



三种植物精油对美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的抑菌效果及其毒力基因表达的影响

杨新月^{1,2}, 王春元², 于永翔², 王印庚², 李京泽²,
刘定远², 张正^{2*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为研究百里香精油、牛至精油和肉桂精油对海水养殖经济鱼类主要致病菌美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 (PDD) 的抑菌作用, 实验采用二倍稀释法分别测定 3 种植物精油对 6 株不同致病力 PDD 菌株的最小抑菌质量浓度 (MIC) 和最小杀菌质量浓度 (MBC)。采用分光光度计法检测添加精油后 6 株 PDD 生长曲线的变化; 以 2 株高致病性 PDD 菌株为研究对象, 分析不同浓度精油对 PDD 毒力基因表达量及胞外产物 (ECP) 活性的影响; 分析了 3 种精油存储不同时间后以及在金属离子影响下的药效稳定性。结果显示, 3 种精油对 6 株 PDD 菌株均具有较好的抑菌和杀菌作用, MIC 为 32~128 $\mu\text{g/mL}$, MBC 为 64~192 $\mu\text{g/mL}$; 3 种精油对 2 株高致病性 PDD 菌株的毒力基因表达及 ECP 的磷脂酶活性和溶血活性均有抑制作用, 其中低浓度精油对 PDD 主要毒力基因的抑制作用最明显。3 种精油于室温下避光存储 35 d, 对实验菌株的杀菌率均大于 99%, 显示其良好的药物稳定性; 水环境中不同浓度 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 等对 3 种精油的杀菌效果无显著影响。研究表明, 3 种精油均适宜开发为防治水产动物细菌性疾病的新型渔药或饲料添加剂。本研究可为拓展芳香类植物精油在水产疾病防控上的应用提供借鉴与参考。

关键词: 海水养殖; 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; 植物精油; 抑菌作用; 药效稳定性

中图分类号: Q 946.85; S 942.2

文献标志码: A

随着水产养殖业集约化程度的不断提高, 病害的发生也越来越频繁。2021 年, 病害导致水产养殖业的经济损失高达 539 亿元^[1], 成为制约产业健康发展的主要因素。其中, 细菌感染导致的疾病最为普遍, 而目前产业中多采用抗生素等化学药物进行防治, 但不规范用药, 导致药物残留以及耐药菌产生等一系列问题, 直接影响了水产品的食品质量安全。

芳香类植物是主要的抗菌中草药来源之一, 具有产物天然、成分物质多、药理机制复杂、副作用少、不易产生耐药性等优势, 已经成为一类非常重要的动物疾病防控药物。其中百里香 (*Thymus mongolicus*)、牛至 (*Origanum vulgare*) 和肉桂 (*Cinnamomum cassia*) 及其精油等都是应用广泛的代表性产品, 不仅具有显著的抗菌^[2-4]、抗炎^[5]、抗病毒^[6-8]、抗癌^[9-10] 和抗氧化^[11] 等作用, 还

收稿日期: 2023-11-17 修回日期: 2024-04-03

资助项目: 山东省重点研发计划 (科技示范工程) 项目 (2021SFGC0701); 山东省自然科学基金 (ZR2021MC027, ZR2020QC216)

第一作者: 杨新月 (照片), 从事水产病害防控研究, E-mail: 1075509111@qq.com

通信作者: 张正, 从事水产病害防控研究, E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn



能调节机体免疫功能^[12], 可用于防治许多难以使用化学药物和抗生素治疗的病毒性、细菌性和代谢性疾病。

本研究以百里香精油 (TEO)、牛至精油 (OEO) 和肉桂精油 (CEO) 以及海水养殖经济鱼类主要致病菌美人鱼发光杆菌美人鱼亚种 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)^[13] 为实验对象, 进行体外抑菌和杀菌实验。同时以 2 株高致病性 PDD 菌株为实验菌株, 分析不同浓度精油对其毒力因子作用的影响, 并开展植物精油的药效稳定性研究。研究结果旨在为拓展芳香类植物精油在水产疾病防控上的应用提供借鉴与参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株与试剂耗材

选取 6 株 PDD 菌株, 实验室编号分别为 PDD1605、PDD1608、PDD0210、PDD0906、PDD1411 和 PDD2008, 其中 PDD1605 和 PDD1608 为高致病性菌株, PDD0210 和 PDD0906 为弱致病性菌株, PDD1411 和 PDD2008 为无致病性菌株。所有菌株均由中国水产科学研究院黄海水产研究所实验室分离并保存。

将超低温保存的实验菌株于 TSB 琼脂培养基活化培养, 并挑选单菌落转接 3 次后, 再挑取纯化后的单菌落接种到灭菌 TSB 培养基中, 28 °C 培养 8 h, 制作菌悬液, 分光光度法调节菌体含量至 1.0×10^8 CFU/mL。牛至精油、百里香精油、肉桂精油均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 MIC 和 MBC 测定

将百里香精油、牛至精油、肉桂精油用 10% 的二甲基亚砷 (DMSO) 配成母液, 取 1 mL 母液稀释 10 倍即得浓度为 1 024 μ g/mL 的药液, 同法配制 DMSO 对照组溶液。采用微量肉汤稀释法测定最小抑菌质量浓度 (MIC): 向 96 孔板中加入 TSB 和配好的药液, 通过二倍稀释使药物最终浓度分别为 1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μ g/mL, 然后加入浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 的菌悬液 100 μ L, 在空白孔板中加对应浓度药液 200 μ L 做阴性对照, 加 TSB 液体培养基 200 μ L 作阳性对照, 所有加样孔板加入 10 μ L 氯化三苯四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC), 在培养箱 28 °C 下培养 16~18 h, 观察 96 孔板中培养

