鲶鱼体表粘液粗提物对铜绿假单胞菌的抑菌机理初探

李婷婷[1,2]，张慧芳[3]，姜杨[3]，晋高伟[3]，励建荣[2,3]
（1.大连民族学院生命科学学院，辽宁大连 116600）（2.西南大学食品学院，重庆 400715）
（3.渤海大学食品科学研究院，辽宁省食品安全重点实验室，辽宁锦州 121013）

摘要：本文以铜绿假单胞菌为研究对象，探讨鲶鱼体表粘液提取物（Catfish Epidermal Mucus Extracts, CEME）对其的抑制效果及抑菌机理。研究表明：当 CEME 浓度高于 0.15%时，鲶鱼体表粘液提取物对铜绿假单胞菌有显著的抑制作用，通过测定微生物的生长曲线可以看出 CEME 能够有效减缓铜绿假单胞菌的生长速率。进一步使用扫描电镜发现 CEME 对铜绿假单胞菌的细胞形态结构能够造成明显的损伤，有效破坏微生物细胞膜的完整性。同时 CEME 还可以导致铜绿假单胞菌细胞膜的通透性增加，从而导致体内小分子物质以及部分大分子物质向外泄漏。应用 SDS-PAGE 方法发现 CEME 处理对铜绿假单胞菌的总蛋白和细菌膜蛋白均有显著的影响，它能够抑制菌体某些蛋白的合成，导致胞内蛋白含量的下降和缺失。上述研究结果表明鲶鱼体表粘液提取物对铜绿假单胞菌有较好的抑制效果。

关键词：鲶鱼体表粘液提取物；铜绿假单胞菌；抑菌机理；研究
文章篇号：1673-9078(2015)7-67-73 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.012

Antibacterial Mechanisms of Catfish Epidermal Mucus Extracts against *Pseudomonas aeruginosa*

LI Ting-ting[1,2], ZHANG Hui-fang[3], JIANG Yang[3], JIN Gao-wei[3], LI Jian-rong[2,3]
(1.College of Life Science, Dalian Nationality of University, Dalian 116600, China)
(2.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)
(3.Food Science Research Institute of Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

Abstract: Several techniques were used to investigate the mechanism of antibacterial effect of catfish epidermal mucus extracts (CEME) against *Pseudomonas aeruginosa*. The results showed that the inhibitory effect was significant when the concentration exceeded 0.15% (mg/mL). The bacterial growth curve showed a decrease and scanning electron microscopy (SEM) showed changes in morphology. This indicated that the primary mechanism of CEME inhibitory action was to damage the bacterial cell membrane integrity. CEME also increased bacterial membrane permeability, which led to leakage of cellular small molecules and a proportion of macromolecules. In addition, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed that CEME causes obvious changes to bacterial membrane proteins, which led to inhibition of bacterial protein synthesis and subsequent decline and loss of intracellular protein content. These results imply that CEME shows relatively good antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: catfish epidermal mucus extracts; *Pseudomonas aeruginosa*; antibacterial mechanisms; research

天然表皮黏液作为鱼类第一道免疫防线，主要通过产生表皮杯状或黏液细胞来发挥作用[1~4]。Austin & McIntosh[5]在 1988 年首次报道了虹鳟鱼表皮粘液对传染性病原体具有抑制作用。Kanno 等[6]、Fouz 等[7]发现去除表皮粘液将导致香鱼和大比目鱼迅速死亡。Lemaître 等[8]研究表明去除表皮粘液的鲤鱼更易遭受细菌感染导致其迅速腐败。2002 年 Hellio 等发现多种鱼类表皮粘液提取物具有广谱的抗菌活性[9]。同时，许多学者对鱼表皮粘液的抗菌成分进行了深入研究，Kitani 等[10]分离到岩鱼体表的抗菌蛋白 SSAP，研究了

收稿日期：2014-10-15
基金项目：国家自然科学基金（31301572，31471639）；中国博士后科学基金（2014M552302）；“十二五”国家科技支撑计划（2012BAD29B06）；重庆市博士后资助(Xm2014041)
作者简介：李婷婷(1978-)，女，博士，副教授，主要从事水产品贮藏加工及质量安全控制方面的研究
通讯作者：励建荣(1964-)，男，博士，教授，博士生导师，主要从事水产品和果蔬贮藏加工及质量安全控制方面的研究

