

纳米二氧化铈对 2 种水产病原弧菌的抑菌活性研究

杨 钰¹, 郑雯雯¹, 宇文斌¹, 许颖洁¹, 张 星¹, 宋学宏², 秦粉菊¹

1. 苏州科技大学 化学与生命科学学院, 江苏 苏州 215009

2. 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123

摘要: 纳米二氧化铈 (nCeO₂) 是一种重要的新型高抗氧化性稀土金属氧化物。为开发高效、环保且无耐药性的新型抗菌剂, 通过高温煅烧六水合硝酸铈[Ce(NO₃)₃·6H₂O] 研磨制得 nCeO₂, 探究了 nCeO₂ 对创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 和副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 的抑菌活性, 并利用罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 体内实验对 nCeO₂ 的抑菌效果进行验证。结果显示: 1) 所得 nCeO₂ 较为纯净, 颗粒直径为 25.03 nm, Zeta 电位 (mV) 为 -5.65, 在溶液中分散均匀。2) nCeO₂ 对创伤弧菌和副溶血弧菌的最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 128 和 256 μg·mL⁻¹, 最小杀菌浓度 (MBC) 均为 512 μg·mL⁻¹; nCeO₂ 对创伤弧菌和副溶血弧菌的抑菌环直径分别为 21.50 和 17.42 mm。3) 3 种浓度 nCeO₂ (1/2 MIC、1 MIC、2 MIC) 均能显著抑制 2 种弧菌的生长活力, 同时提高其胞外碱性磷酸酶 (AKP) 活性、菌液相对导电率、胞外核酸和可溶性蛋白质含量 ($p < 0.05$)。4) nCeO₂ 拌料饲喂显著降低了创伤弧菌和副溶血弧菌感染模型中罗氏沼虾的死亡率 ($p < 0.05$)。研究表明 nCeO₂ 对副溶血弧菌和创伤弧菌体外和体内均具有良好的抑杀作用, 其抗菌作用可能与其破坏菌体细胞壁、细胞膜完整性和细胞膜通透性有关。

关键词: 纳米二氧化铈; 水产病原弧菌; 抑菌活性; 创伤弧菌; 副溶血弧菌

中图分类号: S 963.73⁺4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Study on bacteriostatic activity of nanocerium dioxide against two aquatic pathogenic *Vibrio* spp.

YANG Yu¹, ZHENG Wenwen¹, YU Wenbing¹, XU Yingjie¹, ZHANG Xing¹, SONG Xuehong², QIN Fenju¹

1. School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China

2. School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: Nanocerium dioxide (nCeO₂) is an important new type of rare earth metal oxide with high oxidation resistance. In order to develop new antimicrobial agents which are efficient, environmentally friendly and non-resistant, we obtained nCeO₂ from cerium nitrate hexahydrate by high temperature calcination. We studied the *in vitro* antibacterial activity of nCeO₂ on two kinds of aquatic pathogens (*Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus*), and verified the antibacterial effect of nCeO₂ by *in vivo* experiment of *Macrobrachium rosenbergii*. The results show that: 1) The obtained nCeO₂ was relatively pure. The particle diameter was 25.03 nm, the Zeta potential (mV) was -5.65, and the dispersion in the solution was relatively uniform. 2) The minimum inhibitory concentrations (MIC) of nCeO₂ against *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* were 128 and 256 μg·mL⁻¹, respectively, and the minimum bactericidal concentrations (MBC) all were 512 μg·mL⁻¹. The diameter of the inhibition ring was 21.50 mm for *V. vulnificus* and 17.42 mm for *V. parahaemolyticus*. 3) The three concentrations of nCeO₂ (1/2 MIC, 1 MIC and 2 MIC) all significantly improved the extracellular AKP activity, relative conductivity of bacterial solution, nuc-

收稿日期: 2024-03-08; 修回日期: 2024-05-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772896); 苏州市科技计划项目 (SNG2017055)

作者简介: 杨 钰 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境生物技术。E-mail: yyangyu_yu@163.com

通信作者: 秦粉菊 (1976—), 女, 教授, 博士, 研究方向为环境毒理学和纳米营养学。E-mail: qinfenju@mail.usts.edu.cn

leic acid content and soluble protein content in the extracellular ($p<0.05$). 4) The nCeO_2 supplementation in the feed significantly reduced the mortality of *M. rosenbrei* in *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* infection models ($p<0.05$). The results indicate that nCeO_2 has a good inhibitory effect on aquatic pathogens *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*, and the antibacterial action may be related to its destruction of cell wall membrane integrity and cell membrane permeability.

Keywords: nCeO_2 ; Aquatic pathogenic *Vibrio* spp.; Antibacterial activity; *Vibrio vulnificus*; *Vibrio parahaemolyticus*

养殖水质对水产动物的生长和健康至关重要^[1]。水中的某些病原性弧菌可能会对水产养殖造成影响,严重时甚至导致疾病爆发,影响水产动物的生长发育和存活率^[2]。创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)是革兰氏阴性菌,在养殖水体和沉积物中广泛存在^[3]。据报道,创伤弧菌和副溶血弧菌可对水产动物健康造成重大威胁,引起不同程度的疾病并导致养殖效益和产量大幅下降^[4-5]。创伤弧菌可以分泌多种毒力因子,包括溶血素、细胞外毒素和细胞壁成分等,破坏宿主细胞和组织,引发坏死性伤口感染、导致组织坏死、出血和炎症反应及原发性创伤弧菌败血症等严重疾病^[6-7]。研究表明,副溶血弧菌主要通过致病毒力因子耐热直接溶血素(Thermostable direct hemolysin, TDH)和耐热相关溶血素(Thermostable Related Hemolysin, TRH)引起水产养殖动物消化不良、进食减少,是急性肝胰腺坏死病的主要致病菌^[8]。抗生素一直是治疗和预防由创伤弧菌和副溶血弧菌引起的疾病的主要方法,但2020年7月1日起已被农业农村部第194号公告规定禁止在饲料中添加。由此,开发高效环保且无耐药性的新型抗菌剂尤为迫切。

纳米二氧化铈(nCeO_2)是一种重要的新型高抗氧化性稀土金属氧化物,更因其对生物细胞的低毒性在抗菌领域得到广泛应用^[9]。静电相互作用在 nCeO_2 抗菌过程中发挥重要作用。同时,抗菌过程还伴随活性氧(ROS)的产生和纳米粒子对细菌的机械损伤^[10]。 nCeO_2 的抑菌效果受价态比例($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$)和环境pH的共同影响。在水产养殖环境偏碱性的情况下,具有更小纳米尺寸、表面带正电荷的 nCeO_2 进一步增强了对革兰氏阴性菌的吸附和渗透能力,从而提升了抗菌效果^[11]。但是目前尚未见 nCeO_2 对创伤弧菌和副溶血弧菌的抗菌活性的研究报道。本研究采用96孔板微量法、平板涂布法和K-B纸片法测定 nCeO_2 对2种弧菌的体外抑杀活性,以酶标仪结合试剂盒法分析抗菌作