结果。结果判定, 孔板内液体呈现红色即为有菌生长, 清澈透明则为无菌生长, 以无菌生长的最低稀释度确定为 MIC 值, 每个浓度 3 个平行。在测定 MIC 值的基础上, 从无色孔开始向上 2 个稀释度共 3 个孔中各吸取 100 μ L 样液, 接种至 TSB 琼脂培养基, 均匀涂布后 28 °C 培养 16~18 h, 平板菌落不超过 5 个的相应孔板中的药物浓度即为该种药物对供试菌株的最小抑菌质量浓度 (MBC)。

1.3 对 PDD 菌株生长的影响

向灭菌的 TSB 培养基中分别加入 3 种精油母液并稀释, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC, DMSO 处理作为对照组。将制备的菌悬母液按 1% 比例接种于 100 孔板中。每组 3 个平行, 在空白孔板中加对应浓度药液 300 μ L 作阴性对照, 加 TSB 液体培养基 300 μ L 作阳性对照。用全自动生长曲线分析仪 (Bioscreen C Pro) 每隔 1 小时测 1 次 OD₆₀₀ 数值, 绘制生长曲线。

1.4 对 ECP 磷脂酶活性和溶血活性的影响

细菌胞外产物 (extracellular products, ECP) 的提取参考李永杰等^[13] 的方法, 采用选择培养基对 2 株高致病性 PDD 菌株的 ECP 进行平板法测定磷脂酶活性和溶血性, 以及不同精油浓度处理下磷脂酶和溶血素的活性。在含有 1.5% (质量体积分数) NaCl 的 TSB 中分别补充 5% (体积分数) 脱纤维绵羊血和 3% (体积分数) 蛋黄乳液制备成测定溶血能力的绵羊血平板、测定卵磷脂分解能力的卵黄平板。取菌株 PDD1605 和 PDD1608 的 ECP 原液为原液组, 向绵羊血平板、卵黄平板的牛津杯孔中加入 100 μ L 的 ECP 原液, 进行磷脂酶活性及溶血性测定, 在 24~48 h 内进行观察并记录结果。对照组为等量的无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH=7.4)。设置 3 种植物精油 1/4 MIC、1/2 MIC 浓度下处理 ECP 样品为实验组, 同样方法分别测定磷脂酶活性及溶血性。

1.5 PDD 菌株毒力基因表达量测定

采用 Bacteria RNA Extraction Kit 提取各实验组指数期的细菌总 RNA。用 Nanodrop 1 000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测其条带的完整性。适当稀释 RNA 样品, 取 1 ng RNA, 利用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒进行反

转录, 10 倍稀释后作为各实验组实时荧光定量 (qRT-PCR) 模板。

针对高致病性 PDD 菌株的 *dly*、*PhlyP*、*PhlyC* 和 *PlpV* 4 个毒力基因^[14], 利用 NCBI 设计引物。各引物序列如表 1 所示, 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。采用 SYBR Green™ 进行荧光定量 PCR 扩增, *gyrB* 作为内参基因。qRT-PCR 程序: 95 °C 30 s, 40 个循环, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s。然后在 4 °C 冷却和保存, 每个样品 3 次重复, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测 qRT-PCR 产物的条带。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 PDD 主要毒力基因及内参基因引物序列

Tab. 1 The primers for PDD virulence genes and internal reference genes

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature	扩增长度/bp amplicon length
dly-F	GCATACTGTTTCGATTACC AG	50.3	170
dly-R	TGCCATCCTGTATCAGAT TT	50.3	
PhlyP-F	CCCATGTTTCGTTTTACC TT	50.3	220
PhlyP-R	GCACCAGTAGTGTATCA TC	50.0	
PhlyC-F	AGCAGATGCTAATGATCG TA	50.1	220
PhlyC-R	CGACTTCTCTATCCAA AT	51.0	
PlpV-F	AACGCTGCTGATATTACC TA	50.0	195
PlpV-R	GCCTAAGAACCAAGAGTT TG	50.7	
gyrB-F	GTGATACTGATCGTACAG GT	50.6	246
gyrB-R	CTTTCTGGTGAATTGGTG TT	50.0	

1.6 储存时间对精油杀菌效果的影响

以 PDD1605、PDD1608 为对象, 菌液浓度调节至 1.0×10^8 CFU/mL。以 3 种植物精油对菌株的 MBC 浓度为参考值, 用无菌纯水配制相同浓度的精油溶液, 分别置于室温下避光、密封存储 1、7、14、28 和 35 d 后, 在 24 孔板中分别按精油溶液 1 000 μ L + TSB 培养基 1 000 μ L + 菌液 100 μ L 配置体系 (体系中精油最终浓度为 MBC), 对照组体系为 TSB 培养基 1 000 μ L + 生理盐水 1 000 μ L + 菌液 100 μ L, 混匀后放置培养箱, 于 28 °C、180

r/min 培养。培养 3 h (经预实验确定) 后吸取 100 μ L 涂布 TSB 琼脂平板, 计算残留的细菌数量, 并按以下公式计算不同储存时间处理下精油的杀菌率。实验设 3 次重复, 用平均值 \pm 标准差表示。

$$\text{杀菌率}(\%) = \frac{\text{对照组细菌数} - \text{实验组细菌数}}{\text{对照组细菌数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.7 金属离子对精油杀菌效果的影响

根据海水应用环境, 选取 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 和 Mg^{2+} 4 种金属离子, 研究其对精油杀菌效果的影响。参照海水的盐度配比, 分别设置 NaCl 的浓度梯度为 0、5、10、15、20、25 mg/L, CaCl_2 、KCl、 MgCl_2 的浓度梯度为 0、1、2、3、4、5 mg/L。以对应盐溶液配置浓度为 2 MBC 的精油溶液 (体系中精油最终浓度为 MBC), 对照组不加精油溶液, 按“储存时间对精油杀菌效果的影响”中的方法计算杀菌率, 分析不同金属离子浓度对精油杀菌效果的影响。