其分子结构及抗菌机理，发现 SSAP 抗菌肽具有广谱抗菌性，可以同时抑制 G^+以及 G^-细菌。Takahashi 等[11]、Smith 等[12]从黄鳍短须石首鱼(*Seriola quinqueradiata*)、鲤鱼(*carpio*)及虹鳟鱼(O. *mykiss*)的体表粘液中分离得到具有较强抑菌性能的抗菌肽。但国内有个鱼类体表粘液抑菌活性方面的研究却很少。

鲶鱼（*Parasilurus asotus Linnaeus*）属于鱼纲鲤形目鲶科，生性好动，对生存环境有较强的适应能力，相对其他种类的鱼而言，鲶鱼会在其体表粘液和内脏中应激产生一些抵抗恶劣环境的抗菌活性物质，特别是在受伤之后这种活性物质将产生更多。因此，本文以水产品中典型的腐败菌铜绿假单胞菌为检测对象，通过测定鲶鱼体表粘液提取物与铜绿假单胞菌作用前后细菌生长曲线、细菌形态和细菌膜通透性的改变、以及菌体蛋白质表达方面的差异，旨在较系统地考察鲶鱼表皮粘液提取物对菌体细胞膜的通透性和细胞内分子代谢的影响，进而探明鲶鱼体表粘液提取物的抑菌机理和模式，该研究为鲶鱼体表粘液提取物用于食品包括水产品的保鲜提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲶鱼（购至辽宁锦州水产市场）；铜绿假单胞菌（来自渤海大学食品安全实验室）；GENMED 细菌可溶性总蛋白质制备试剂盒（广州晨展贸易有限公司）；蛋白分子量标准 Marker（大连宝生生物工程公司）；SDS-PAGE 蛋白电泳所用试剂（上海生物工程有限公司）；营养肉汤，平板计数培养基（青岛海博生物技术有限公司）。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD 超净工作台（苏景集团苏州安泰技术有限公司）；Biofuge stratos 台式高速离心机（美国 Thermo Fisher 公司）；LEGEND MICRO 21R 高速离心机（美国 Thermo Fisher 公司）；UV-2550 紫外-可见分光光度计（尤尼柯(上海)仪器有限公司）；SZ-1 型快速混匀器（江苏金坛市金城国胜实验设备厂）；THZ-D 台式恒温振荡器（太仓市实验设备厂）；DZF-6050 型真空干燥箱（上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；ZD-9556 脱色摇床（常州市凯航仪器有限公司）；GS-800 拍照系统（美国 Bio-RAD 公司）；SDS 电泳系统（美国 Bio-Rad 公司）；E-1045 镀金仪（日本日立公司）；S-4800 扫描电镜（日本日立公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 CEME 提取

活体鲶鱼用水清洗干净，酒精棉球擦拭，超纯水充分冲洗，将其置于带盖的玻璃容器，滴加适量的无水乙醚，密闭容器 1~2 min，可见泡沫状物质从鱼皮肤分泌出来，用 500 mL 含有 0.01 M EDTA 的 0.1 M NaCl 冲洗分泌液，快速离心（12000 g，20 min），收集上清液并真空冷冻干燥，-80 ℃保存。

1.3.2 抑菌活性的测定

采用琼脂渗透法对鲶鱼体表粘液粗品抑菌活性进行测定。将适量铜绿假单胞菌接种于营养肉汤培养基中，过夜振摇培养（37 ℃，100 r/min）。再将 50 μL 过夜培养物接种于营养肉汤培养基中，振摇培养（37 ℃，100 r/min）6 h，得到铜绿假单胞菌。

预先在平皿中铺一层琼脂培养基作底层，冷却后再加一薄层含测试菌的琼脂培养基（取 50 μL 含菌量约为 9×10^8 个/mL 的菌体培养液，使培养基中含菌量约为 10^6 个/mL）。用牛津杯（直径 9 mm）在含有测试菌的平板上打孔，每孔加样 15~20 μL，以生理盐水为阴性对照，加样后将平皿放入 4 ℃冰箱静置 12 h，使抑菌物质样品充分扩散到琼脂中，然后将平皿倒置放入 37 ℃培养箱孵育 24 h，观察其抑菌效果。

1.3.3 MIC 的测定

将鲶鱼体表粘液抑菌物质配成质量浓度为 1.0 g/L 以下的培养基溶液，分别为 0.3、0.15、0.075、0.037 和 0.018 质量浓度，加入一定体积的菌悬液，于 37 ℃，160 r/min 摇床振荡培养 12 h，倾入 15 mL 融化后冷却至 50 左右的牛肉膏蛋白胨培养基，让它们充分混匀，待含菌培养基凝固后倒置培养 24 h 后计菌落数。重复 2 个平板。以不加鲶鱼体表粘液抑菌物质溶液只加菌悬液为对照。