用途,并利用罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)感染模型验证其体内抑菌效果,为 nCeO_2 作为水产弧菌抗菌剂的应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株:创伤弧菌(*V. vulnificus*, ATCC27562)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*, ATCC17802),来源于江苏省水产动物营养重点实验室。含 nCeO_2 (自制)饵料:采用逐级扩大混合的方法,以128和 $256 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的水平添加到罗氏沼虾基础饵料(苏州鑫裕饲料有限公司)中备用。

1.2 nCeO_2 制作

称取适量六水合硝酸铈 [$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 阿拉丁生化科技股份有限公司]于马弗炉(凯科仪器)中热分解,升温速率 $4 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,煅烧温度为 $550 \text{ }^\circ\text{C}$,持续3 h。煅烧结束自然冷却,再将所得材料于研钵中磨碎,得到淡黄色的 nCeO_2 颗粒。对所得 nCeO_2 利用X射线粉末衍射仪(德国Bruker)和高分辨透射电子显微镜(日本电子株式会社)分析其表征,使用电位测试仪(美国麦奇克公司)分析材料Zeta电位,测定其在溶液中的分散性。

1.3 2种水产病原弧菌悬液制备

取 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存的创伤弧菌和副溶血弧菌 $1 \mu\text{L}$,分别划线接种到2216E琼脂培养板上, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养18 h。挑选单菌落接种于2216E液体培养基中,置 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床(上海知楚)振荡培养20 h后,采用麦氏比浊法测定其菌落数,稀释至 $1.0\times 10^7 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液^[12]。

1.4 nCeO_2 的体外抗水产病原弧菌活性测定

1.4.1 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

采用96孔板微量法测定 nCeO_2 对2种水产病原菌的最小抑菌浓度^[13]。将创伤弧菌、副溶血弧菌分别接入2216E液体培养基中在摇床上培育($30 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)至对数生长期的后期。将配制好的 nCeO_2 溶液,超声分散均匀(昆山市超声仪

器),在96孔细胞培养板中倍比稀释,质量浓度分别为2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8、4和0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,每孔药液体积100 μL ;每孔3个重复。将菌液用2216E液体培养基稀释到 1×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$,向每孔药液中依次加入100 μL 菌悬液,使每孔的终质量浓度依次为:1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2和0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。混匀后,利用酶标仪在600 nm波长处测定OD值,然后将96孔细胞培养板置于30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温振荡培养箱中分别培养8 h(创伤弧菌)和16 h(副溶血弧菌)。利用酶标仪(美国Biotek)在600 nm波长处测定OD值,OD值变动在5%以内的最小浓度值即为最小抑菌浓度(MIC)。取大于MIC浓度孔内10 μL 菌液,利用平板涂布法接种到2216E琼脂培养基上,30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h后观察菌落生长情况,以不生长细菌对应孔中的最低浓度为nCeO₂的MBC。

1.4.2 nCeO₂对创伤弧菌和副溶血弧菌的体外抑菌效果测定

nCeO₂对创伤弧菌和副溶血弧菌的抑菌效果,利用纸片扩散法(K-B法)测定其抑菌环直径进行评价。取512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的nCeO₂溶液,超声分散,吸取10 μL 于无菌空白药敏片上,60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干,制备nCeO₂的药敏片。取 2.0×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液100 μL 于2216E琼脂板上,无菌涂布棒推匀菌液,静置10 min,放置nCeO₂药敏片,每个样品设置3个平行。30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养18 h后,用游标卡尺测定抑菌环直径。根据抑菌环直径对敏感性进行评价:极敏感(直径>20 mm),高敏感(15~19 mm),中敏感(10~15 mm),低敏感(5~10 mm),不敏感(≤ 6 mm)^[14]。

1.5 nCeO₂对创伤弧菌和副溶血弧菌的抗菌作用途径

1.5.1 nCeO₂对创伤弧菌和副溶血弧菌生长活力的影响

使用96孔板测定不同浓度(0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC)的nCeO₂对创伤弧菌和副溶血弧菌生长活力的影响。将对数生长期的菌液调整为OD_{600 nm}=0.1,药液混合,配制成含不同质量浓度nCeO₂的200 μL 混合体系,每个浓度的菌液接36个复孔,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养12 h。期间,每隔1 h利用酶标仪于600 nm处测OD值,直至菌体稳定生长。分别以时间为横坐标,

600 nm处OD值为纵坐标,绘制创伤弧菌和副溶血弧菌的生长曲线。

1.5.2 创伤弧菌和副溶血弧菌细胞壁、细胞膜完整性和细胞膜通透性测定

取对数生长期的菌液(OD_{600 nm}=0.1),添加nCeO₂形成不同质量浓度(0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1/2 MIC、1 MIC和2 MIC)200 μL 混合体系。将混合液接种于96孔细胞培养板,每个浓度接21个重复孔,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床培养6 h。每隔1 h取出含菌培养液,经4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心15 min后,取上清液,用酶标仪于260 nm波长处测定OD值,评估水产病原菌细胞内核酸含量;根据碱性磷酸酶(AKP)试剂盒和BCA试剂盒说明书操作步骤,分别在波长520和562 nm处测定OD值,计算上清液中AKP活性和可溶性蛋白质浓度。

收集对数生长后期(OD_{600 nm} = 1.5)的创伤弧菌和副溶血弧菌,离心并用50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液洗涤菌体制得等渗溶液。继而向等渗菌液中分别添加不同浓度的nCeO₂(0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC),混匀,在30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的振荡培养箱中培养6 h,分别在第0、第1、第2、第3、第4、第5、第6小时测定电导率(上海仪电),分别记录为L1;再向5%的葡萄糖溶液对应操作测定电导率,记录为L'1。实验结束后,将两种等渗菌悬液煮沸5 min,冷却后测定电导率(L0)。以 $[(L1-L'1)/L0]\times 100\%$ 计算所测相对电导率^[15]。

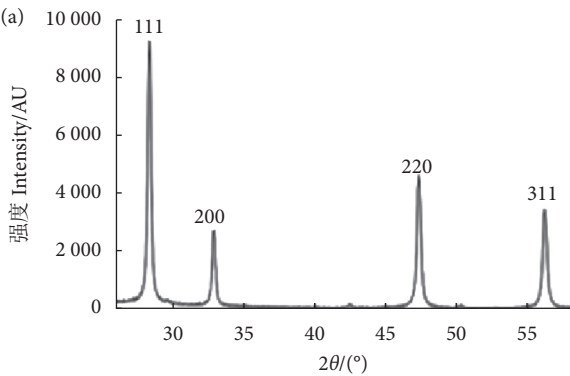
1.6 nCeO₂拌料饲喂罗氏沼虾对2种弧菌感染模型死亡率的影响

罗氏沼虾养于150 L塑料箱中,水温30 $^{\circ}\text{C}$,溶解氧质量浓度 ≥ 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 7.7~8.2,光周期为光暗(14 h : 10 h)循环,(5.2 \pm 0.4) g的健康罗氏沼虾腹部注射建立创伤弧菌人工感染模型^[16]。将180尾虾分为3组,每组60尾。2个感染模型组在第2腹节基部注射100 μL 菌量为 5×10^7 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的创伤弧菌,空白对照组注射相同体积的PBS缓冲液。注射后,立即对其中一个模型组罗氏沼虾饲喂含128 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ nCeO₂的饵料(参考1.4.1中所测MIC浓度),另一个模型组和空白对照组饲喂空白饵料,12 h 1次,连续6 d。本攻毒试验重复3次。记录感染后6 d内的死亡情况。同样方式,以第2腹节基部注射100 μL 菌量为 5×10^7 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的副溶血弧菌液建立罗氏沼虾副溶血弧菌人工感染模型,继而立即对1个感染模型组饲

