鲃弧菌生长无影响。在本实验中,MIC 定义为在培养时间为 20 h 时,细菌生长被完全抑制时的最低精油浓度。由此可见,肉桂醛抑菌效果最好,MIC 为 0.25  $\mu\text{L/mL}$ ;其次为百里香酚、丁香酚、柠檬醛和山苍子精油,MIC 为 0.5  $\mu\text{L/mL}$ ;孜然和柠檬草精油的 MIC 则为 1  $\mu\text{L/mL}$ ,这与上述纸片扩散法所得数据基本一致。

本研究中的山苍子精油提取自樟科、木姜子属植物山苍子的果实,为我国特有且生产规模最大的天然香料,也是富含柠檬醛精油产品中最主要的品种之一<sup>[18]</sup>。在本研究中对大菱鲃弧菌显示很强抗菌活性,且对养殖大菱鲃本身毒性较弱,因此被选用于后续的体内抗菌实验。

2.3 山苍子精油的抗菌机理研究

在山苍子精油抗菌活性明确的基础上,我们进一步通过透射电镜观察、胞内乳酸脱氢酶和核酸的释放检测来探究山苍子精油对大菱鲃弧菌的膜损伤作用,期望初步阐明其抗菌作用途径。透射电镜观察显示精油处理前大菱鲃弧菌呈短杆状,弧形,细胞完整,表面光滑(图 2A),经 2  $\mu\text{L/mL}$  山苍子精油处理后,大菱鲃弧菌体积膨胀,细胞膜出现破裂,胞内物外泄,细胞空泡化(图 2B)。

表 1 精油或其组分对大菱鲃弧菌 HZ-C1 的抗菌活性  
Table 1 Antibacterial activity of selected essential oils (EOs) or components against *V. scophthalmi* HZ-C1

植物精油或其组分 EOs or components	抑菌圈 Zone diameters (mm)
肉桂醛 Cinnamaldehyde	27.5±2.2
丁香酚 Eugenol	15.9±1.8
百里香酚 Thymol	27.4±4.5
孜然 <i>Cuminum cyminum</i>	17.0±4.4
柠檬醛 Citral	17.5±2.2
柠檬草 <i>Cymbopogon citratus</i>	15.4±4.9
山苍子 <i>Litsea cubeba</i>	19.2±3.0
薄荷 <i>Mentha haplocalyx</i>	8.2±0.4
八角 <i>Illicium verum</i>	8.0±0.7
花椒 <i>Zanthoxylum bungeanum</i>	6.9±0.2
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	6.7±1.2
陈皮 <i>Citri pericarpium reticulatae</i>	6.0±0.0
柠檬 <i>Citrus limon</i>	6.0±0.0
大蒜 <i>Allium sativum</i>	6.0±0.0