1.3.4 稳定性研究

将 CEME 水溶液用氢氧化钠和盐酸调配成 7 个 pH 值梯度(4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11)，然后用牛津杯法观察 pH 值对 CEME 抑菌活性的影响。重复 3 个平板。将 CEME 水溶液在 20 ℃、40 ℃、60 ℃、80 ℃、100 ℃和 120 ℃ 6 个温度下处理 15 min，同样采用牛津杯法观察温度对 CEME 抑菌活性的影响。重复 3 个平板。将 CEME 水溶液在紫外灯下分别照射 0~2 h，同样采用牛津杯法观察温度对 CEME 抑菌活性的影响。重复 3 个平板。分别用甲醇 Methanol，丙酮 Acetone，乙腈 Acetonitrile 和乙醇 Ethanol，处理 CEME2 h，同样采用牛津杯法观察温度对 CEME 抑菌

活性的影响。重复 3 个平板。

1.3.5 细菌生长曲线

将适量铜绿假单胞菌接种于营养肉汤培养基中，过夜振摇培养（37 ℃，160 r/min）。再将 50 μL 过夜培养物接种于营养肉汤培养基中，振摇培养（37 ℃，100 r/min）12 h，得到铜绿假单胞菌。取少量假单胞菌过夜培养至对数期（10^6 个/mL），加入 CEME 粉末使其终浓度为 0.3%，于 30 ℃，160 r/min 摇床振荡培养。在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 分别取样，在 600 nm 处测定其吸光值。以时间为横坐标，OD_{600} 值为纵坐标，绘制生长曲线，另以不添加 CEME 的为对照组。

1.3.6 菌液电导率的测定

取少量假单胞菌过夜培养至对数期，加入 CEME 使其终浓度为 0.3%，于 37 ℃，160 r/min 摇床振荡培养。参考 Lee 等[13]人的方法，在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 分别取样测定培养液的电导率，确定金属离子渗出的变化趋势。

1.3.7 紫外吸收物质的检测

参考 Chris and Stuart[14]方法，取少量假单胞菌过夜培养至对数期，离心（4000 r/min，10 min），用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）洗涤 3 次，用等量磷酸缓冲液配制的使 CEME 终浓度为 0.3%的抑菌液悬浮，于 37 ℃，160 r/min 摇床振荡培养，在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 分别取样，测 OD_{260}。

1.3.8 扫描电镜观察

取少量假单胞菌过夜培养至对数期，加入 CEME 使其终浓度为 0.3%，于 37 ℃，160 r/min 摇床振荡培养 12 h。4000 r/min 离心 10 min 弃除上清，沉淀部分用无菌水洗涤。将菌体细胞置于含 2.5%的戊二醛磷酸缓冲液（0.1 mol/L 的 PBS，pH=7.2）中固定 12 h，然后用无菌水洗涤三次，每次 10 min。洗涤过后的菌体沉淀用无菌水悬浮，悬浮时注意菌体密度不要过大，取适量滴于洁净盖玻片上，冷冻干燥 12 h，进行喷金镀膜，然后通过扫描电镜观察 CEME 对假单胞菌形态结构的影响。以磷酸缓冲液悬浮的菌液为空白对照组。

1.3.9 对蛋白质合成的影响

1.3.9.1 菌蛋白提取

取少量假单胞菌过夜培养至对数期，加入 CEME 使其终浓度为 0.3%，于 37 ℃，160 r/min 摇床振荡培养 12 h。离心（4000 r/min，10 min），用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）洗涤 3 次。采用 GENMED 细菌可溶性总蛋白质制备试剂盒提取菌蛋白。具体步骤如下：

（1）取适量新鲜菌液样品，于 4 ℃，3500 g 离心 20 min，弃除上清；

（2）加入 5 mL 预冷的 GENMED 清理液（Reagent A），混匀，4 ℃，3500 g 离心 20 min，弃除上清；

（3）加入 1 mL 预冷的含有 GENMED 裂解液(Reagent B)和 GENMED 活性液(Reagent C)的 GENMED 裂解工作液，充分混匀；

（4）加入 25 μL GENMED 酶解液(Reagent E)，旋涡振荡 5 s，充分混匀，置于冰槽中孵育 15 min，期间每隔 5 min 旋涡震荡 5 s；

（5）加入 100 μL GENMED 融化液(Reagent D)，旋涡震荡 5 s，充分混匀；

（6）冰槽中孵育 15 min，每隔 5 min 旋涡震荡 5 s，转移至 1.5 mL 离心管，4 ℃，16000 g 离心 20 min，上清液移至新的 1.5 mL 离心管中，放入-70 ℃冰箱以备后续使用。