喂 256 mg·kg⁻¹ nCeO₂ 的饵料 (参考 1.4.1 中所测 MIC 浓度), 记录感染后 6 d 内的死亡情况并重复 3 次。

1.7 统计分析

应用 Excel 2019 和 SPSS 18.0 软件对所有实验数据进行统计, 以“平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$)”表示。经单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan's 多重比较确定各组数据间差异显著性, 显著性水平 α 设为 0.05。



2 结果

2.1 nCeO₂ 表征

对所得 nCeO₂ 经 X 射线粉末衍射仪和高分辨透射电子显微镜分析其表征, 所得 nCeO₂ 为较纯净的氧化铈, 颗粒直径为 25.03 nm (图 1)。使用电位测试仪分析所制 nCeO₂ 的 Zeta 电位为 (-5.65±0.22) mV, 说明其在溶液中分散较为均匀, 体系稳定性更好, 不易发生团聚。

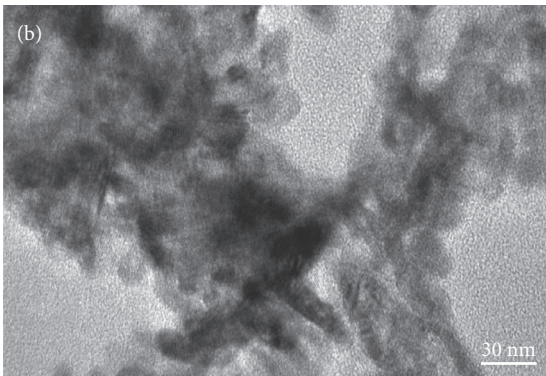


图1 所制得纳米二氧化铈的表征
注: a. 纳米二氧化铈 X 射线粉末衍射测试结果; b. 纳米二氧化铈透射电镜结果。

Fig. 1 Characterization of test nCeO₂

Note: a. Results of XRD test; b. Transmission electron microscope of nCeO₂.

2.2 最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌质量浓度 (MBC)

经过抑菌活性测试, nCeO₂ 对创伤弧菌和副溶血弧菌均表现出良好的抑制作用, 其中 nCeO₂

对创伤弧菌和副溶血弧菌的 MIC 分别为 128 和 256 μg·mL⁻¹, MBC 均为 512 μg·mL⁻¹ (表 1)。结果表明 nCeO₂ 可以预防或者治疗水产病原弧菌感染。

表1 纳米二氧化铈对 2 种水产病原弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度
Table 1 MIC and MBC of nCeO₂ against two aquatic pathogenic *Vibrio* species

菌种 Strain	最小抑菌浓度 MIC/(μg·mL ⁻¹)	最小杀菌浓度 MBC/(μg·mL ⁻¹)	比值 MBC/MIC
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	128	512	3
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	256	512	2

2.3 nCeO₂ 对创伤弧菌和副溶血弧菌的体外抑菌效果

表 2 结果显示, nCeO₂ 对创伤弧菌的抑菌环直径为 (21.50±1.48) mm, 表现出极敏感性; 对副溶血弧菌的抑菌环直径为 (17.42±0.78) mm, 表现出高敏感性。与副溶血弧菌相比, nCeO₂ 对创伤弧菌的体外抑菌活性更强。

2.4 nCeO₂ 的抗菌作用

2.4.1 nCeO₂ 对 2 种弧菌生长活力的影响

从图 2 中可知, 创伤弧菌和副溶血弧菌在正

表2 纳米二氧化铈对 2 种水产病原弧菌的抑菌效果
Table 2 Antibacterial effects of nCeO₂ on two aquatic pathogenic *Vibrio* species

菌种 Strain	抑菌环直径 Zone of inhibition/mm				敏感性 Sensitivity
	n1	n2	n3	平均 Mean	
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	22.79	19.89	21.83	21.50±1.48	+++
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	17.55	18.14	16.59	17.42±0.78	++

注: +++, 极敏感; ++, 高敏感。
Note: +++. Extremely sensitive; ++. Highly sensitive.

常培养 (nCeO_2 , $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组 0~12 h 内的 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值不断提高, 其中, 创伤弧菌在第 9 小时进入稳定期。相比 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 nCeO_2 对照组, $1/2 \text{ MIC}$ 的 nCeO_2 对创伤弧菌和副溶血弧菌的生长速率均有一定程度的抑制; 培养 12 h 后, $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 分别下降了 0.441 和 0.508。当质量浓度为 1 MIC 时, nCeO_2 对创伤弧菌和副溶血弧菌的生长有

非常显著的抑制作用, 相比添加 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 nCeO_2 对照组, 创伤弧菌和副溶血弧菌的 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 分别下降了 0.999 和 1.139。当 nCeO_2 质量浓度为 2 MIC 时, 2 种菌的 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 基本不变, 其生长均受到完全抑制。由此表明, nCeO_2 对 2 种水产病原弧菌的抗菌能力随药物浓度的提高而增强。

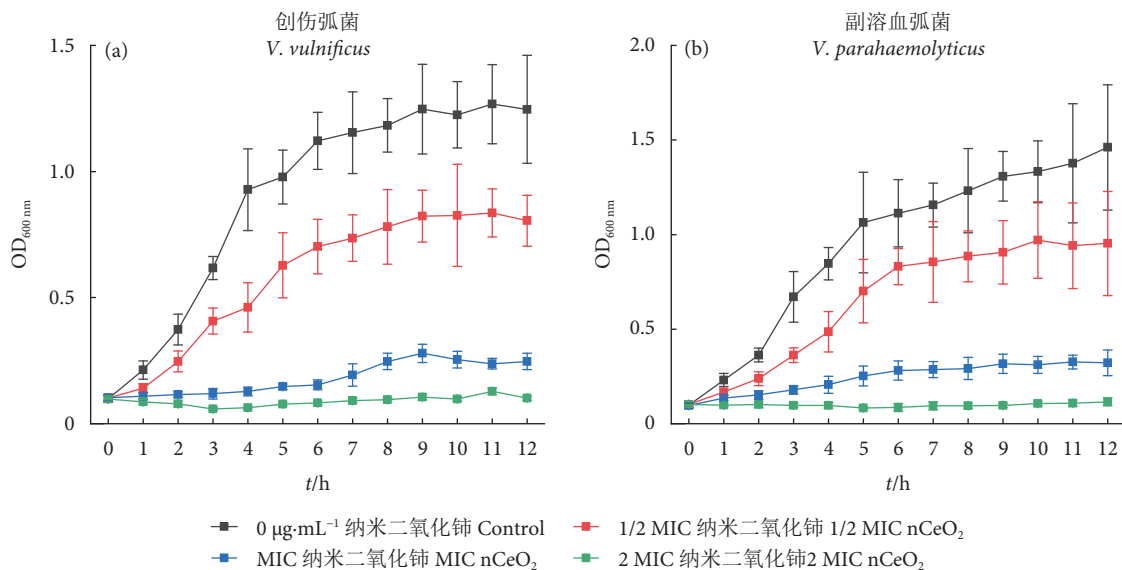


图2 不同质量浓度纳米二氧化铈下创伤弧菌/副溶血弧菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *V. vulnificus*/*V. parahaemolyticus* with different mass concentrations of nCeO_2