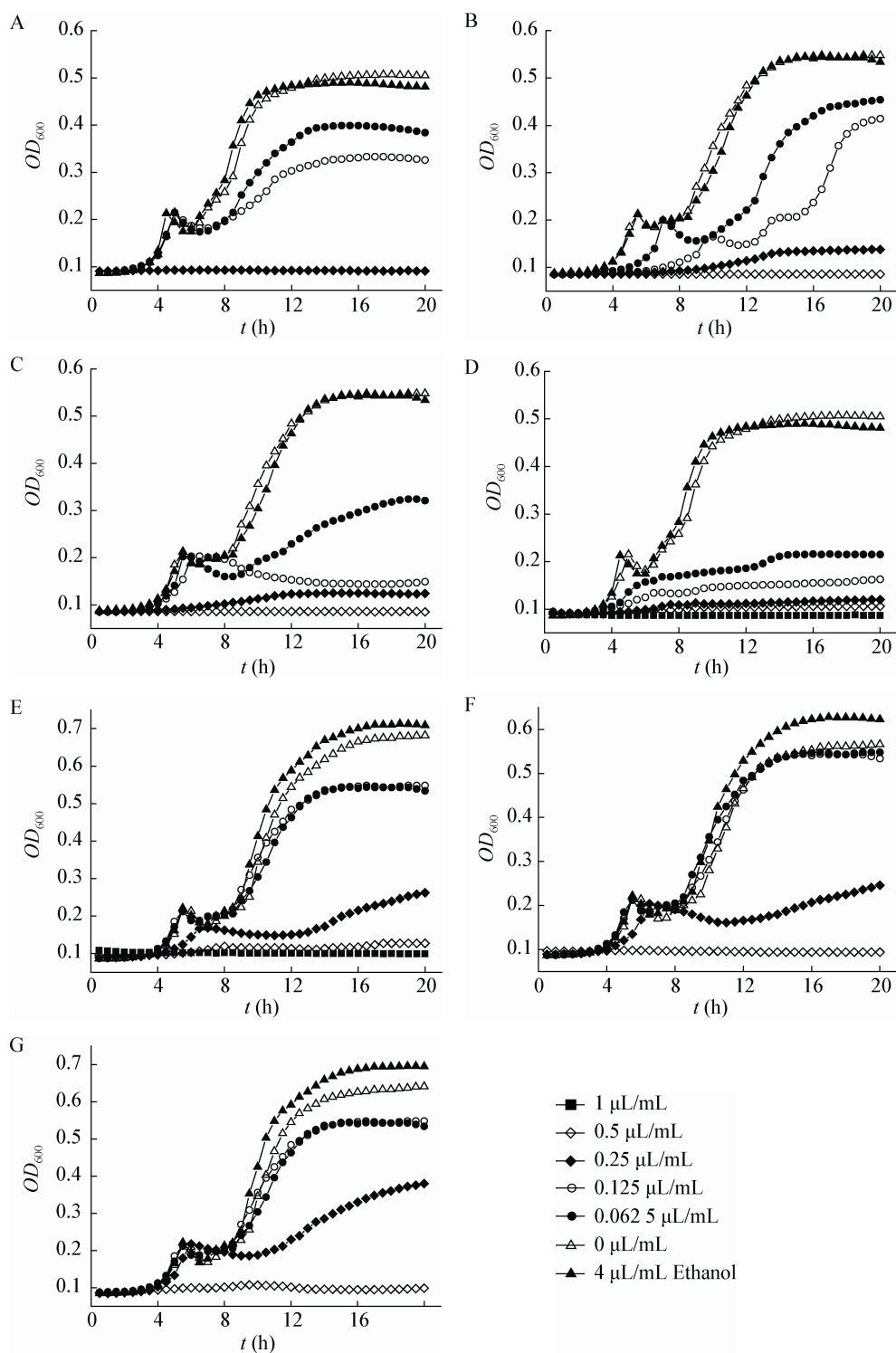


图 1 植物精油或其组分对大菱鲂弧菌 HZ-C1 的抑菌曲线

Figure 1 Antibacterial kinetic curves of essential oils against *V. scopthalmi* HZ-C1

注：A：肉桂醛；B：丁香酚；C：百里香酚；D：孜然；E：柠檬草；F：柠檬醛；G：山苍子。

Note: A: Cinnamylaldehyde; B: Eugenol; C: Thymol; D: *Cuminum cyminum*; E: *Cymbopogon citratus*; F: Citral; G: *Litsea cubeba*.

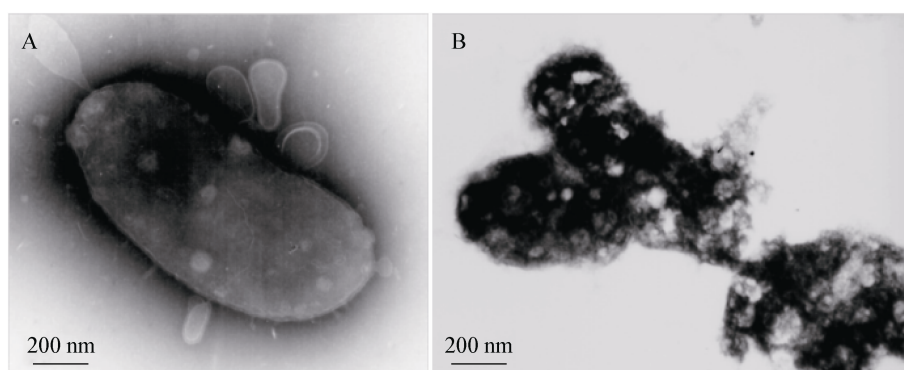


图2 大菱鲆弧菌 HZ-C1 (A)及其被山苍子精油处理后(B)透射电镜照片

Figure 2 Transmission electron micrographs of *V. scophthalmi* HZ-C1 untreated cells (A) and after treatment with *Litsea cubeba* oil (B)

