

外膜通透剂与抗菌肽对水产革兰氏阴性病原菌协同抑制作用

李淑芳¹ 郑豪¹ 陈淑怡¹ 王洋¹ 白东清¹ 暴丽梅^{2,3}

1.天津农学院 水产学院; 2.天津现代天骄农业科技股份有限公司;

3.天津市绿色生态饲料重点实验室 天津 300384

【摘要】本研究选用重要的水产革兰氏阴性病原菌-嗜水气单胞菌ATCC35654与副溶血弧菌ATCC17802为指示菌,通过比浊法测定OD₆₀₀数值进行评价,筛选出安全性较高的烟酸作为外膜通透剂,并探讨其与抗菌肽的协同抑菌作用的量效关系。结果发现:低浓度的烟酸可以协同nisin抑制两种指示菌的生长,当烟酸浓度为0.8 mg/mL、nisin浓度为2 mg/mL时对指示菌产生相加抑菌作用,且致死率达到百分之40%以上。

【关键词】外膜通透 抗菌肽 水产养殖

Outer membrane-permeable agents cooperate with antimicrobial peptides against aquatic Gram-negative pathogens

Li Shu-fang¹ Zheng Hao¹ Chen Shuyi¹ Wang Yang¹ Bai Dongqing¹ RiMei violent^{2,3}

1. Tianjin Agricultural College, Fisheries College; 2. Tianjin Modern Tianjiao Agricultural Technology Co., Ltd.;

3. Tianjin Key Laboratory of Green and Ecological Feed; Tianjin 300384

【Abstract】In this study, the important aquatic gram-negative pathogens, *Aeromonas hydrophila* ATCC35654 and *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802 were selected as the indicator bacteria, and the OD₆₀₀ value was determined by turbidimetric method for evaluation, and niacin with high safety was screened as the outer membrane permeabilizer, and the dose-response relationship between its synergistic antibacterial effect with antimicrobial peptides was discussed. The results showed that low concentration of niacin could inhibit the growth of the two indicator bacteria in conjunction with nisin, and the niacin concentration was 0.8 mg/mL and nisin concentration of 2 mg/mL, and the lethality rate reached more than 40%.

【Key words】Permeable outer membrane Antimicrobial peptide Aquaculture

革兰氏阴性菌因外膜(OM)起着渗透屏障的保护作用从而对抗菌肽有天然抗性;有研究认为,外膜通透剂如百里酚和没食子酸^[1]、肉桂醛^[2]、树状银颗粒^[3]、苯扎氯铵^[4]、phenyllactic^[5]、植酸(phytic acid)^[6]具有增强革兰氏阴性菌外膜通透性的作用,从而使病原菌外膜的保护作用降低。基于此,本试验将外膜通透剂与抗菌肽协同作用抑制革兰氏阴性菌,筛选出较为有效的外膜通透剂与抗菌肽组合,评估抑菌效果。为水产养殖业中抗菌药物的开发与应用提供新思路,也为革兰氏阴性菌疾病的治疗与水产品的保鲜提供理论依据。

1. 材料与方法

1.1 指示菌

副溶血弧菌 17802;嗜水气单胞菌 ATCC35654 由中科质检有限公司提供

1.2 试验方法

1.2.1 外膜通透剂的筛选

将培养至对数期的嗜水气单胞菌 ATCC35654、副溶血弧菌 17802 菌液吸取 80 μ L (约 10^7 CFU/mL) 加入 96 孔板中,并分别添加外膜通透剂及抗菌肽 nisin 溶液;以仅添加空白培养基的为对照组,另设外膜通透剂处理组、nisin 处理组、外膜通透剂+nisin 协同处理组。按照不同处理组的需

求分别将外膜通透剂、nisin 溶液加入 96 孔板中,每孔外膜通透剂终浓度为 1mg/mL、nisin 终浓度为 1mg/mL,每种处理设 3 个平行,于 30℃ 培养 12 h,最后以酶标仪测定 OD₆₀₀ 值^[7]。