2.4.2 nCeO_2 对 2 种弧菌细胞壁完整性的影响

由图 3 可知, 创伤弧菌和副溶血弧菌的正常对照组 (nCeO_2 , $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 其胞外 AKP 活性在培养 6 h 后, 无明显变化。当添加 $1/2 \text{ MIC}$ nCeO_2 时, 创伤弧菌和副溶血弧菌胞外 AKP 活性均都在第 1 小时显著增加 ($p < 0.05$)。但副溶血弧菌胞外 AKP 活性在第 1 小时增加明显, 而创伤弧菌胞外 AKP 活性在第 4 小时增加明显。当添加 nCeO_2 提升至 1 MIC 和 2 MIC 时, 胞外 AKP 活性显著增加 ($p < 0.05$), 这说明菌体细胞壁受到明显破坏, 导致胞内 AKP 严重外泄, 且 nCeO_2 对副溶血弧菌的作用相比于创伤弧菌更明显。实验表明, nCeO_2 能够有效破坏创伤弧菌和副溶血弧菌细胞壁的完整性, 且随着浓度增加, 其破坏能力增强。

2.4.3 nCeO_2 对 2 种弧菌细胞膜通透性的影响

由图 3 可知, 创伤弧菌和副溶血弧菌的正常对照组 (nCeO_2 , $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 其相对导电率在培养 6 h 后, 无明显变化。当添加 $1/2 \text{ MIC}$ 浓度 nCeO_2 时, 其菌液的相对导电率随着培养时间延长, 在后

期开始增加, 创伤弧菌在培养第 6 小时显著增加 ($p < 0.05$), 副溶血弧菌在第 4 小时开始显著增加 ($p < 0.05$); 而当添加 nCeO_2 浓度提高至 1 MIC 时, 其菌液的相对导电率显著变化时间发生前移, 均在培养第 3 小时开始显著提升 ($p < 0.05$); 而当添加 nCeO_2 浓度提高至 2 MIC 时, 创伤弧菌和副溶血弧菌菌液相对导电率发生显著变化的时间分别为培养第 2 小时后和第 1 小时后 ($p < 0.05$)。结果表明, nCeO_2 能够有效破坏创伤弧菌和副溶血弧菌细胞膜的通透性, 且作用强弱与 nCeO_2 浓度和作用时间呈正相关。

2.4.4 nCeO_2 对 2 种弧菌细胞膜完整性的影响

由图 4 可知, 创伤弧菌和副溶血弧菌的正常对照组的胞外核酸和可溶性蛋白质在培养 6 h 后, 均处于较低水平, 无明显变化; 在添加浓度为 $1/2 \text{ MIC}$ 时, 2 种弧菌的胞外核酸含量均显著增加 ($p < 0.05$), 创伤弧菌的胞外可溶性蛋白质在第 2 小时开始显著增加 ($p < 0.05$), 副溶血弧菌在第 4 小时开始显著增加 ($p < 0.05$); 而当添加浓度达到 1

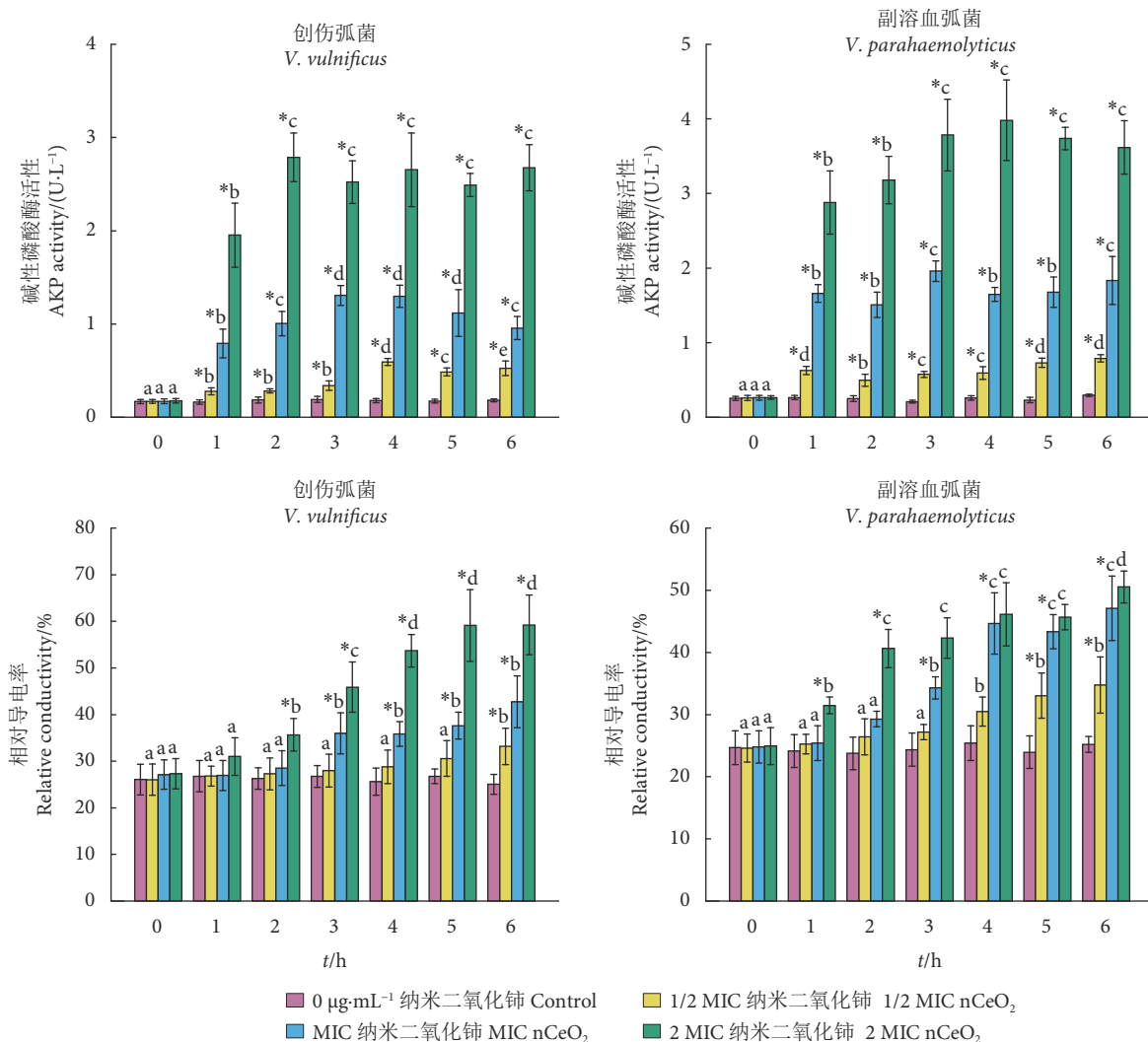


图3 不同浓度纳米二氧化铈下创伤弧菌/副溶血弧菌的胞外 AKP 酶活性和相对导电率

注: 相同处理时点情况下, 不同浓度纳米二氧化铈处理组中, *. $p < 0.05$; 同一颜色不同英文字母上标表示相同浓度纳米二氧化铈处理下不同时间点差异显著 ($p < 0.05$)。