乳酸脱氢酶存在于细菌胞质中,参与糖酵解代谢,在膜损伤时会外泄至胞外,由图3显示,经山苍子精油处理后,大菱鲆弧菌胞外乳酸脱氢酶活力逐渐上升,2 h后活力上升明显,3 h时乳酸脱氢酶释放量达90%以上,表明细胞膜受损。胞外紫外吸收物质表现出同样趋势(图4),处理后10 min 即有紫外吸收物质明显释放,随后逐渐上升,60 min 后趋于平稳,此结果也从另一角度证实了山苍子精油对大菱鲆弧菌的膜损伤作用。

#### 2.4 体内攻毒保护实验

选取山苍子精油进行体内攻毒保护试验,健康大菱鲆经腹腔注射大菱鲆弧菌,攻毒感染1 d后大菱鲆摄食量明显减少,运动量少;感染5 d后,大部分鱼停止摄食,反应迟缓;感染后第7天,大菱鲆开始出现死亡,实验周期内死亡率为50%(表2)。以未攻毒健康大菱鲆为参照(图5A、B),可见死亡大菱鲆症状表现为腹腔积水,脾脏、肝脏和肠道明显充血,消化道内无食物,但有白便样内容物(图5D)。组织病理切片结果可见病死大菱鲆肝细胞排列杂乱,胞浆内呈现大空泡,且细胞核被挤向细胞边缘(图6C),这与由急性感染引起的肝细胞空泡变性的病理特征一致<sup>[19]</sup>;肠道组织出现肠壁细胞坏死,肠粘膜坏死溃烂且脱落(图6D)。

实验用200  $\mu\text{L/L}$  山苍子精油对攻毒大菱鲆进行浸浴处理,处理后大菱鲆在实验周期内无发病症状和死亡病例,采用Fish 精确检验法进行统计分

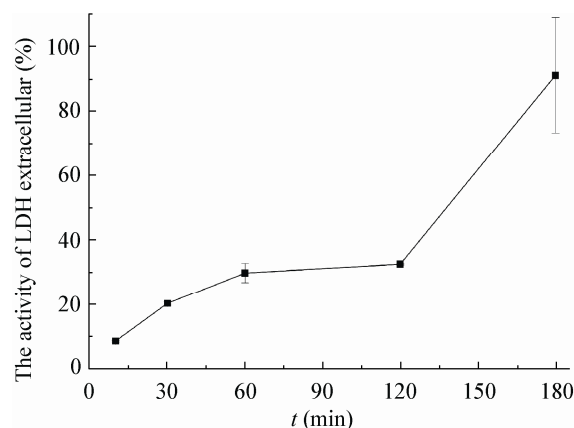


图3 山苍子精油处理后胞内乳酸脱氢酶的释放

Figure 3 The LDH efflux from *Litsea cubeba* oil treated *V. scophthalmi* HZ-C1 cells

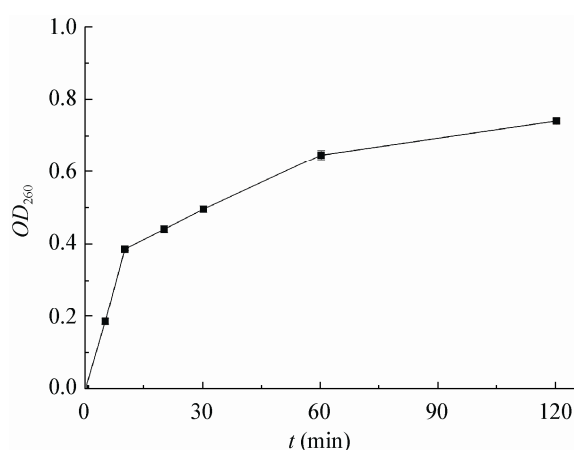


图4 山苍子精油处理后胞内紫外吸收物质的释放

Figure 4 The UV-absorbing materials efflux from *Litsea cubeba* oil treated *V. scophthalmi* HZ-C1 cells