1.8 数据分析

用 Excel 2016 和 SPSS 19.0 软件对实验数据进行处理, 数据均用平均值 \pm 标准差表示, 使用 Origin 2021 软件进行绘图。组间数据均以平均值表示, 并采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析, 当差异显著时用 Duncan 氏法作多重比较。以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 3 种精油对不同 PDD 菌株的 MIC 和 MBC 的影响

3 种精油对 6 株 PDD 菌株 MIC 和 MBC 的测定结果显示, MIC 为 32~128 μ g/mL, MBC 为 64~192 μ g/mL (表 2)。香茅 (*Cymbopogon*) 精油的浓度为 80 μ L/L 时, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的活性完全被抑制^[5]。与本实验相比, 牛至精油的 MIC 值较低。

2.2 3 种精油对高致病性 PDD 菌株生长的影响

为了探究精油对高致病性 PDD 菌株生长的影响, 在 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 精油浓度处理后, 记录细菌的生长情况 (图 1)。结果表明 3 种精油均能显著影响高致病性 PDD 菌株的生长, 且呈现浓度依赖性的趋势。

表 2 3种精油对不同 PDD 菌株的 MIC 和 MBC

Tab. 2 MIC and MBC of three essential oils against different PDD strains

μg/mL

菌株 strain	百里香精油 <i>T. mongolicus</i> essential oil		牛至精油 <i>O. vulgare</i> essential oil		肉桂精油 <i>C. cassia</i> essential oil	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	PDD1605	128	192	32	64	128
PDD1608	128	192	32	64	128	128
PDD0210	128	192	32	64	128	128
PDD0906	128	192	32	64	128	128
PDD1411	128	192	32	64	128	128
PDD2008	128	192	32	64	128	128

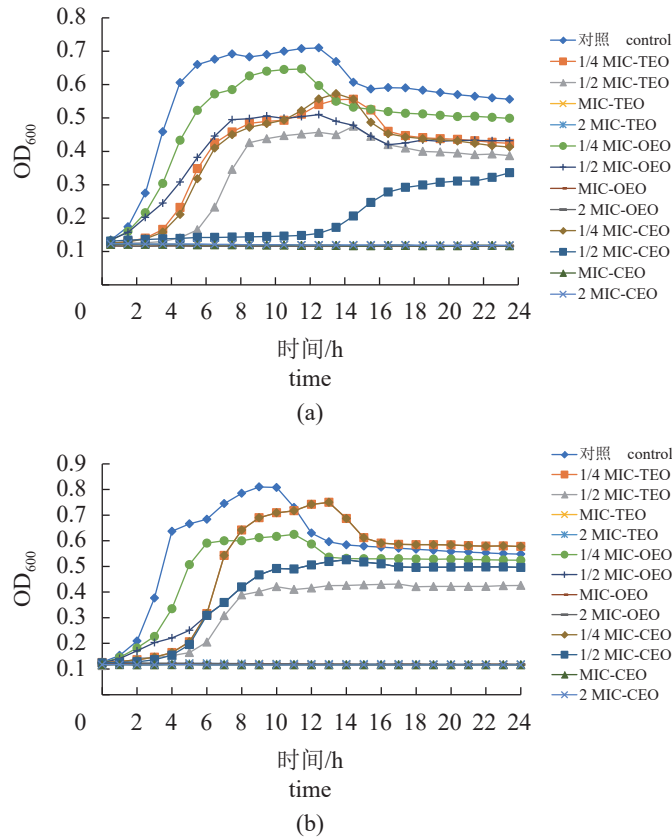


图 1 3种精油对高致病性 PDD1605 和 PDD1608 菌株生长曲线的影响

(a) PDD1605, (b) PDD1608; TEO. 百里香精油, OEO. 牛至精油, CEO. 肉桂精油, 下同。

Fig. 1 Effects of three essential oils on the growth curve of highly pathogenic PDD strains 1605 and 1608

(a) PDD1605, (b) PDD1608; TEO. *T. mongolicus* essential oil, OEO. *O. vulgare* essential oil, CEO. *C. cassia* essential oil, the same below.

2.3 3种精油对高致病性 PDD 菌株 ECP 磷脂酶和溶血活性的影响

不同浓度的3种精油对PDD1605和PDD1608菌株ECP的影响如图2所示。原液组中高致病性菌株PDD1605、PDD1608的ECP具有强磷脂酶活性和溶血性；加入不同浓度的精油处理后ECP溶血性消失，但仍有弱磷脂酶活性；高致病性菌株

PDD1605和PDD1608在1/2MIC精油浓度作用后，ECP的磷脂酶活性略强于1/4MIC精油处理组。

2.4 3种精油对高致病性 PDD 菌株主要毒力基因表达量的影响

对2株高致病性PDD菌株的 *dly*、*PhlyP*、*PhlyC* 和 *PlpV* 共4种毒力基因在精油作用下的表达量变化检测结果显示，与未经精油处理的对照