1.2.2 抗菌肽与外膜通透剂对革兰氏阴性水产病原菌的协同致死浓度

以嗜水气单胞菌 ATCC35654、副溶血弧菌 17802 为指示菌,将培养至对数生长期的菌液用无菌生理盐水离心(4000 r, 4 min, 4℃)洗涤 1 次,重悬后向含有指示菌的生理盐水悬液($10^4 \sim 10^6$ CFU/mL)中添加无菌生理盐水、烟酸及 nisin 使烟酸终浓度分别为 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL, nisin 终浓度分别为 1、2 mg/mL,实验分组和培养条件与 1.2.1 相同,每种处理设 3 个平行,最后以酶标仪测定 OD₆₀₀ 值及以平板计数法计算菌落数量^[8]。

2 结果与分析

2.1 数据分析方法

本研究所有数据均用 Excel2003、SPSS13.0 进行分析处理;利用 ORIGIN 8 软件绘制柱状图及折线图。

2.2 结果与分析

2.2.1 外膜通透剂的初步筛选

选用三种外膜通透剂与抗菌肽 nisin 协同抑制革兰氏阴性病原菌, 结果如图 1、2 所示, 与对照组相比, 单独使用酒石酸、烟酸时使副溶血弧菌 17802 OD₆₀₀降低, 单独使用三种外膜通透剂均使嗜水气单胞菌 ATCC35654 OD₆₀₀降低; 外膜通透剂与 nisin 共同处理组中烟酸与 nisin 的协同抑菌效果较好, 综上外膜通透剂选定烟酸。

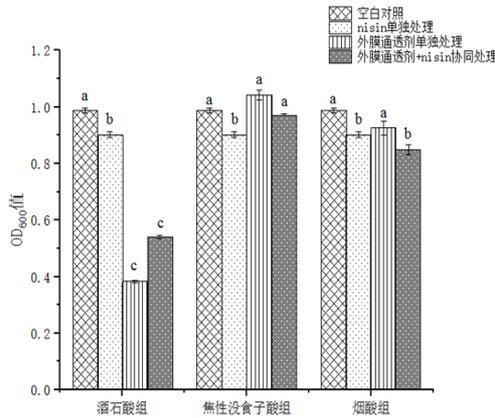


图 1 nisin 与不同外膜通透剂协同处理副溶血弧菌 17802

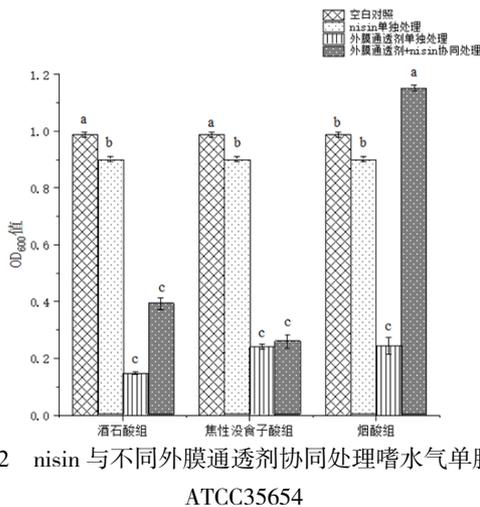


图 2 nisin 与不同外膜通透剂协同处理嗜水气单胞菌 ATCC35654

2.2.2 抗菌肽与外膜通透剂对革兰氏阴性水产病原菌的协同致死浓度

进一步筛选 nisin 与烟酸协同的适宜浓度范围, 结果如图 3 所示。对于嗜水气单胞菌 ATCC35654 (图左)、副溶血弧菌 17802 (图右) 来说, 不同浓度的烟酸协同 1.0 mg/mL 的 nisin 皆有抑菌作用, 其中 0.6 mg/mL 的烟酸协同 1.0 mg/mL 的 nisin 处理指示菌后, 指示菌的生长受到了小幅度地抑制, 0.8 mg/mL 与 1.0 mg/mL 的烟酸协同 1.0 mg/mL 的 nisin 虽然抑菌效果较好, 但使用相同浓度的烟酸单独处理时抑菌效果就已很明显, 无法判断是否能够协同 1.0 mg/mL 的烟酸作用于指示菌抑制其生长。故烟酸协同 1.0 mg/mL 的 nisin 作用于指示菌的最小抑菌浓度为 0.6 mg/mL。在图 4 中所示, 当烟酸浓度为 0.8 mg/mL、nisin 浓度为 2 mg/mL 时对指示菌产生相加抑菌作用, 且致死率达到百分之 40% 以上。