Fig. 3 Extracellular AKP activities and relative conductivity of *V. vulnificus*/*V. parahaemolyticus* with different concentrations of nCeO₂

Note: In the group treated with the different concentrations of nano-cerium dioxide at the same time point, *. $p < 0.05$; Different lowercase letters within the same color indicate significant differences at different time points under the treatment of the same concentration of nano-cerium dioxide ($p < 0.05$).

MIC 和 2 MIC 时, 其菌液的胞外核酸均显著提升 ($p < 0.05$), 胞外可溶性蛋白质含量显著变化时间发生前移, 均在第 1 小时开始显著提升 ($p < 0.05$), 这说明菌体细胞膜受到明显破坏, 引起胞内核酸和可溶性蛋白质严重外排。结果表明, nCeO₂ 能够有效破坏创伤弧菌和副溶血弧菌细胞膜的完整性, 且其作用随 nCeO₂ 浓度的提高而增强。

2.5 nCeO₂ 拌料饲喂罗氏沼虾对 2 种弧菌感染模型死亡率的影响

罗氏沼虾人工感染创伤弧菌后, 在 6 d 内累积死亡率为 97.22%, 给予 128 mg·kg⁻¹ 的 nCeO₂ 拌食

添加后, 累积死亡率降低为 41.67%, 免疫保护率达 57.14%。罗氏沼虾人工感染副溶血弧菌后, 6 d 内累积死亡率为 93.33%, 给予 256 mg·kg⁻¹ 的 nCeO₂ 拌食添加后, 累积死亡率为 35.56%, 免疫保护率达 61.90% (图 5)。

3 讨论

3.1 nCeO₂ 对 2 种水产病原弧菌的体内外抑菌活性

弧菌病是目前多种水产养殖动物最常见的细菌性疾病之一, 对鱼、虾和甲壳类动物产生不利影响, 导致较高的死亡率和严重的经济损失^[17]。体

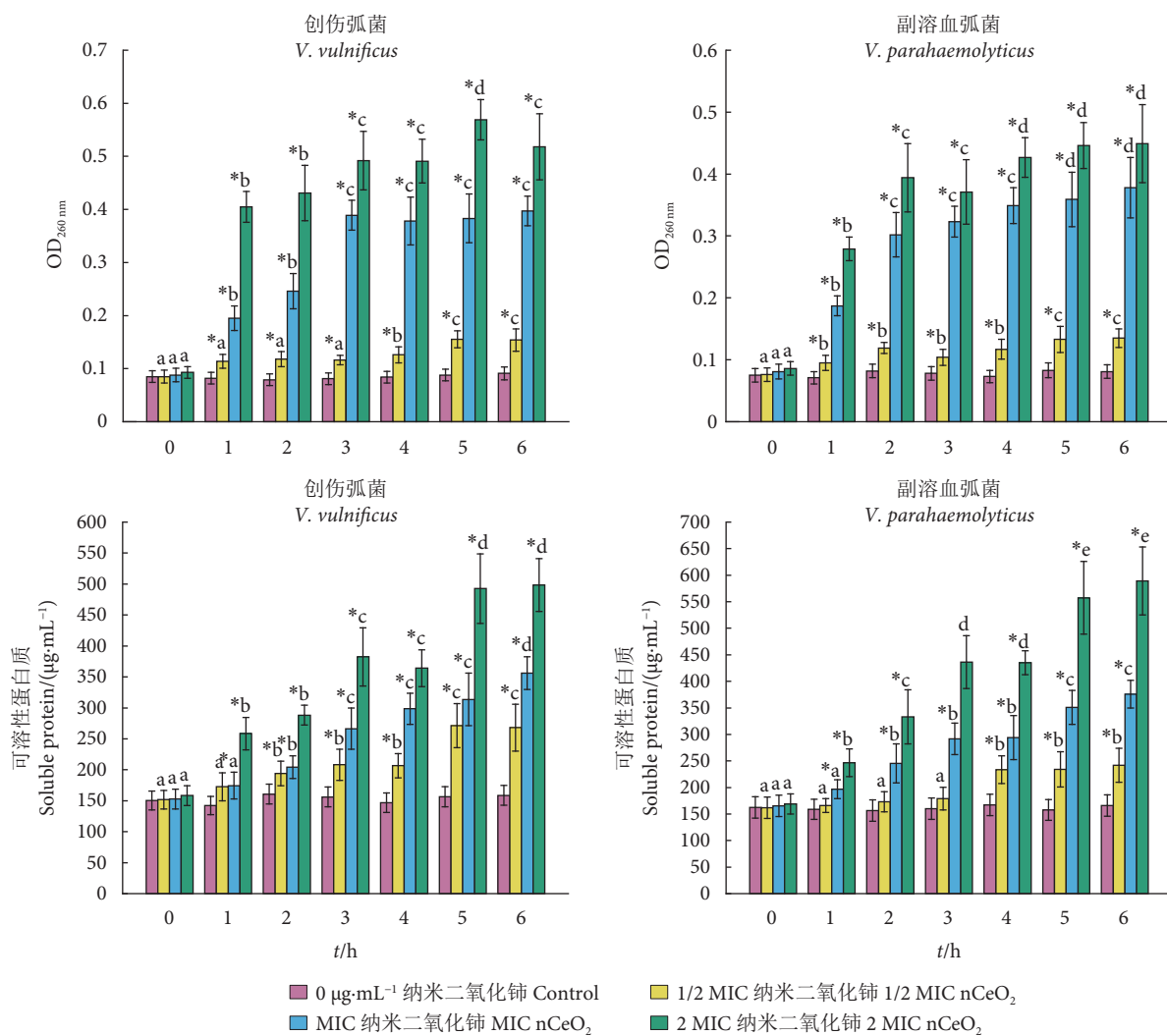


图4 不同浓度纳米二氧化铈下创伤弧菌/副溶血弧菌的胞外核酸和可溶性蛋白质

注：相同处理时点情况下，不同浓度纳米二氧化铈处理组中，*， $p < 0.05$ ；同一颜色不同英文字母上标表示相同浓度纳米二氧化铈处理下不同时间点差异显著 ($p < 0.05$)。

Fig. 4 Extracellular nucleic acid and soluble protein content of *V. vulnificus*/*V. parahaemolyticus* with different concentrations of nCeO₂

Note: In the group treated with the different concentrations of nano-cerium dioxide at the same time point, *, $p < 0.05$; Different lowercase letters within the same color indicate significant differences at different time points under the treatment of the same concentration of nano-cerium dioxide ($p < 0.05$).