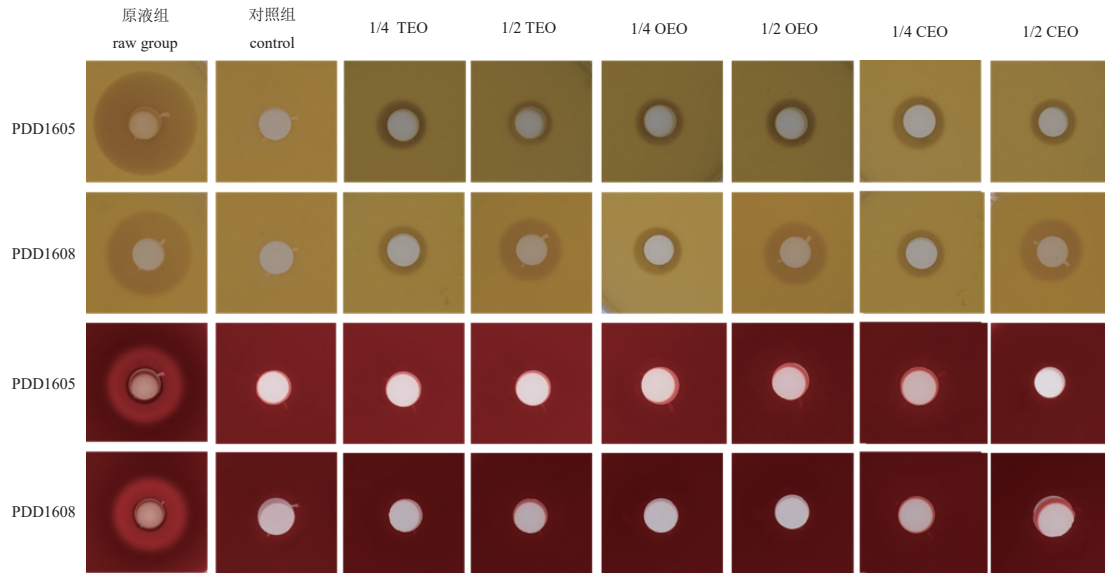


图 2 不同精油作用对高致病性 PDD 菌株 1605 和 1608 ECP 磷脂酶和溶血性的影响

Fig. 2 Effects of different essential oils on ECP phospholipase activity and hemolysis of highly pathogenic PDD strains 1605 and 1608

组相比, 菌株 PDD1605 中 (图 3-a~d), 除百里香精油组的 MIC 浓度 *PhlyC* 表达量相比对照组没有显著下降外 ($P>0.05$), 百里香精油、牛至精油、肉桂精油组各浓度 *dly*、*PhlyP*、*PhlyC* 和 *PlpV* 表达量相比对照组均显著下降 ($P<0.05$), 且下降量呈浓度梯度依赖。与对照组相比, 菌株 PDD1608 中 (图 3-e~h), 百里香精油、牛至精油、肉桂精油组 1/4 MIC 浓度 *dly*、*PhlyP*、*PhlyC* 和 *PlpV* 表达量均显著下降 ($P<0.05$); 百里香精油组 1/2 MIC 浓度中 *dly* 表达量显著上升 ($P<0.05$), *PlpV* 表达量无显著下降 ($P>0.05$), 牛至精油和肉桂精油组 1/2 MIC 浓度 *PhlyP* 和 *PhlyC* 表达量显著下降 ($P<0.05$), 百里香精油组 MIC 浓度 *PhlyP* 表达量无显著上升 ($P>0.05$), 牛至精油和肉桂精油组 MIC 浓度 *dly*、*PhlyC* 和 *PlpV* 表达量均显著上升 ($P<0.05$)。

2.5 储存时间对精油杀菌效果的影响

以 PDD1605 和 PDD1608 为实验菌株, 测定不同存储时间后百里香精油、牛至精油和肉桂精油在 MBC 浓度时的杀菌对数值。结果显示, 3 种精油分别于室温密封存放 1、7、14、28、35 d 后, 对 2 株高致病 PDD 菌株的杀菌率依然超过 99%, 且无显著差异 ($P>0.05$) (图 4), 表明存放时间对 3 种植物精油的杀菌效果无明显影响。

2.6 金属离子对精油杀菌效果的影响

分别用质量浓度为 0、5、10、15、20、25

$\mu\text{g/mL}$ 的 NaCl 盐溶液配置 MBC 浓度的精油溶液, 作用 3 h 后, 杀菌率均超过 99% (图 5)。质量浓度为 0、1、2、3、4、5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CaCl_2 、KCl、 MgCl_2 盐溶液配置 MBC 浓度的精油溶液, 作用 3 h 后杀菌率也均超过 99% (图 5)。结果显示, Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+} 等对上述 3 种精油的杀菌效果无显著影响 ($P>0.05$)。