1.3.9.2 膜蛋白提取

取少量假单胞菌过夜培养至对数期，加入 CEME 使其终浓度为 0.3%，于 37 ℃，160 r/min 摇床振荡培养 12 h。离心（4000 r/min，10 min），用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）洗涤 3 次。采用 GENMED 细菌膜蛋白质制备试剂盒提取菌蛋白。具体步骤如下：

（1）取新鲜培养的菌液；

（2）转移到预冷的 50 mL 锥形离心管；

（3）放进 4 ℃台式离心机离心 20 min，速度为 3500 g；

（4）小心抽去上清液；

（5）加入 5 mL 预冷的 GENMED 清理液(Reagent A)，混匀；

（6）放进 4 ℃台式离心机离心 20 min，速度为 3500 g；

（7）小心抽去上清液；

（8）加入 l mL 预冷的含有 GENMED 裂解液(Reagent B)和 GENMED 活性液(Reagent C)的 GENMED 裂解工作液；

（9）用 l mL 枪头上下抽吸,充分混匀；

（10）即刻置于超声仪枪头下,样品在冰槽里；

（11）超声处理 4 至 6 下 10 s 碎击(20%功率)；

（12）加入 100 μL GENMED 融化液(Reagent D)；

（13）涡旋震荡 5 s，充分混匀；

（14）置于冰槽里孵育 30 min，期间每隔 5 min 涡旋震荡 5 s；

（15）转移到 2 mL 离心管；

（16）放进 4 ℃微型台式离心机离心 20 min，速度为 6000 g；

（17）小心移出上清液到新的预冷的 1.5 mL 离心

管；

（18）放进 4 ℃台式离心机离心 60 min，速度为 40000 g；

（19）小心抽去上清液；

（20）加入 500 μL GENMED 保存液(Reagent E)，混匀沉淀颗粒；

（21）放进-70 ℃的冰箱里保存；

（22）放进 4 ℃微型台式离心机离心 20 min，速度为 16000 g；

（23）小心移出上清液到新的预冷的 1.5 mL 离心管,备用。

1.3.9.3 DS-PAGE 电泳

（1）样品处理：取适量菌蛋白与样品缓冲液混合，煮沸 3~5 min，冷至室温，点样量为 10 μL。

（2）胶的配制：配制比例如表 1 所示。

（3）电泳：初始电流 12 mA，当溴酚蓝指示条跑过分离胶后，调至 15 mA，维持电流恒定。待溴酚蓝到达底部白色胶条处，停止电泳。

（4）胶的染色和脱色：将整块胶在染色液（0.25%考马斯亮蓝 G250，$V_{甲醇}$:$V_{冰醋酸}$:$V_{蒸馏水}$=45:10:45）中摇床染色 40 min，再在脱色液（$V_{甲醇}$:$V_{冰醋酸}$:$V_{蒸馏水}$=25:10:65）中脱色，直至蛋白条带清晰可辨。

（5）拍照：电泳结果采用 Quantity One 系统拍照。

表 1 分离胶和浓缩胶配比表

Table 1 Experimental formulae for separating and stacking gels

	10%分离胶	4%浓缩胶
30%Acr/Bis	3.3 mL	0.65 mL
去离子水	4.0 mL	3.0 mL
1.5M Tris-Hcl	2.5 mL	1.25 mL
10%SDS	100 μL	50 μL
10%APS	100 μL	50 μL
TEMED	7 μL	3 μL
总体积	10 mL	5 mL

2 结果与讨论

2.1 抑菌活性和 MIC

本文测定了不同浓度的鲶鱼体表粘液粗提取对铜绿假单胞菌的抑制作用，如表 2 所示。从表中可以看出鲶鱼体表粘液对铜绿假单胞菌有较强抑菌的活性，并月随着 CEME 浓度的增加，其抑菌效果也明显，当 CEME 的浓度高于 0.150%时，对铜绿假单胞菌有显著的抑制作用($p<0.05$)。并用平板计数法最终确定其最小抑菌浓度（MIC）为 0.150。

表 2 鲶鱼体表粘液提取物对铜绿假单胞菌的抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of CEME toward *P. aeruginosa*

	Different concentrations of CEME/(mg/mL)					
	2.400	1.200	0.600	0.300	0.150	0.075
抑菌圈直径 Diameter/mm	21.56±0.29	19.06±0.24	18.98±0.38	17.64±0.37	10.01±0.25	9.68±0.185