表 2 大菱鲆腹腔注射大菱鲆弧菌 HZ-C1 及山苍子精油浸泡的死亡率  
Table 2 Cumulative mortality of turbot infected by *V. scophthalmi* HZ-C1 and after treatment in baths of *Litsea cubeba* oil

分组 Group	攻毒剂量 Challenge dose (CFU/fish)	精油浓度 Essential oil concentration (μL/L)	感染后各天死亡数量 Number of dead fish after challenge										死亡率 Mortality (%)
			1 d	5 d	7 d	10 d	11 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d	
空白对照 Control	生理盐水	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
精油处理 Treated	2×10 <sup>7</sup>	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照 Infected	2×10 <sup>7</sup>	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	50



图 5 大菱鲆外部形态及其内脏组织解剖图

Figure 5 The external features and internal anatomy of turbot

注：A、B 为对照组大菱鲆，腹腔注射生理盐水；C、D 为腹腔注射 *V. scophthalmi* HZ-C1 感染后大菱鲆；E、F 为攻毒后经山苍子精油处理的大菱鲆。①：脾脏；②：肠道；③：肝脏；④：白便样内容物。

Note: A, B are control turbot injected with physiological saline. C, D are clinical signs of turbot challenged with *V. scophthalmi* HZ-C1 strain. E, F are clinical signs of *V. scophthalmi*-challenged turbot after treatment with *Litsea cubeba* oil. ①: Spleen; ②: Intestine; ③: Liver; ④: White intestinal contents.