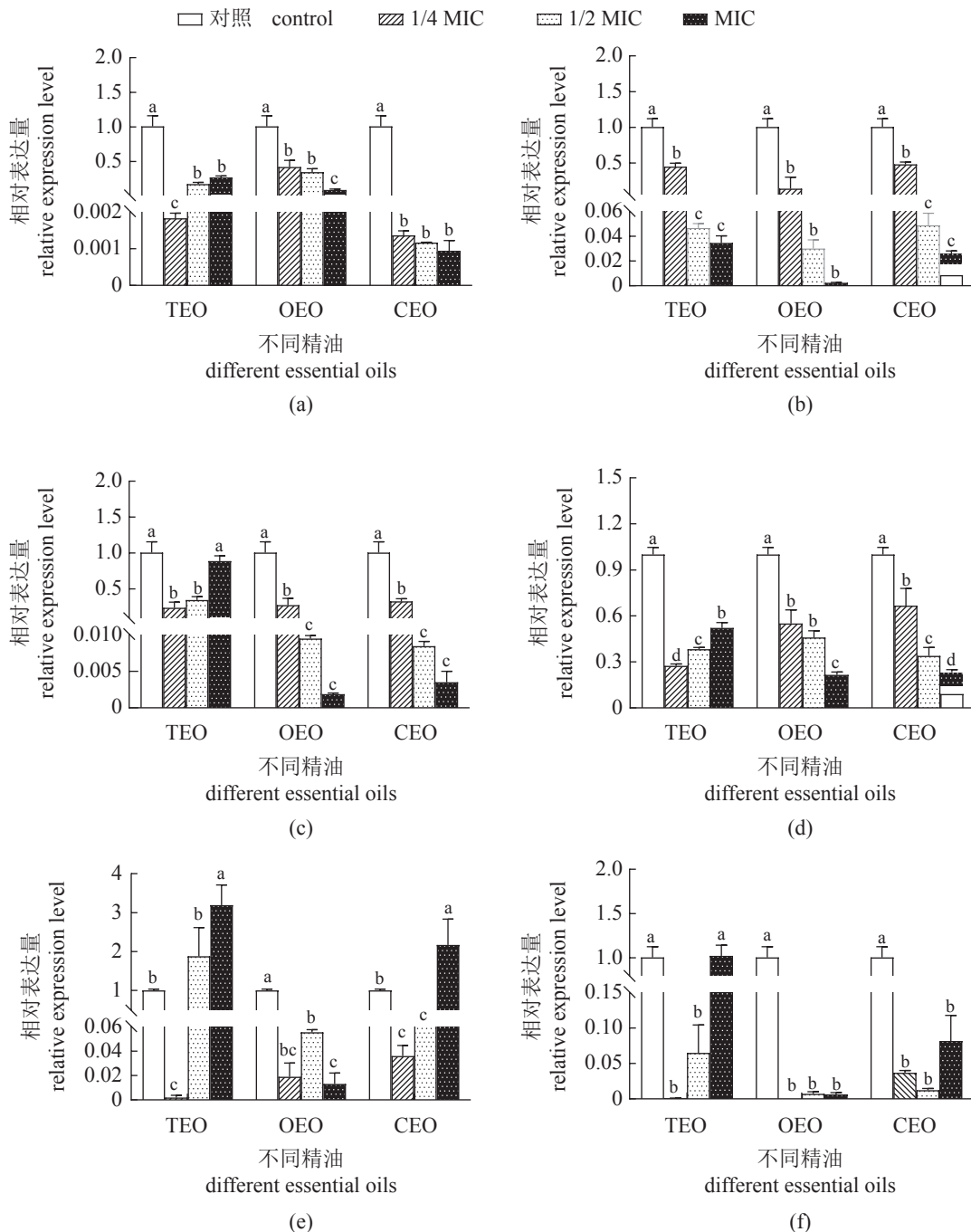
3 讨论

养殖过程中频繁使用抗生素等化学药物导致微生物的耐药性不断增强, 促使科学家们开始寻找具有广谱抑菌活性的新型、绿色药物。植物精油是一种来源于植物的次生物质, 含有不同萜烯、倍半萜烯和芳香化合物 (如酚类和苯丙烷) 等多类物质, 具有较好的抑菌效果, 适宜开发成为天然来源的抑菌剂。本研究选用了百里香、牛至和肉桂三种芳香类植物精油, 开展了它们针对海洋病原菌 PDD 的抑菌效果研究。百里香精油主要成分为香芹酚和百里香酚, 通过破坏细菌细胞质膜、改变细胞膜的通透性和相关酶活性, 干扰三羧酸循环等多种途径, 达到抑杀效果^[15]。此外, 百里香精油还能影响细菌的正常生长周期, 减弱菌体的自身保护防御机能、显著降低菌体胞内蛋白质含量, 抑制生物膜形成, 抑制细菌菌株间的黏附活性^[16-18]。牛至精油含有 γ -松油烯、 α -松油烯、对伞花烃和百里香酚等成分, 有研究证明牛至油能

够显著降低烧伤创口铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 或金黄色葡萄球菌感染的病原载量, 且对皮肤没有明显的副作用, 并对 11 株多重耐药临床分离株均有显著的抗菌活性, MIC 范围为 0.08~0.64 mg/mL^[19]。据报道^[20-21], 肉桂提取物、精油及其化合物通过破坏细胞膜, 抑制 ATP 酶、细胞分裂、膜孔蛋白、运动和生物膜形成以及群体感应效应来发挥抗菌作用。肉桂精油起抑菌作

用的主要成分是肉桂醛、丁香醛等。有研究证明, 肉桂精油对革兰氏阴性菌和阳性菌表现出广谱活性, 对包括铜绿假单胞菌 PAO1 株等多重耐药菌显示出抑杀作用^[22]。

随着水产养殖业的快速发展和集约化养殖规模的不断扩大, 细菌性疾病的发病率越来越高, 对于绿色、安全的新抗菌药物的需求日益增强, 植物精油成为开发新型抗菌渔药的优选药源之一。



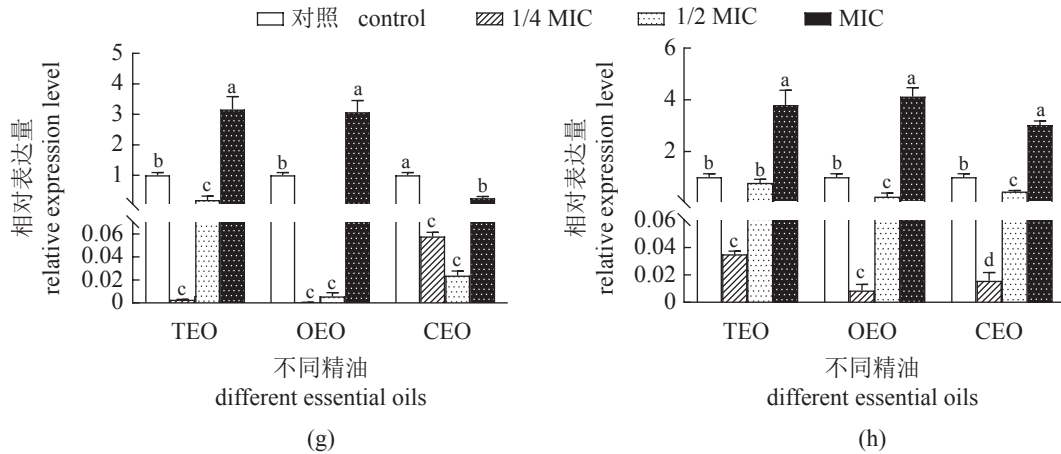


图 3 不同精油作用对高致病性 PDD 菌株毒力基因表达的影响

(a)–(d) PDD1605 的 *dly*、*HlyP*、*PhlyC*、*PlpV* 相对表达量, (e)–(h) PDD1608 的 *dly*、*HlyP*、*PhlyC*、*PlpV* 相对表达量; 柱形图上方字母不同表示组内差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Effect of different essential oil on the virulence genes expression of highly pathogenic strains PDD