2.2 稳定性研究

以铜绿假单胞菌对对象来研究粗提液中抗菌物质的稳定性（如图 1）。图 1a 的结果表明：CEME（自然 pH）经过较低温度处理后（20~80 ℃），抑菌能力比较稳定（抑菌圈直径大致处于 19.06~19.32 mm 内），并且 40 ℃时活性最大，但是当温度大于 100 ℃会使活性有所降低，抑菌圈有所变小，比如 121 ℃已降至最高值的 87%。其次，由图 1b 可以看出在常温下分别经过 pH 为 3.0、5.0、7.0、9.0 处理后，CEME 的抑菌能力具有一定的稳定性（19.78~20.01 mm）；而在极碱（pH 为 11.0 和 12.0）条件下抑菌效力稍有所下降（19.71、19.69 mm）。通过紫外线照射及不同有机试剂处理的结果表明（如图 1c~d），粗提液中的抗菌物质表现出了很高的稳定性，即与对照组（Control group）的抑菌效果没有明显的差异（直径一直处于 19.23 mm 以上）。总之，CEME 对热、pH、紫外照射和有机溶剂均不敏感，是较好的抗菌物质源。

2.3 细菌生长曲线

微生物生长状况变化后，在一定的波长范围内其菌悬液的吸光值会发生变化，并且菌悬液浓度与吸光值呈正比。因此可用测定菌悬液吸光值的方法，做出 OD 值与时间的关系图，即该种细菌的生长曲线，根据生长曲线便可以推断细菌的生长状况[15]。由图 2 可知，经 CEME 处理的实验组的细菌生长曲线与正常培养的对照组存在明显差异。图 2 表明对照组假单胞菌初始时对数增长，14 h 之后开始进入稳定期；CEME 处理组开始时增殖缓慢，在 16 h 后到达增殖顶点，之后趋于稳定，达到稳定期；且达到稳定期时其生长总量较少。这说明 CEME 能有效的抑制细菌的增殖，使菌体缓慢生长，有效抑制铜绿假单胞菌生长。

2.4 细菌菌液电导率的测定

细胞膜是细菌的保护屏障，而强抑菌剂能破坏细菌的细胞膜，使菌体的保护屏障被打破，其内部电解

质就会外泄至培养液中，培养液的电导率会因此而上升，因此，电导率值的变化可以反映细菌细胞膜通透性的变化[16]。当微生物处于恶劣条件或是受到毒害时，会导致其细胞膜流动性降低和丧失半透性甚至破坏细胞膜的结构，此时细胞内的电解质外泄，导致培养液的电导率改变[17]。