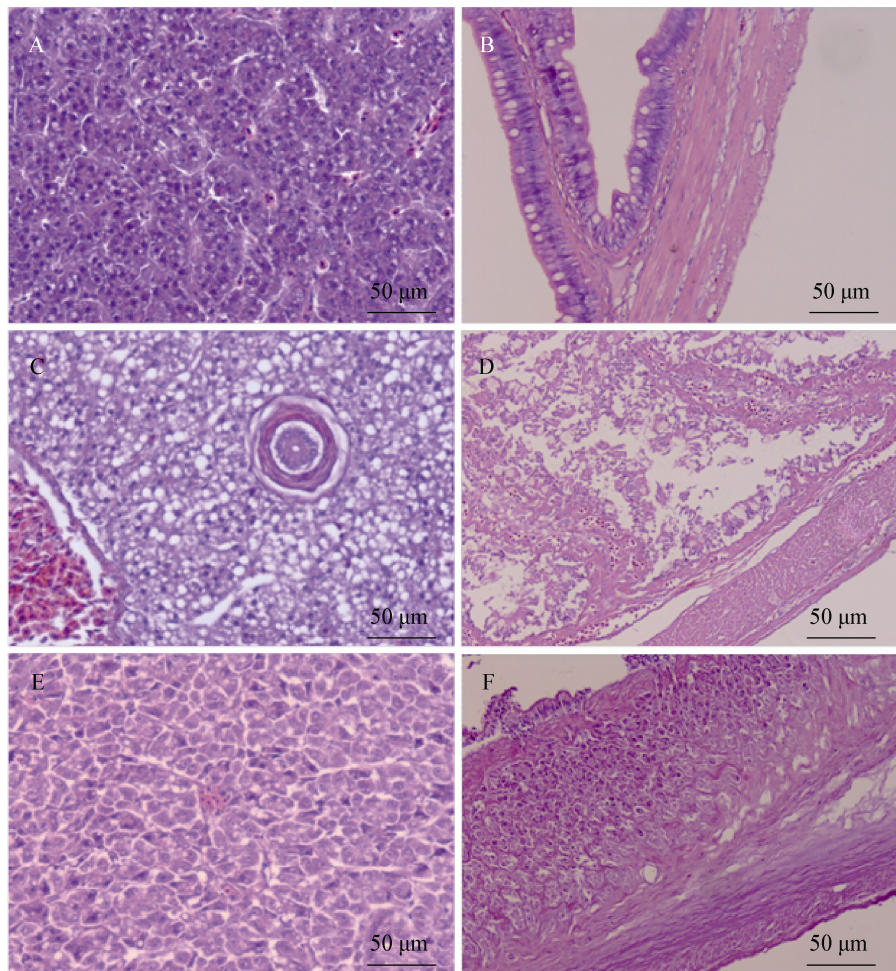


图 6 大菱鲆肝脏(A, C, E)及肠道(B, D, F)组织切片图

Figure 6 Histological sections of liver (A, C, E) and intestine (B, D, F) of turbot

注: A、B 为对照组大菱鲆组织, 腹腔注射生理盐水; C、D 为腹腔注射 *V. scophthalmi* HZ-C1 感染后大菱鲆组织; E、F 为攻毒后经山苍子精油处理的大菱鲆组织。

Note: A, B are tissues of control turbot injected with physiological saline. C and D are tissues of turbot challenged with *V. scophthalmi* HZ-C1 strain. E and F are tissues of *V. scophthalmi*-challenged turbot after treatment with *Litsea cubeba* oil.

析, 可见山苍子精油对攻毒大菱鲆具有显著抗菌保护作用( $P < 0.05$ )。组织解剖图片(图 5E、F)及病理切片同样显示精油处理后鱼的肝脏和肠道无明显病变特征(图 6E、F)。

### 3 结论与讨论

弧菌属细菌(*Vibrio* spp.)是危害海水养殖鱼类的主要病原之一, 第 9 版《伯杰氏细菌鉴定手册》中收录的弧菌有 37 种, 其中有 10 多种对海水养殖动物具有致病性<sup>[20]</sup>。目前报道导致养殖大菱鲆弧菌病(Vibriosis)的有副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)<sup>[21]</sup>、

溶藻弧菌<sup>[4]</sup>、哈维氏弧菌<sup>[3]</sup>和大菱鲆弧菌<sup>[5]</sup>等。本研究中的大菱鲆弧菌是一种条件致病菌<sup>[11]</sup>, 易感染鲆鲽鱼类, 尤其在鱼受到水温升高、其它致病菌入侵等环境胁迫时。Qiao 等<sup>[11]</sup>研究显示牙鲆在受到副乳链球菌(*Streptococcus parauberis*)入侵后, 易被大菱鲆弧菌二次感染, 累积死亡率由 25% 升高至 85%, 可见该菌具有较高致病性。本实验室前期研究发现大菱鲆弧菌也是大连地区养殖大菱鲆的关键病原之一, 且临床分离株对抗生素呈现多重耐药性, 因此, 有必要寻求一种新型抗生素替代品用于该



菌控制。

植物精油的抗菌活性已被大量研究证实,并被视为潜在的饲用抗生素替代品,但大多针对大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌等常见食源性病原菌<sup>[22-23]</sup>,且在畜、禽等陆生动物中研究较多,如肉桂醛和丁香酚能有效减少肠炎沙门氏菌在肉鸡盲肠中的定殖<sup>[24]</sup>;牛至精油可控制由金黄色葡萄球菌和大肠杆菌引起的奶牛乳房炎<sup>[25]</sup>等。

目前精油对水产动物养殖中致病菌的抗菌作用还鲜见报道。Rattanachaikunsopon 等<sup>[6]</sup>研究发现肉桂精油对罗非鱼海豚链球菌(*S. iniae*)具有很强抑制活性,最低抑菌浓度为 40  $\mu\text{g/mL}$ ;日粮中添加 0.4% (质量比)肉桂精油,经链球菌攻毒后罗非鱼累计死亡率由 50%降至 0。Zheng 等<sup>[7]</sup>研究结果显示日粮中添加 0.05%牛至精油,能使斑点叉尾鲴嗜水气单胞菌攻毒感染后死亡率降低 60%。Thomas 等<sup>[8]</sup>将印度苦楝油制备成纳米乳剂,给胡鲶(*Clarias batrachus*)肌肉注射该乳剂,可有效防治由杀鲑气单胞菌引起的溃疡性病变。不过这几项研究针对的均是淡水养殖中的常见致病菌,且选用的精油类型较为单一;此外,目前尚未见到关于精油控制海水养殖鱼类致病性弧菌的报道。