外抗菌性能评价是开发有效防控弧菌水产致病菌免疫增强剂药物的重要前期环节。MIC 是指能够抑制微生物生长的抗菌剂的最小浓度，可作为体外抑菌性能的指标^[18]。MBC 是指能够在无抗生素培养基上重新培养后抑制细菌生长的最低抗菌剂浓度^[19]。随着我国禁止在水产动物饲料中添加抗生素政策的实施，各类生物防治药物和新型免疫增强剂成为控制水产动物弧菌病的重要途径^[20]。Vinu 等^[21]指出纳米氧化锌、纳米氧化铜和硒纳米颗粒等纳米材料对副溶血弧菌均有良好的抑菌效果。本研究中 nCeO₂ 对创伤弧菌和副溶血弧菌的 MIC 分别为 128 和 256 µg·mL⁻¹，MBC 均为 512 µg·mL⁻¹，

说明 nCeO₂ 的体外抑菌活性更佳。本研究中，nCeO₂ 对创伤弧菌和副溶血弧菌的抑菌环直径分别达 (21.50±1.48) 和 (17.42±0.78) mm，显示出极敏感性和高敏感性，进一步说明 nCeO₂ 对水产弧菌具有高性能的抑菌活性。这可能是由于 nCeO₂ 颗粒粒径更小，可与菌体的接触面积更大和结合点位有关。

创伤弧菌和副溶血弧菌是引发水产动物死亡的 2 种重要致病弧菌。因此，建立相应弧菌感染水产动物模型是筛选其抗菌药物或免疫增强剂的重要途径。陈秀霞等^[22]发现，用菌量为 3.3×10⁸ CFU·mL⁻¹ 的创伤弧菌液 (FZ03-5X) 浸泡感染 5 h，孔雀

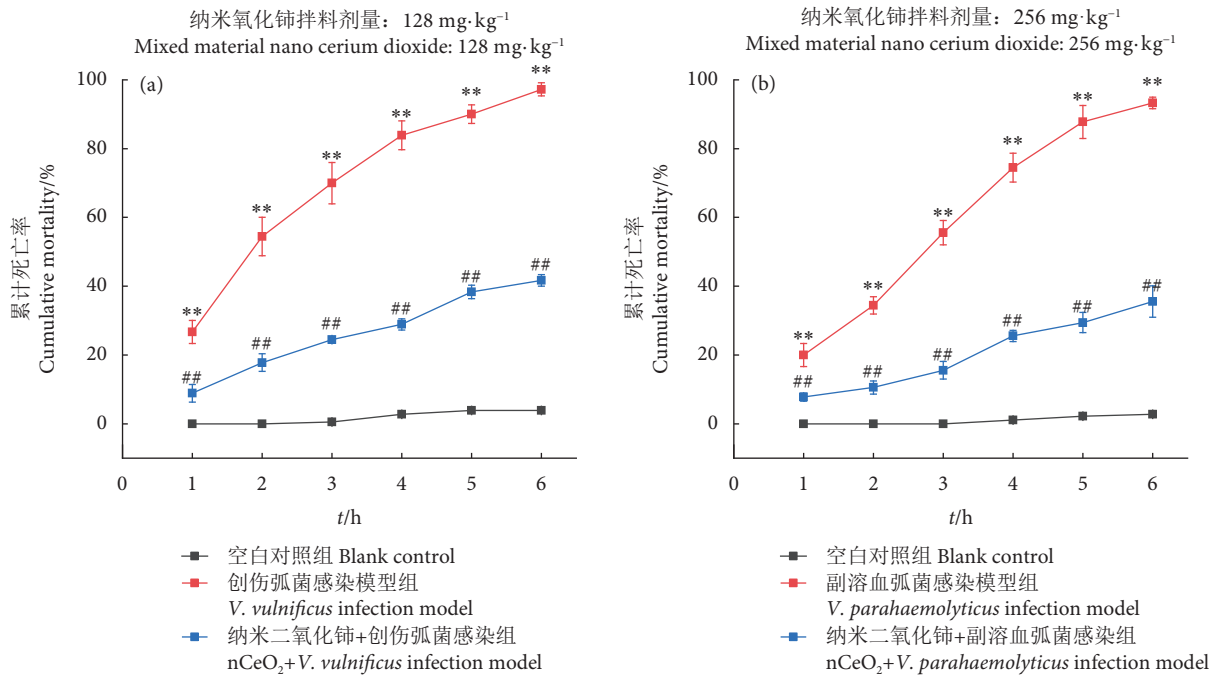


图5 拌料纳米二氧化铈对罗氏沼虾创伤弧菌/副溶血弧菌感染模型累积死亡率的影响

注: 感染模型组与空白对照组比较, *. $p < 0.05$, **. $p < 0.01$; 纳米二氧化铈+感染组与感染模型组比较, #. $p < 0.05$, ##. $p < 0.01$ 。

Fig. 5 Effects of mixed material nCeO₂ on cumulative mortality of *V. vulnificus*/*V. parahaemolyticus* infection model of *M. rosenbergii*

Note: Infection model group compared with the blank group, *. $p < 0.05$, **. $p < 0.01$; nCeO₂+infection model group compared with the infection model group, #. $p < 0.05$, ##. $p < 0.01$.

鱼 (*Guppy*) 的死亡率可达 40%; 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 中分离的创伤弧菌对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的半数致死剂量 (LD₅₀) 为 4.92×10^3 CFU·g⁻¹, 具有较强的毒力^[23]。有研究表明, 注射 100 μ L 菌量为 1×10^7 或 1×10^8 CFU·mL⁻¹ 的副溶血弧菌, 对红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 具有极高的致死性, 注射菌量为 4.0×10^6 CFU·mL⁻¹ 的副溶血弧菌, 其 24 h 死亡率可达 50%^[24]。由此说明, 针对不同水产物种, 不同来源创伤弧菌和副溶血弧菌的感染致死率存在差异, 而不同感染途径也可能会影响致死率。本研究中, 罗氏沼虾注射 100 μ L 菌量为 5×10^7 CFU·mL⁻¹ 的创伤弧菌和副溶血弧菌, 感染 24 h 的致死率分别为 26.67% 和 20.00%, 在 6 d 内累积死亡率分别为 97.22% 和 93.33%。降低弧菌感染动物模型的致死率是评价新型免疫增强剂效果的常用指标^[25]。本研究通过观察感染创伤弧菌和副溶血弧菌的罗氏沼虾死亡率, 评估 nCeO₂ 的体内抑菌性能。发现饲料中分别添加 128 和 256 mg·kg⁻¹ 的 nCeO₂ 后, 感染创伤弧菌和副溶血弧菌罗氏沼虾的死亡率分别下降了 55.55% 和 57.77%, 验证了 nCeO₂ 对水产动物体内感染弧菌同样具有较强的抑菌活性。