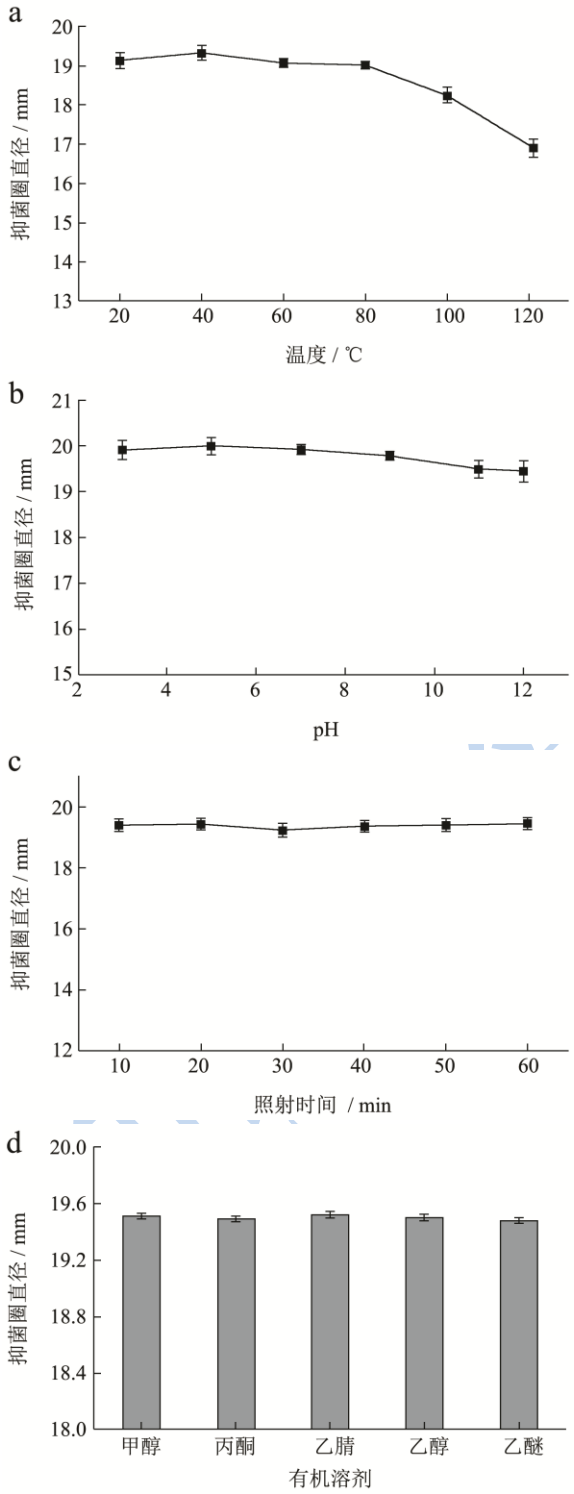


图 1 CEME 的稳定性研究

Fig.1 Stability of CEME anti-bacterial effect under various conditions

注：a: 温度对 CEME 抑菌效果的影响；b: pH 对 CEME 抑菌效果的影响；c: 紫外照射时间对 CEME 抑菌效果的影响；d: 有机溶剂对 CEME 抑菌效果的影响。

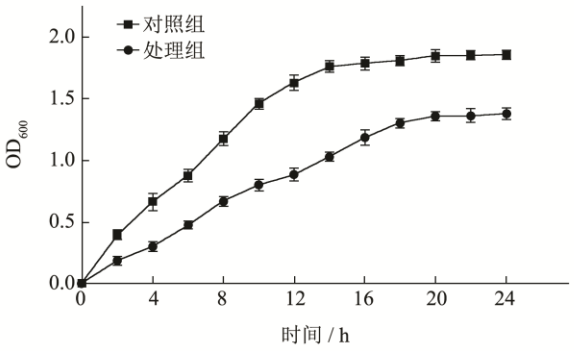


图 2 CEME 处理对菌体生长曲线的影响

Fig.2 Effects of CEME on the growth curves of bacteria

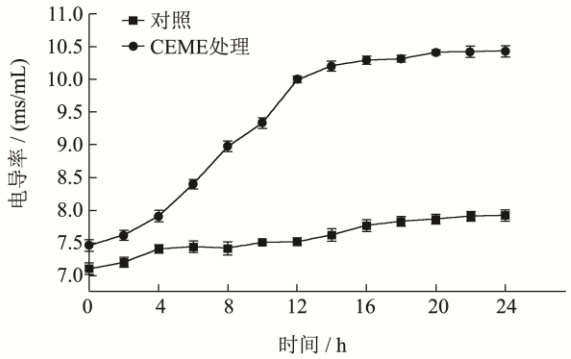


图 3 CEME 处理对菌液电导率的影响

Fig.3 Effects of CEME on the conductivity of bacteria

由图 3 可知，铜绿假单胞菌培养液的电导率明显高于未加 CEME 的对照组，并且随着时间的延长，其电导率呈上升趋势，说明菌体的电解质外泄增多，CEME 对细胞内环境和细胞膜的稳定性造成了一定的影响，从而抑制了铜绿假单胞菌的生长繁殖。这和 Tao 等[18]研究壳聚糖对绿脓假单胞菌和金黄色葡萄球菌膜通透性的结果相似。

2.5 紫外吸收物质的检测

细胞膜把微生物细胞包裹起来，阻止细胞内外物质自由进出细胞，使细胞能够保持相对的稳定性，维持正常的生命活动。通常情况下细菌细胞壁的微孔道只能透过小于 1 nm 的分子，蛋白质和核酸等大分子不会透过细胞壁和细胞膜[19]。当细菌菌体受到抗菌物质作用时，细胞膜受损并丧失功能，使胞内物质渗出，细胞内的小分子物质，如 K^+和 PO_4^{3-}首先外渗至胞外，随后是大分子物质，如 DNA、RNA 和其它一些物质[20]。由于核酸的释放在 260 nm 处有强吸收，用紫外可见分光光度计很容易测定，因此 OD_{260} 被广泛用作评价细胞膜完整性的指标[21]。

CEME 处理对假单胞菌菌体紫外吸收物质的影响见图 4。假单胞菌经 CEME 处理后，OD_{260} 值随时间的延长明显增加，作用 180 min 后假单胞菌 OD_{260} 值增加速度开始变缓，而对照组 OD_{260} 一直趋于稳定。这说明 CEME 改变了假单胞菌细胞膜的通透性，使核酸类物质外泄，并且随时间的延长泄漏明显增加。