本研究考察了 14 种植物精油或其组分对大菱鲆弧菌的体外抑制效果,其中肉桂醛、百里香酚、丁香酚、柠檬醛和山苍子精油均对其显示很强抗菌活性, MIC 为 0.25–0.5  $\mu\text{L/mL}$ ,有望作为潜在抗菌剂用于大菱鲆弧菌病的控制。这几种精油或其组分的抗菌效果与目前已报道的结果基本一致。国内李文茹等<sup>[26]</sup>以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为受试菌株,发现几种精油的抑菌活性由强到弱依次为:肉桂精油>山苍子精油>丁香精油>香茅精油=迷迭香精油>大蒜精油,并发现肉桂精油抗菌活性最高。肉桂醛分子结构的特点在于含有  $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和羰基结构,这可能是其发挥强抗菌活性的功能域<sup>[27]</sup>。此外,含酚羟基的芳香族化合物同样具有良好抗菌效果,如百里香酚对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌的 MIC 为 0.7–1.4  $\mu\text{L/mL}$ <sup>[28]</sup>;丁香酚对

伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和大肠杆菌的 MIC 分别为 0.125  $\mu\text{L/mL}$  和 1.6  $\mu\text{L/mL}$ <sup>[29-30]</sup>。

柠檬醛是一种开链单萜醛,含顺反两种异构体,分别为橙花醛(顺式)和香叶醛(反式),自然状态下常共存于同一挥发油中,如山苍子精油中柠檬醛含量约占 70%,为其主要抗菌成分<sup>[18]</sup>。Li 等<sup>[31]</sup>研究证实山苍子精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性仅次于肉桂精油,最低抑菌浓度为 0.125% (体积比),约合 1.25  $\mu\text{L/mL}$ 。此外,柠檬醛单体组分对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌及单增李斯特菌的 MIC 为 0.5  $\mu\text{L/mL}$ <sup>[32]</sup>,这与本研究结果相似。

植物精油成分复杂,作用靶标多样,目前其抗菌机理尚未被完全阐明,现有研究认为大部分精油通过破坏细胞膜来实现。细菌细胞膜担负着渗透屏障、物质转运与能量代谢等功能,其结构与功能的完整性是维持细菌生命活动的基础。大部分植物精油及其成分具有疏水性,可以造成细胞膜非特异性损伤,致使膜通透性增加,引起 DNA、蛋白酶与 ATP 等胞内物质渗漏<sup>[33]</sup>,或导致电子传递链的破坏和质子动力势的消除<sup>[34]</sup>。本研究通过精油处理后细菌形态特征观察,胞外乳酸脱氢酶和核酸释放量检测也初步证实山苍子精油能够对大菱鲆弧菌细胞膜产生损伤,并导致胞内物质渗漏,细胞死亡。

精油应用于水产养殖中可行的给予途径有两种。一是混入饲料中,由鱼经口摄入,此法可操作性强,且有助于降低饵料中细菌的携带数量,这对饲喂轮虫等活饵的大菱鲆稚鱼显得尤为重要<sup>[35]</sup>。但存在的问题是,鱼被致病菌感染发病后摄食下降或停止,此时经口给药就难以实施。二是将精油投入水中对鱼进行药浴,该法的特点是疏水性精油小分子组分,能迅速通过鱼鳃和体表等组织进入血液<sup>[36]</sup>。本研究发现大菱鲆攻毒后基本停止摄食,因此采用药浴的方法投予精油;不过,与丁香精油类似<sup>[37]</sup>,山苍子精油对大菱鲆也具有一定麻醉效应,因此精油浓度和药浴时间分别控制为 200  $\mu\text{L/L}$  和 3 min。值得注意的是,精油药浴浓度低于其对