(a)–(d) the relative expression of *dly*, *HlyP*, *PhlyC*, *PlpV* in PDD1605, (e)–(h) the relative expression of *dly*, *HlyP*, *PhlyC*, *PlpV* in PDD1608; thletters displayed above the histogram indicate significant differences within the group ($P < 0.05$).

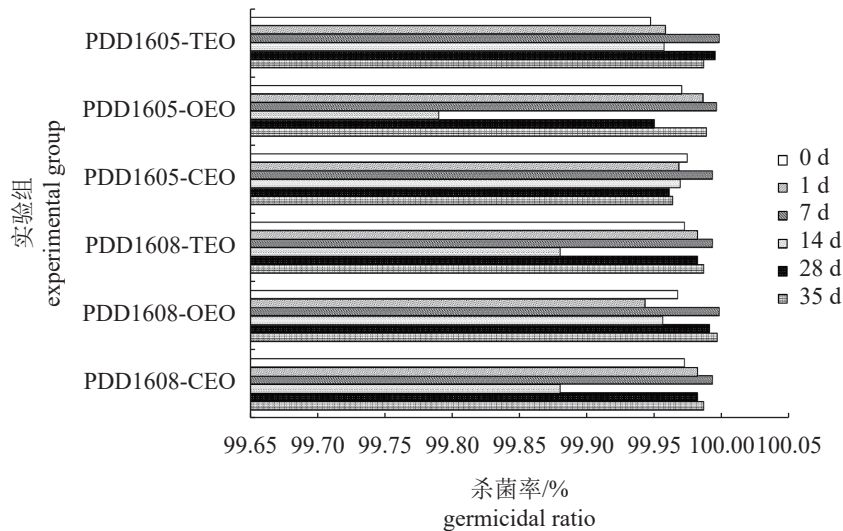


图 4 存放不同时间后 3 种精油对 PDD 菌株的杀灭效果

Fig. 4 The bactericidal activity of three essential oils on PDD strains after different storage time

植物精油针对水产养殖重要病原菌的抑菌作用也有广泛的研究。Govaris 等^[23]研究表明, 牛至精油能够有效抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、霉菌、酵母菌等多种微生物的增殖。有研究证明牛至精油对海水养殖致病菌创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 具有显著的抑菌效果, MIC 和 MBC 为 0.06~0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ^[24], 并且能够显著降低细胞内三磷酸腺苷 (ATP) 的浓度, 使细胞膜超极化, 同时提高活性氧 (ROS) 的水平。Gracia-Valenzuela 等^[25]研究发现, 在对虾基础饲料中添加含不同比例百里香酚和香芹酚 (48% : 23%、25% : 40%, 质量分

数) 的牛至精油均能够有效抑制对虾组织中感染的创伤弧菌、副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 和霍乱弧菌 (*V. leraecho*)。Wei 等^[26]发现, 香茅草精油对弧菌属和爱德华氏菌属 (*Edwardsiella*) 的 MIC 值分别为 0.244 和 0.488 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 具有较强的抑菌作用。肉桂精油能够有效抑制副溶血性弧菌, 其 MIC 为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并且与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 鱼鳞抗菌肽联用, 能够协同增强对副溶血性弧菌的抗菌作用, MIC 达到 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[27]。

植物精油还可以通过促进鱼类肠道绒毛数量增加并改善肠道菌群结构, 抑制病原微生物生长,

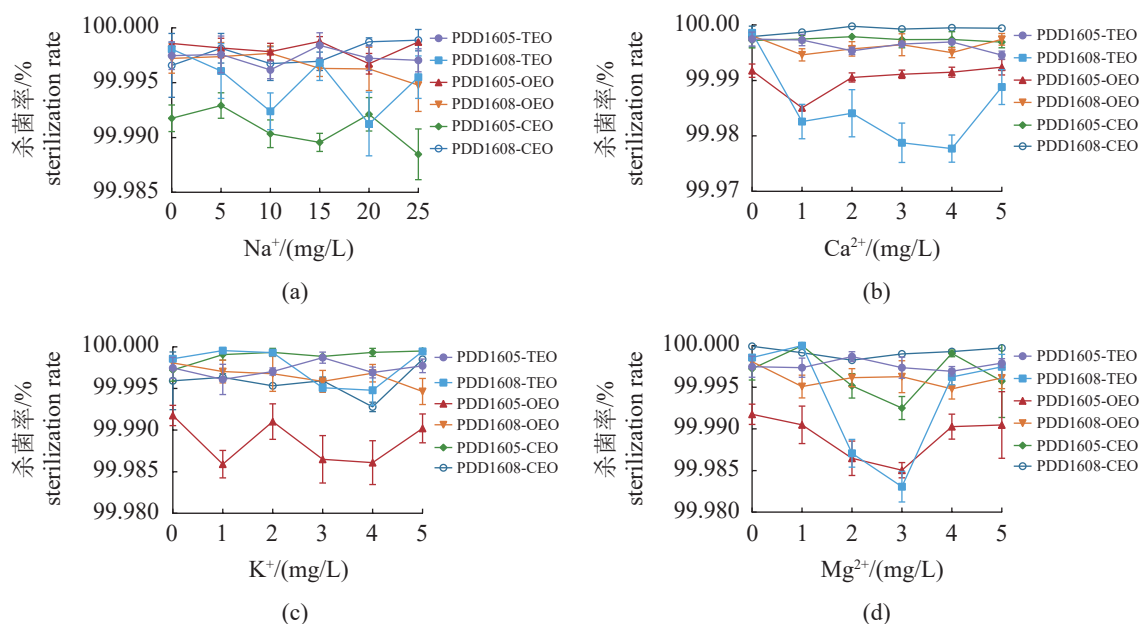


图5 添加不同金属离子后3种精油对PDD菌株的杀菌效果

Fig. 5 The bactericidal activity of three essential oils on PDD strains after adding different metal ion addition