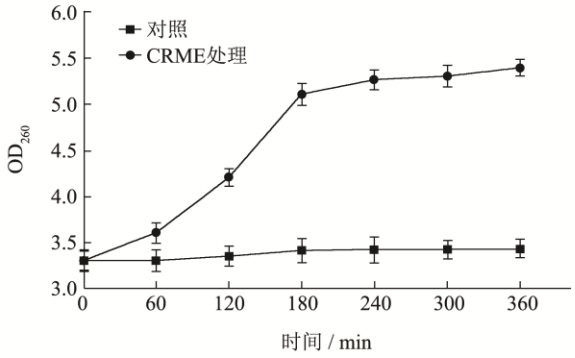


图 4 CEME 处理对菌体紫外吸收物质的影响

Fig.4 Effects of CEME on ultraviolet absorbing compounds in bacteria

2.6 扫描电镜观察

通过观察图5可知未经CEME处理的假单胞菌菌体生长良好，表面较平滑，菌体未变形，无缺损（图5a、c）；经 CEME 处理 12 h，菌体弯曲变形，内部大部分塌陷，菌体表面也覆盖着一层泡状物（图 5b、d）。假单胞菌的形态变化说明，CEME 处理会对细菌细胞壁产生破坏作用，微生物的细胞壁一旦被破坏，细菌形态随之发生变化。

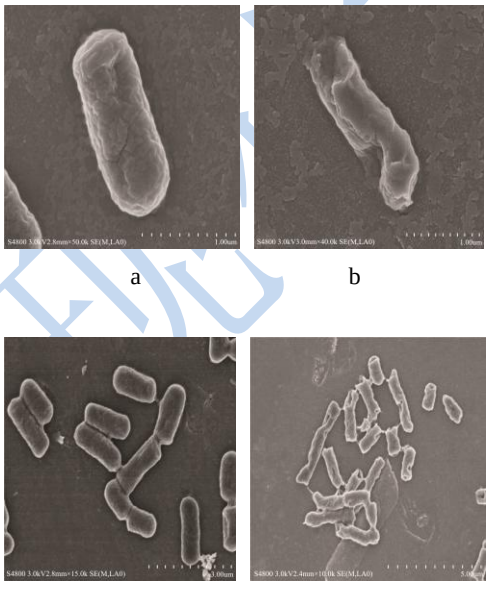


图 5 CEME 处理铜绿假单胞菌的扫描电镜图

Fig.5 SEM of *Pseudomonas* treated with CEME

注：a、c 未经处理；b、d 经 CEME 处理 12 h。

2.7 对蛋白质合成的影响

通过提取细菌可溶性总蛋白和细菌膜蛋白后，进行 SDS-PAGE 电泳，经考马斯亮蓝染色、脱色后可发现两种蛋白的蛋白条带均与对照组有明显不同。从图 6a~b 中可以看出，经 CEME 处理后的假单胞菌菌体总蛋白谱带出现了模糊不清或消失现象，而在 14.3 ku 上下的两条小分子条带变浓。通过观察图 6c~d，正常的铜绿假单胞菌膜蛋白 44.3 ku 附近有两条明显的条带，当用 CEME 处理后分子量稍高一点的条带完全消失，分子量稍低一点的条带模糊不清。说明 CEME 对铜绿假单胞菌的可溶性总蛋白和细菌膜蛋白均有影响。因为膜蛋白在细菌的生长代谢中发挥着至关重要的作用，无论其是作为受体、离子通道还是运载体，一旦膜蛋白遭到破坏，细菌的生长代谢就会发生紊乱。因此进一步推测 CEME 可能作用于膜蛋白，抑制了菌体某些蛋白的合成，导致了胞内蛋白含量的下降和缺失，这与仪淑敏等[22~23]在茶多酚对铜绿假单胞菌和沙门氏菌的研究中有相似的结论。