大菱鲆弧菌的最低抑菌浓度,因此,山苍子精油对大菱鲆的保护作用一方面源于其抗菌活性,另一原因可能是山苍子精油能增强大菱鲆非特异性免疫力,从而提高了其对致病菌的抵抗能力。与此类似,Baba 等<sup>[38]</sup>研究发现日粮中添加 0.5%柠檬精油,罗非鱼外周血中嗜中性粒细胞吞噬能力增强,血清溶菌酶及髓过氧化物酶活性增加;后经迟缓爱德华氏菌攻毒后,鱼的存活率由 20%提高至 63.3%。同样,Acar 等<sup>[39]</sup>研究也发现罗非鱼日粮中添加 0.1%–0.5%甜橙精油能显著提高其非特异性免疫力。基于此,山苍子精油对大菱鲆的免疫调节作用还有待后续研究。

综上,细菌性病害和抗生素药物残留问题已成为我国大菱鲆养殖产业的发展瓶颈,目前迫切需要寻求安全有效、环境友好的抗菌制剂用于养殖大菱鲆细菌性病害防控。植物精油具有高效抗菌和天然安全的优势,是一种极具潜力的饲用抗生素替代品。本研究以大菱鲆弧菌为研究对象,通过体内外试验评价了植物精油的抗菌效果。将植物精油应用于大菱鲆养殖中,有望实现大菱鲆养殖过程中“免抗生素防病”的目的<sup>[1]</sup>,这为大菱鲆细菌性疾病防治提供了新思路。另从食品安全角度考虑,也为从源头上解决养殖大菱鲆存在的药物残留问题提供了新途径。

## 参 考 文 献

- [1] Lei JL, Ma AJ, Chen C, et al. The present status and sustainable development of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) culture in China[J]. Engineering Science, 2005, 7(5): 30-34 (in Chinese)  
雷霖霖, 马爱军, 陈超, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.) 养殖现状与可持续发展[J]. 中国工程科学, 2005, 7(5): 30-34
- [2] Wang YG, Zhang Z, Qin L, et al. The main diseases of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*) and their prevention and treatment[J]. Marine Fisheries Research, 2004, 25(6): 61-68 (in Chinese)  
王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 61-68
- [3] Fan WH, Huang J, Wang XH, et al. Identification and phylogenetic study of pathogenic bacteria causing ulcer disease of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 665-670 (in Chinese)  
范文辉, 黄健, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 665-670
- [4] Xue SX, Feng SM, Sun JS. Isolation and identification of pathogenic bacteria in swollen abdomen of cultured Turbot (*Scophthalmus maximus*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(6): 548-554 (in Chinese)  
薛淑霞, 冯守明, 孙金生. 海水工厂化养殖大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)腹水病病原菌的分离与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(6): 548-554
- [5] Zhang Z. Epizootic investigation and aetiological study on the bacterial diseases in cultured Turbot (*scophthalmus maximus*)[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2004 (in Chinese)  
张正. 养殖大菱鲆流行病调查及主要细菌性疾病的病原学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2004
- [6] Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Fisheries Science, 2010, 76(2): 287-293
- [7] Zheng ZL, Tan JYW, Liu HY, et al. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Aquaculture, 2009, 292(3/4): 214-218
- [8] Thomas J, Jerobin J, Seelan TSJ, et al. Studies on pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* in catfish *Clarias batrachus* and control measures by neem nanoemulsion[J]. Aquaculture, 2013, 396-399: 71-75
- [9] Cerdà-Cuellar M, Rosselló-Mora RA, Lalucat J, et al. *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(1): 58-61
- [10] Blanch AR, Alsina M, Simón M, et al. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 82(6): 729-734
- [11] Qiao G, Lee DC, Woo SH, et al. Microbiological characteristics of *Vibrio scophthalmi* isolates from diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fisheries Science, 2012, 78(4): 853-863
- [12] Soffientino B, Gwaltney T, Nelson DR, et al. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 38(3): 201-210
- [13] Valdenegro-Vega V, Naeem S, Carson J, et al. Culturable microbiota of ranches southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii* Castelnau)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(4): 923-932
- [14] Jo M, Kim M, Song CB. Development of a rapid diagnosis kit for *Vibrios* associated with the farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju Island[C]. Journal of Fish Pathol F3, 2006
- [15] Stefanakis MK, Touloupakis E, Anastasopoulos E, et al. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*[J]. Food Control, 2013, 34(2): 539-546
- [16] Zhang XH. Marine Microbiology[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2007: 316 (in Chinese)  
张晓华. 海洋微生物学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007: 316
- [17] Othman M, Loh HS, Wiart C, et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(2): 161-166
- [18] He CY. Comprehensive Utilization of Plant Resources of Essential Oils Riched in Citral[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2008: 7 (in Chinese)  
和承尧. 富含柠檬醛精油植物资源综合利用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2008: 7
- [19] Wang JG. Ichthyopathology[M]. Beijing: China Agricul Ture Press, 2013: 59-63 (in Chinese)  
汪建国. 鱼病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 59-63