促进肠道营养物质吸收,从而提高宿主的抗病能力。Ghafarifarsani等^[28]研究表明,饲料中添加10 g/kg的百里香精油可显著降低鲤血清中的丙二醛含量,以及血清和肝脏中谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、谷草转氨酶等活性,对血清和肠道替代补体途径、总免疫球蛋白含量及免疫参数溶菌酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性等均具有显著改善作用。Anthony等^[29]的研究证明植物精油中的百里香酚、香芹酚和丁香酚能够有效清除自由基,是其发挥抗氧化作用的主要成分。王俊维等^[30]研究表明,饲料中添加牛至精油能有效提高异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的生长性能,促进其肠道消化酶活性和改善肠道组织形态结构。

有研究表明,天然抑菌物质能够调控毒力基因的表达。如百里香酚和抗生素联合使用能够有效下调产毒素大肠杆菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*)毒力和抗生素抗性基因的表达^[31]。用姜黄素制备的氧化钆纳米颗粒作用后,铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌所有毒力和外排泵基因的表达水平也明显下调^[32]。Omer等^[33]研究表明,100 mg/mL水飞蓟宾和姜黄素能够显著降低多重耐药氧化克雷伯菌(multidrug resistant *Klebsiella oxytoca*)毒力基因 *fimA* 和 *mrkA* 的表达水平。香芹酚的亚抑菌浓度能够通过干扰鞭毛功能来有效地阻断其毒力性状^[34]。香豆酸在亚抑菌浓度下能够显

著抑制嗜水气单胞菌毒力基因 *ascV* 和 *aopB* 的表达量^[35]。本研究中2株高致病性PDD菌株的4个主要毒力基因表达量在3种精油低浓度作用下能被有效抑制,表明即使药物浓度低于MIC时对病原菌的毒力基因转录仍有抑制效果,这也为开发基于抗毒力策略的新型疾病防治技术提供了参考。

总之,本研究证实了百里香精油、牛至精油和肉桂精油对PDD菌株具有良好的抑杀效果,并能有效抑制PDD的ECP磷脂酶和溶血活性,以及主要毒力基因的表达。长时间的贮存,以及水环境存在金属阳离子对其药效稳定性影响有限,这为开发适用海水养殖环境的新型渔药或饲料添加剂提供了参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站. 2021中国水生动物卫生状况报告[M].北京:中国农业出版社,2021.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs Fishery Administration Bureau, National Aquatic Technology Promotion Station. 2021 Aquatic animal health in China[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2021 (in Chinese).

- [2] Jafri H, Ahmad I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*[J]. *Journal de Mycologie Médicale*, 2020, 30(1): 100911.
- [3] Sakkas H, Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(3): 429-438.
- [4] Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza B A, Ortega-Ramirez L A, et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(10): 1717-1727.
- [5] Chao L K, Hua K F, Hsu H Y, et al. Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(18): 7274-7278.
- [6] Catella C, Camero M, Lucente M S, et al. Virucidal and antiviral effects of *Thymus vulgaris* essential oil on feline coronavirus[J]. *Research in Veterinary Science*, 2021, 137: 44-47.
- [7] Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends[J]. *MicrobiologyOpen*, 2017, 6(4): e00459.
- [8] Wani A R, Yadav K, Khurshed A, et al. An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 152: 104620.
- [9] Niksic H, Becic F, Koric E, et al. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 13178.
- [10] Yang X Q, Zheng H, Ye Q, et al. Essential oil of Cinnamon exerts anti-cancer activity against head and neck squamous cell carcinoma via attenuating epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase[J]. *Journal of BUON*, 2015, 20(6): 1518-1525.
- [11] Salehi B, Mishra A P, Shukla I, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: health and potential uses[J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(9): 1688-1706.
- [12] Ruan D, Fan Q L, Fouad A M, et al. Effects of dietary oregano essential oil supplementation on growth performance, intestinal antioxidative capacity, immunity, and intestinal microbiota in yellow-feathered chickens[J]. *Journal of Animal Science*, 2021, 99(2): skab033.
- [13] 李永杰, 于永翔, 王印庚, 等. 高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种胞外产物的毒力特性分析 [J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 2995-3006.
- Li Y J, Yu Y X, Wang Y G, et al. Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2995-3006 (in Chinese).
- [14] Rivas A J, Balado M, Lemos M L, et al. The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(11): 4617-4627.
- [15] 郭俊贤. 精油对水产品特定腐败菌的抑制及其抑菌机理 [D]. 广州: 广东工业大学, 2015.
- Guo J X. Inhibition and antibacterial mechanism of essential oils towards specific spoilage organism of aquatic products[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [16] Perez A P, Perez N, Lozano C M S, et al. The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicles[J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 339-351.
- [17] Perez N, Altube M J, Barbosa L R S, et al. *Thymus vulgaris* essential oil+tobramycin within nanostructured archaeolipid carriers: a new approach against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154179.
- [18] Diniz A F, Santos B, Nóbrega L M M O, et al. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat product[J]. *Brazilian Journal of Biology*, 2023, 83: e275306.
- [19] Lu M, Dai T H, Murray C K, et al. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2329.
- [20] Yang S K, Yusoff K, Ajat M, et al. Disruption of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* membrane via induction of oxidative stress by cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl) essential oil[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0214326.