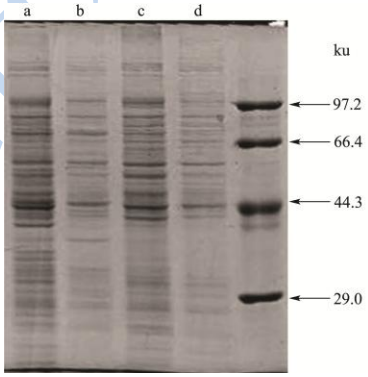


图 6 CEME 处理对细菌蛋白影响 SDS-PAGE 图谱

Fig.6 SDS-PAGE pattern of bacterial Protein

注：a~b 为 CEME 处理前后细菌总蛋白；c-d 为 CEME 处理前后细菌膜蛋白。

3 结论

根据实验结果初步得出，CEME 对铜绿假单胞菌有较强抑菌性能，并且对热、pH、紫外照射和有机溶剂均不敏感，具有较好的稳定性，同时 CEME 能够抑制铜绿假单胞菌的生长繁殖。其抑菌机理可能存在破坏细胞壁和抑制生物大分子的合成两种机理，但起主要作用的应该是 CEME 导致菌体细胞壁和细胞膜受损，表面形成孔洞，造成菌体细胞内容物的外泄从而导致细胞死亡。

参考文献

[1] Ellis A E. Non-specific defense mechanisms in fish and their

role in disease processes [J]. Developments in Biological Standardization,1980, 49:337-352

[2] Ingram G A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review [J]. Jounal of Fish Biology, 1980, 16:23-60

[3] Negus V E. The functions of mucus [J]. Acta oto-laryngologica, 1963, 56: 204-214

[4] Shephard K L. Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1993, 11:403-417

[5] Austin B, McIntosh D. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson [J]. Journal of Fish Diseases, 1988, 11:275-277

[6] Kanno T, Nakai T, Muroga K. Mode of transmission of vibriosis amongayu Plecoglossus altivelis [J]. Jouma of Aquatic Animal Health, 1989, 1:2-6

[7] Fouz B, Devesa S, Gravningen K, et al. Antibacterial action of the mucus of turbot [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1990, 10:56-59

[8] Lemaître C, Orange N, Saglio P, et al. Characterization and ion channel activities of novel antimicrobial proteins from the skin mucosa of carp (Cyprinus carpio) [J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 240: 143-149

[9] Hellio C, Pons A M, Beaupoil C, et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002, 20: 214-219

[10] Kitani Y, Tsukamoto C, Zhang G H, et al. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli* [J]. Federation of European Biochemical Sociaty, 2007, 274: 125-136

[11] Takahashi Y, Kajiwaki T, Itami T, et al. Enzymatic properties of the bacteriolytic substances in the skin mucus of yellowtail [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1987, 53: 425-431

[12] Smith V J, Fernandes J M O, Jones S J, et al. Antibacterial proteins in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10: 243-260

[13] Lee H J, Choi G J, Cho K Y. Correlation of lipid peroxidation in Botrytis cinerea caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1998, 46: 737-741

[14] Chris Z C, Stuart L C. Interaetions between dendrimer bioeides and baeterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23: 3359-3368

[15] 张军宁.凡纳滨对虾复合保鲜剂的研制及其抑菌机理初步研究[D].青岛:中国海洋大学,2012
ZHANG Jun-ning. Research on preparation and preliminary antibacterial mechanisms of compound preservative of *Litopenaeus vannamei* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012

[16] 任小青.鲶鱼骨酶解物的制备、抑菌性能、抑菌机理及其在食品中的应用研究[D].上海:东理工大学,2011
REN Xiao-qing. Preparation of the Catfish Bone Hydrolysate and Its Antimicrobial Activity, Antimierobial Mechanism and Applieation in Foods [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2011

[17] 赵海鹏.生物保鲜剂在南美白对虾保鲜中的应用及菌相研究[D].上海:海海洋大学,2010
ZHAO Hai-peng. Study on natural Preservative in keeping fresh and mieroorganism composition of Penaeu [D]. Shanghai: Ocean University of Shanghai, 2010

[18] Tao Y, Qian L H, Xie J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of Pseudomonas aeruginosa and Staphyloccocus aureus [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86: 969-974

[19] 李荣芬,素卿.微波杀菌机理研究:对细菌通透性影响的观察[J].中国消毒学杂志,1995,12(3):129-131
LI Rong-fen, Li S J. Study on germicidal mechanism of microwave： observation on the influence on bacterial permeability [J]. Chinese Journal of Disinfectio, 1995, 12(3): 129-131

[20] Thng Y L, Shi Y H, Zhao W, et al. Diseovery of a novel antimicrobial peptide using membrane binding-based approach [J]. Food Control, 2009, 20: 149-156

[21] Chen C Z, Cooper S L. Interaetions between dendrimer biocides and baeterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23: 3359-3368.

[22] Yi S M, Zhu J L, Fu L L, et al. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144: 111-117

[23] Yi S M,Wang W, Bai F L, et al. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of tea polyphenols against *Serratia marcescens* [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2014, (30):451-460