- [20] Wu HB, Pan JP. Virulence mechanisms of pathogenic *Vibrio*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(4): 422-426 (in Chinese)  
吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 422-426
- [21] Hu L, Zhao FM, Yu LP, et al. Identification of pathogenic bacteria in Turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Fisheries Science, 2008, 27(7): 340-343 (in Chinese)  
胡亮, 赵凤梅, 于兰萍, 等. 副溶血弧菌对养殖大菱鲆致病性研究[J]. 水产科学, 2008, 27(7): 340-343
- [22] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223-253
- [23] Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 12
- [24] Kollanoor-johny A, Mattson T, Baskaran SA, et al. Reduction of *Salmonella enterica* serovar enteritidis colonization in 20-day-old broiler chickens by the Plant-derived compounds *trans*-cinnamaldehyde and eugenol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(8): 2981-2987
- [25] Cho BW, Cha CN, Lee SM, et al. Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. Korean Journal of Veterinary Research, 2015, 55(4): 253-257
- [26] Li WR, Shi QS, Mo CY, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of several typical essential oils[J]. Microbiology China, 2013, 40(11): 2128-2137 (in Chinese)  
李文茹, 施庆珊, 莫翠云, 等. 几种典型植物精油的化学成分与其抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(11): 2128-2137
- [27] Tan LF, Ning ZX. Correlation between molecular structure and antibacterial activity of cinnamaldehydes and cinnamates[J]. Guangzhou Chemistry, 1996(2): 32-37 (in Chinese)  
谭龙飞, 宁正祥. 肉桂中醛、酸类化合物结构与抗菌活性的关系[J]. 广州化学, 1996(2): 32-37
- [28] Rosato A, Vitali C, De LN, et al. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin[J]. Phytomedicine, 2007, 14(11): 727-732
- [29] Pei RS, Zhou F, Ji BP, et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(4): M379-M383
- [30] Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, et al. 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(1): 107-115
- [31] Li WR, Shi QS, Liang Q, et al. Antibacterial activity and kinetics of *Litsea cubeba* oil on *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e110983
- [32] Kim J, Marshall MR, Wei CI. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(11): 2839-2845
- [33] Paul S, Dubey RC, Maheswari DK, et al. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens[J]. Food Control, 2011, 22(5): 725-731
- [34] Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(2): 170-174
- [35] Conceição LEC, Yúfera M, Makridis P, et al. Live feeds for early stages of fish rearing[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(5): 613-640
- [36] Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2015, 67(4): 473-485
- [37] Grush J, Noakes DL, Moccia RD. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton)[J]. Zebrafish, 2004, 1(1): 46-53
- [38] Baba E, Acar Ü, Öntaş C, et al. Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of *Mozambique tilapia Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*[J]. Aquaculture, 2016, 465: 13-18
- [39] Acar Ü, Kesbiç OS, Yılmaz S, et al. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*[J]. Aquaculture, 2014, 437: 282-286