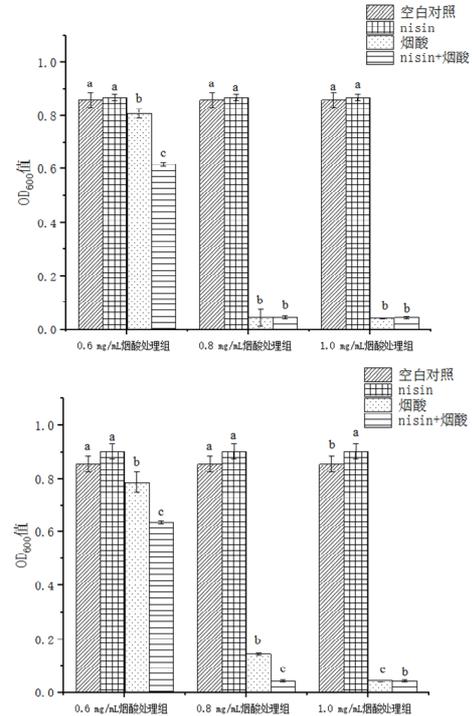


图 3 不同浓度烟酸协同低浓度 nisin (1 mg/mL) 处理副溶血弧菌 17802 后 OD₆₀₀ 值

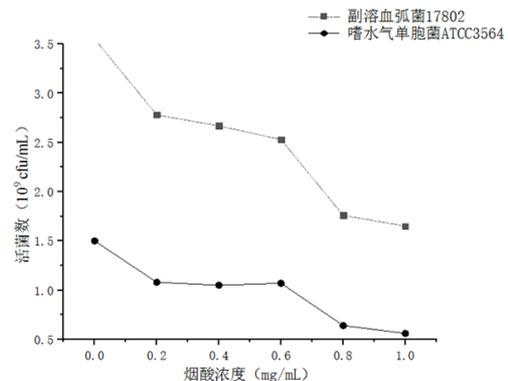


图 4 不同烟酸浓度协同 nisin (2 mg/mL) 处理后 12 h 活菌数 (cfu/mL)

3 讨论

相关研究表明抗菌肽的抑菌机制大致分为三类: 抑制细胞壁的合成^[9], 作用于细胞质膜^[10]; 影响细胞基因表达和蛋白质合成^[11], 作用于细胞壁磷脂 II, 干扰细胞壁的合成^[12], 或作用于细胞质膜形成孔洞, 破坏细胞膜电位^[13, 14], 导致细胞生长抑制或者死亡。而在本研究中发现抗菌肽 nisin 单独处理时对指示菌均无生长抑制或者致死作用, 这与部分报道类似, 即 nisin 对革兰氏阴性菌的作用有限^[15], 试验显示低浓度抗菌肽 nisin 对指示菌有小幅度的生长促进作用, 目前机理尚未明确。推测该类肽可能作为菌体生长的营养物质, 或者作为信号物质影响菌体代谢, 从而促进菌体生长。

实验中单独使用低浓度烟酸处理病原菌时菌株 OD₆₀₀ 数

值下降,而当烟酸与 nisin 协同处理病原菌时,菌体的生长进一步受到抑制,致死率显著升高,且抑制强度随着烟酸浓度的增加而提高。有相关研究表明,有机酸作为小分子可以穿过细菌外膜的孔道进入细胞质,作用于磷酸和脂多糖,从