3.2 nCeO₂ 对 2 种水产病原弧菌的抗菌作用

细胞壁和细胞膜构成了细菌第 1 和第 2 道保护屏障。各种类型杀菌剂均可通过打破菌体的保护屏障, 破坏细胞壁和细胞膜的完整性与通透性, 引起细胞内物质泄漏, 电导率变化, 代谢活动紊乱, 导致生长活性抑制甚至菌体死亡。菌液在 600 nm 处的吸光值与菌液浓度呈正比, 因此测定其 OD_{600 nm} 值可以间接反应菌液生长活性随时间的变化规律^[15]。芦平等^[26] 研究指出原儿茶酸在添加量为 1 MIC 时, 副溶血弧菌未见增殖。本研究中, nCeO₂ 添加量为 1 MIC 和 2 MIC 时, 副溶血弧菌和创伤弧菌生长被完全抑制, 这与 Xia 等^[27] 的研究相似。

细胞壁作为细菌的外围层, 主要成分是多种多糖, 赋予细菌以物理保护和形状的稳定性的, 是自身保护的 1 道屏障^[28]。AKP 是一种存在于细胞壁和细胞膜之间的酶, 其无法在细胞结构完整时被检测到^[29]。因此, 测定胞外 AKP 活性是评价抗菌剂对病原菌细胞壁完整性损伤的有效指标^[30]。有研究发现, 植物源抑菌剂藤茶 (*Ampelopsis grossedentata*) 提取物在 1 MIC 和 2 MIC 浓度时对水产创伤弧菌生长具有显著抑制作用, 且伴随着胞外 AKP 活性

的显著提升,表明藤茶提取物损伤了创伤弧菌细胞壁的完整性^[13]。传统中草药黄连(*Coptis chinensis* Franch)提取物在1 MIC和1 MBC浓度时对副溶血弧菌具有显著抑菌作用,且黄连提取物浓度增加会增强其处理副溶血弧菌胞外 AKP 活性,引起菌体细胞壁破坏加剧^[31]。Iqbal 等^[32]研究发现 nCeO₂ 中包含 Ce³⁺ 和 Ce⁴⁺, 相比于 Ce⁴⁺, Ce³⁺ 更容易与细菌细胞壁上的分子发生反应,生成 ROS,从而破坏细胞壁。在本实验中,添加了 1/2 MIC 的 nCeO₂ 就会引起创伤弧菌和副溶血弧菌胞外 AKP 活性上升,且随着添加浓度增大 2 种弧菌胞外 AKP 活性急剧上升,说明 nCeO₂ 能破坏创伤弧菌和副溶血弧菌的细胞壁完整性,导致胞内 AKP 外泄。

细胞膜是细菌的第 2 道保护屏障,可保持细胞内部与外界环境之间的平衡,实现特定物质有选择性的交流^[33]。细胞膜完整结构被破坏后,细胞中的 Na⁺ 和 K⁺ 泄露,通过测定电导率可以得到细胞膜通透性的变化^[34]。杨维琴等^[31]研究发现,黄连提取物使副溶血弧菌电导率随着浓度的增加和时间的延长,显著破坏了细胞膜的通透性。这与本研究结果相似,说明 nCeO₂ 能够有效破坏创伤弧菌和副溶血弧菌细胞膜的通透性,且作用强弱与 nCeO₂ 浓度和作用时间呈正相关。细胞膜受损后会造造成双向泄露,即细胞内核酸和蛋白质等物质泄漏到细胞外,外部的物质进入细胞内部^[35]。核酸在 260 nm 处具有较强的紫外吸收峰,因此 OD_{260 nm} 值可以间接反映胞外核酸浓度。而测定胞外核酸和蛋白质含量可以反映 nCeO₂ 对菌体细胞膜的损伤程度。蔡延渠等^[36]研究发现在 3~12 h 培养过程中,随着诃子叶(*Folium chebulae*)提取物 1 MIC 浓度情况下作用时间的延长,创伤弧菌和副溶血弧菌胞外核酸和可溶性蛋白质浓度逐渐增加,且 3 h 后出现明显提升。这与本研究 nCeO₂ 浓度为 1 MIC 及 2 MIC 时核酸和可溶性蛋白质含量变化相似。本研究中,当浓度为 1/2 MIC 时,胞外核酸和可溶性蛋白质含量显著增加,说明 nCeO₂ 能够有效破坏创伤弧菌和副溶血弧菌细胞膜的完整性,且 nCeO₂ 浓度越高,损伤越明显。这可能与 nCeO₂ 接触细胞膜或细胞内氧化还原敏感分子时,其相互作用可能会打破细胞的氧化还原平衡,促进过量的 ROS 生成,从而对细胞膜造成不可逆转损伤^[37]。上述分析表明,nCeO₂ 对 2 种水产弧菌均具有很好的抗菌作用,这可能与其破坏了菌体细胞壁、细胞

膜完整性和细胞膜通透性有关。

3.3 nCeO₂ 的食用安全性

为了评估 nCeO₂ 的食用安全性,笔者实验室在前期实验中测定了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 在食用添加 nCeO₂ 饵料 90 d 后肝胰腺中的 Ce 含量^[38]。结果显示在饵料中添加 256 mg·kg⁻¹ 的 nCeO₂ 后,蟹肝脏中总 Ce 质量分数从 0.494 9 mg·kg⁻¹ 增至 0.680 5 mg·kg⁻¹, 低于水稻(*Oryza sativa*) (平均 0.750 mg·kg⁻¹) 和小麦(*Triticum aestivum*) (平均 1.5 mg·kg⁻¹) 的报告值^[39], 并且远低于美国国家学术研究理事会(National Research of Council of the National Academies, NRC)标明的饮食中 100 mg·kg⁻¹ 的安全标准^[40]。根据以上分析,本研究中罗氏沼虾短期食用含 nCeO₂ 的饵料,且添加量不高于 256 mg·kg⁻¹ 的情况下,不会影响其食用安全性。

4 结论

nCeO₂ 对水产病原创伤弧菌和副溶血弧菌在体外和体内均具有很好的抑杀作用,其抗菌作用可能与其破坏菌体细胞壁、细胞膜完整性和细胞膜通透性有关。本研究发现在罗氏沼虾饵料中添加 128 和 256 mg·kg⁻¹ 的 nCeO₂ 可分别对创伤弧菌和副溶血弧菌具有很好的抑杀作用。

参考文献:

- [1] 庞广富. 基于 PLC 物联网的自动化仪表在水产养殖中水质检测的应用[J]. 中国农业资源与区划, 2023, 44(8): 133, 144.
- [2] 邓益琴. 水产动物弧菌病及其生物防治研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2023, 38(4): 553-563.
- [3] BERNÁLDEZ-SARABIA J, LIZÁRRAGA-PARTIDAM L, HERNÁNDEZ-LÓPEZ E L, et al. Distribution of pathogenic vibrios and *Vibrio* spp. in the water column and sediment samples from the southern Gulf of Mexico[J]. Mar Pollut Bull, 2021, 173(Pt B): 113116.
- [4] 彭钟琴, 黄璐. 水产品中创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2021(36): 190-192.
- [5] 孙一享, 常洪军, 杨行鑫, 等. 水产动物副溶血弧菌病及其噬菌体防治研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3620-3634.
- [6] BAKER-AUSTIN C, OLIVER J D. *Vibrio vulnificus*[J]. Trends Microbiol, 2020, 28(1): 81-82.
- [7] CHOI G, CHOI S H. Complex regulatory networks of virulence factors in *Vibrio vulnificus*[J]. Trends Microbiol, 2022, 30(12): 1205-1216.
- [8] 陈媛媛, 王亚男, 刘士朋. 副溶血性弧菌致病性和检测方法研究进展[J]. 河北医药, 2022, 44(22): 3491-3495.
- [9] STEPHEN INBARAJ B, CHEN B H. An overview on recent *in vivo* biological application of cerium oxide nanoparticles[J]. Asian J

- Pharm Sci, 2020, 15(5): 558-575.
- [10] ZHANG M Z, ZHANG C, ZHAI X Y, et al. Antibacterial mechanism and activity of cerium oxide nanoparticles[J]. *Sci China Mater*, 2019, 62(11): 1727-1739.
- [11] ALPASLAN E, GEILICH B M, YAZICI H, et al. PH-controlled cerium oxide nanoparticle inhibition of both gram-positive and gram-negative bacteria growth[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 45859.
- [12] 高晓华, 张明辉. 40 种中草药及其联合应用对凡纳滨对虾源副溶血弧菌的体外抑菌作用[J]. 甘肃农业大学学报, 2023, 58(2): 23-31, 41.
- [13] 祁子麟, 陈咏琪, 蔡延渠, 等. 藤茶提取物及活性成分对创伤弧菌的体外抑菌活性及作用机制[J]. 广东药科大学学报, 2023, 39(1): 95-99.
- [14] 刘静, 谢明飞, 蔡延渠. 茶皂素对临床常见致病菌的抗菌活性及作用机制研究[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(5): 35-41.
- [15] 陈雪琴, 赵圆圆, 张珍, 等. 肉桂精油的化学成分分析及其对沙门氏菌细胞膜损伤机制的研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14): 24-32.
- [16] 孔嘉明, 戴习林, 黎兰诗, 等. 副溶血弧菌对罗氏沼虾肝胰腺和鳃组织中呼吸相关酶活性及抗氧化酶基因表达的影响[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(12): 3294-3302.
- [17] YILMAZ S, YILMAZ E, DAWOOD M A O, et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: a review[J]. *Aquaculture*, 2022(547): 737514.
- [18] WITT L S, SPICER J O, BURD E, et al. Evaluation of clinicians' knowledge and use of minimum inhibitory concentration values[J]. *Braz J Infect Dis*, 2021, 25(6): 101656.
- [19] PARVEKAR P, PALASKAR J, METGUD S, et al. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*[J]. *Biomater Invest Dent*, 2020, 7(1): 105-109.
- [20] QUIROZ-GUZMÁN E, MORREEUW Z P, PEÑA-RODRÍGUEZ A, et al. Flavonoid-enriched extract of *Agave lechuguilla* bagasse as a feed supplement to prevent vibriosis in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2023, 562: 738867.
- [21] VINU D, GOVINDARAJU K, VASANTHARAJA R, et al. Biogenic zinc oxide, copper oxide and selenium nanoparticles: preparation, characterization and their anti-bacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *J. Nanostruct Chem*, 2021, 11(2): 271-286.
- [22] 陈秀霞, 池洪树, 许斌福, 等. 创伤弧菌浸泡感染对孔雀鱼的影响[J]. *福建畜牧兽医*, 2019, 41(2): 11-14.
- [23] 张坤. 大黄鱼主要病原菌的分离鉴定与抗菌复方开发[D]. 厦门: 集美大学, 2016: 24.
- [24] CHEN D D, GUO L F, YI C, et al. Hepatopancreatic transcriptome analysis and humoral immune factor assays in red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) provide insight into innate immunomodulation under *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 217: 112266.
- [25] QIN F J, SHEN T, YANG H X, et al. Dietary nano cerium oxide promotes growth, relieves ammonia nitrogen stress, and improves immunity in crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 92: 367-376.
- [26] 芦平, 刘欢, 肖苗, 等. 原儿茶酸对副溶血弧菌的抑菌和减毒作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 278-285.
- [27] XIA H, YANG H J, YAN N, et al. Bacteriostatic effects of phage F23s1 and its endolysin on *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *J Basic Microbiol*, 2022, 62(8): 963-974.
- [28] PÉREZ P, RIBAS J C. Cell wall analysis[J]. *Methods*, 2004, 33(3): 245-251.
- [29] 王意, 张博涵, 陆一鸣, 等. 黄芩提取物对嗜水气单胞菌抑菌活性和机制的研究[J]. *陕西科技大学学报*, 2019, 37(6): 73-78, 104.
- [30] KANG S, FANHUASHI, XINYANGHAN, et al. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Pseudomonas fluorescens* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its application on whole milk[J]. *Food Control*, 2020, 108: 106876.
- [31] 杨维琴, 钱亮亮, 张宗艺, 等. 黄连提取物抗副溶血弧菌活性成分的鉴定及其作用机理[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 181-187.
- [32] IQBAL N, ANASTASIOU A, ASLAM Z, et al. Interrelationships between the structural, spectroscopic, and antibacterial properties of nanoscale (<50 nm) cerium oxides[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20875.
- [33] WAGNER B M. Crossroads of the basic sciences-the cell membrane[J]. *Hum Pathol*, 1984, 15(11): 1007.
- [34] EOM S H, LEE D S, JUNG Y J, et al. The mechanism of antibacterial activity of phlorofucofuroeckol-A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(23): 9795-9804.
- [35] KRISHNAMURTHI V R, ROGERS A, PEIFER J, et al. Micro-ampere electric current causes bacterial membrane damage and two-way leakage in a short period of time[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(16): e01015-20.
- [36] 蔡延渠, 李苑新, 鲁湘鄂. 诃子叶提取物对水产养殖常见致病性弧菌的抗菌作用研究[J]. 饲料研究, 2022, 45(21): 78-81.
- [37] ZAMANI K, ALLAH-BAKHSI N, AKHAVAN F, et al. Antibacterial effect of cerium oxide nanoparticle against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BMC Biotechnol*, 2021, 21(1): 68.
- [38] 孙元琛, 徐冰洁, 曹艺筹, 等. 饲料中添加纳米氧化铈对氨氮与嗜水气单胞菌胁迫下中华绒螯蟹的保护效应[J]. 南方水产科学, 2022, 18(3): 94-101.
- [39] REDLING K. Rare earth elements in agriculture with emphasis on animal husbandry[J]. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006: 325.
- [40] PAEMEL M V, DIERICK N, JANSSENS G, et al. Selected trace and ultratrace elements: biological role, content in feed and requirements in animal nutrition-elements for risk assessment[J]. *Efsa Supporting Publ*, 2010, 7(7): 68E.