- [21] Abd El-Aziz N K, Ammar A M, El-Naenaeey E Y M, *et al.* Antimicrobial and antibiofilm potentials of cinnamon oil and silver nanoparticles against *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis: new avenues for countering resistance[J]. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 136.
- [22] Elcocks E R, Spencer-Phillips P T N, Adukwu E C. Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 1025-1037.
- [23] Govaris A, Solomakos N, Pexara A, *et al.* The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella Enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137(2-3): 175-180.
- [24] Luo K Y, Zhao P Y, He Y F, *et al.* Antibacterial effect of oregano essential oil against *Vibrio vulnificus* and its mechanism[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(3): 403.
- [25] Gracia-Valenzuela M H, Vergara-Jiménez M J, Baez-Flores M E, *et al.* Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps[J]. *Archives of Biological Sciences*, 2014, 66(4): 1367-1370.
- [26] Wei L S, Wee W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals[J]. *Iranian Journal of Microbiology*, 2013, 5(2): 147-152.
- [27] 王雪燕, 陈瑛, 张嘉敏, 等. 草鱼鱼鳞抗菌肽与肉桂精油联合抑菌作用及机理 [J]. *食品科学*, 2020, 41(23): 100-106.
- Wang X Y, Chen Y, Zhang J M, *et al.* Combined antimicrobial effect and mechanism of antimicrobial peptide from grass carp scale and cinnamon essential oil[J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 100-106 (in Chinese).
- [28] Ghafarifarsani H, Hoseinifar S H, Javahery S, *et al.* Effects of dietary vitamin C, thyme essential oil, and quercetin on the immunological and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 553: 738053.
- [29] Anthony K P, Deolu-Sobogun S A, Saleh M A. Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(8): C839-C843.
- [30] 王俊维, 丁旺, 陈凯, 等. 饲料添加牛至精油对异育银鲫生长、消化酶活性、肠道组织结构及血液生化指标的影响 [J]. *淡水渔业*, 2023, 53(2): 69-76.
- Wang J W, Ding W, Chen K, *et al.* Effects of dietary oregano essential oil on growth, digestive enzyme activity, intestinal tissue structure and blood biochemical indexes in *Carassius auratus* gibelio[J]. *Freshwater Fisheries*, 2023, 53(2): 69-76 (in Chinese).
- [31] Bonetti A, Tugnoli B, Piva A, *et al.* Thymol as an adjuvant to restore antibiotic efficacy and reduce antimicrobial resistance and virulence gene expression in enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains[J]. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(8): 1073.
- [32] Zahmatkesh H, Mirpour M, Zamani H, *et al.* Effect of samarium oxide nanoparticles fabricated by curcumin on efflux pump and virulence genes expression in MDR *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Cluster Science*, 2022, 34(3): 1227-1235.
- [33] Omer F H, Al-Khafaji N S K, Al-Alaq F T, *et al.* Synergistic effects of silybin and curcumin on virulence and carbapenemase genes expression in multidrug resistant *Klebsiella oxytoca*[J]. *BMC Research Notes*, 2022, 15(1): 330.
- [34] Van Alphen L B, Burt S A, Veenendaal A K J, *et al.* The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45343.
- [35] Alishahi M, Shirali T, Tabandeh M R, *et al.* Influence of *p*-coumaric acid, as a medicinal plant phenolic compound, on expression of virulence genes and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in common carp[J]. *Aquaculture International*, 2022, 30(6): 2997-3016.

Bactericidal efficacy of three plant essential oils against *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and their impact on the expression of virulence genes

YANG Xinyue^{1,2}, WANG Chunyuan², YU Yongxiang², WANG Yingeng², LI Jingze²,
LIU Dingyuan², ZHANG Zheng^{2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: To investigate the bactericidal efficacy of *Thymus mongolicus* essential oil, *Origanum vulgare* essential oil and *Cinnamomum cassia* essential oil on *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (PDD), an important pathogenic bacteria in mariculture, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of these essential oils against six PDD strains with different pathogenicity were determined through double dilution method. These strains' growth curve after adding plant essential oil was detected using spectrophotometry. The expression of virulence genes and activity of extracellular products (ECP) under different essential oil concentrations in two highly pathogenic PDD strains were analyzed. Meanwhile, the bactericidal efficacy of the plant essential oils after long-time storage and metal ions addition were studied. The results showed that the three plant oils had good bactericidal effects on the six PDD strains, with MICs of 32-128 $\mu\text{g/mL}$ and MBCs of 64-192 $\mu\text{g/mL}$. They had good inhibitory effects on the expression of virulence genes, phospholipase activity and hemolytic activity of ECP in two highly pathogenic PDD strains. Specifically, low concentration of plant essential oil exhibited significant inhibitory effects on the expression of virulence genes. After 35 days of storage away from light, the sterilization rates of the three essential oils remained above 99%, demonstrating excellent pharmacodynamic stability. The presence of different concentrations of Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ in the water environment did not exert a significant influence on the bactericidal efficacy of the three essential oils. The results showed the suitability of the three essential oils for the development of novel drugs or feed additives in aquaculture, with potential application in disease prevention and treatment. This study can provide reference for expanding the application of aromatic plant essential oil in the prevention and control of aquatic diseases.

Key words: mariculture; *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; plant essential oil; antibacterial effect; pharmacodynamic stability

Corresponding author: ZHANG Zheng. E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

Funding projects: Key Research and Development Program of Shandong Province (2021SFGC0701); Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2021MC027, ZR2020QC216)