而破坏细菌外膜的完整性,使细菌细胞的内容物外泄,达到抑菌效果^[16]。据此推测烟酸破坏了菌体的外膜,从而使 nisin 可以直接作用于细菌的细胞质抑制其生长,因此烟酸协同 nisin 可以达到一定的抑菌效果。

参考文献

- [1]SAVAGE, PAUL B. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of gram-negative bacteria [J]. *Annals of Medicine*, 2001, 33 (3): 167-71.
- [2]HAMMER K A, HEEL K A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 40 (3): 239-45.
- [3]CIEPLUCH K, SKRZYNIARZ K, BARRIOS-GUMIEL A, et al. Dendronized Silver Nanoparticles as Bacterial Membrane Permeabilizers and Their Interactions With *P. aeruginosa* Lipopolysaccharides, Lysozymes, and Phage-Derived Endolysins [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10 (2771).
- [4]GRAVEL J, PARADIS-BLEAU C, SCHMITZER A R. Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent [J]. *Medchemcomm*, 2017, 10.1039.C7MD00113D.
- [5]VAARA. Agents that increase the permeability of the outer membrane [J]. *Microbiological Reviews*, 1992, 56 (3): 395-411.
- [6]IRVIN R T, MACALISTER T J, COSTERTON J W. Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer modification of *Escherichia coli* outer membrane permeability [J]. *Journal of Bacteriology*, 1981, 145 (3): 1397-403.
- [7]马欢欢,林洋,吕欣然, et al. 96孔板法筛选抗黑曲霉性乳酸菌及抑菌机理研究 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(012): 171-5.
- [8]丁华,王建清,王玉峰, et al. 罗勒精油和 Nisin 复配抑菌剂抑菌效果的研究 [J]. *中国调味品*,
- [9]HASPER H E, KRAMER N E, SMITH J L, et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II [J]. *Science*, 2006, 313 (5793): 1636-7.
- [10]MOLL G N, KONINGS W N, DRIESSEN A J. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, 76 (1-4): 185-98.
- [11]COTTER P D, R PAUL R, COLIN H. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics. [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11 (2): 95-105.
- [12]BREUKINK E, DE KRUIJFF B. Lipid II as a target for antibiotics [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2006, 5 (4): 321.
- [13]BIERBAUM G, H-G S. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, 10 (1) .
- [14]MARTIN N I, BREUKINK E. Expanding role of lipid II as a target for lantibiotics [J]. *Future Microbiology*, 2007, 2 (5): 513-25.
- [15]姜旭德,张春华. 乳酸菌素及其乳酸链球菌素在食品中的应用 [J]. *中国乳业*, 2017, 000 (002): 60-2.
- [16]张皓然,刘金松,张玲玲, et al. 植物精油与有机酸的抑菌效果及协同作用研究 [J]. *饲料工业*, 2018, 39 (18): 52-6.

作者简介:

- 1.李淑芳(1999.03),女,汉族,天津武清人,硕士,天津农学院,水产学院,职称无,研究方向:水产微生物
- 2.郑豪(2002.08),男,汉族,贵州遵义人,本科,天津农学院,水产学院,职称无,研究方向:水产微生物
- 3.陈淑怡(1999.04),女,汉族,黑龙江鸡西人,本科,天津农学院,水产学院,职称无,研究方向:水产微生物
- 4.通讯作者简介:王洋(1986.06),女,汉族,吉林人,博士,天津农学院,水产学院,讲师,研究方向:水产微生物
- 5.白东清(1970.12),女,汉族,河北迁安人,博士,天津农学院,乡村振兴研究院,教授,研究方向:水产动物营养与饲料学
- 6.暴丽梅(1987.12),女,蒙古族,天津市人,硕士,天津现代天骄水产饲料股份有限公司,中级农艺师,研究方向:水产动物营养与饲料学

受天津市绿色生态饲料重点实验室开放课题“产抗菌肽水产益生菌的选育及应用效果评价”(TJ202313);国家自然科学基金(青年科学基金项目31702360),国家级大学生创新创业训练计划项目(202310061034)以及天津市淡水养殖产业技术体系营养需求与饲料岗位(ITFRS2021000-011)的资助。