

大蒜E素对副溶血弧菌的抑菌活性及机制

蔡雪 黄雷 郑阿钦 褚宽 林华利 杨艳杰 原居林 宋大伟 姚嘉贇

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ALLICIN E AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

CAI Xue, HUANG Lei, ZHENG A-Qin, CHU Kuan, LIN Hua-Li, YANG Yan-Jie, YUAN Ju-Lin, SONG Da-Wei, YAO Jia-Yun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0248>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

克氏原螯虾一种新型甲壳素基因的鉴定和抑菌功能研究

IDENTIFICATION OF A NEW CRUSTIN AND STUDY OF ITS ANTIBACTERIAL FUNCTION FROM *PROCAMBARUS CLARKII*

水生生物学报. 2022, 46(2): 248–256 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.280>

副溶血弧菌高效消毒剂的筛选及PHMG防治对虾AHPNS的应用研究

SCREEN OF DISINFECTANT AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND THE APPLICABLE EVALUATION OF PHMG IN PREVENTING *LITOPENAEUS VANNAMEI* AHPNS

水生生物学报. 2020, 44(2): 252–260 <https://doi.org/10.7541/2020.030>

大口黑鲈 β -防御素在杆状病毒系统中的表达及抑菌活性

EXPRESSION OF β -DEFENSIN OF MICROPTERUS SALMOIDES IN BACULOVIRUS SYSTEM AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY ANALYSIS

水生生物学报. 2022, 46(12): 1838–1844 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0335>

转录组分析揭示溶藻弧菌感染早期大黄鱼的免疫应答特征

TRANSCRIPTOME ANALYSIS REVEALED THE IMMUNE RESPONSE OF LARGE YELLOW CROAKER (*LARIMICHTHYS CROCEA*) IN EARLY STAGE OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS* INFECTION

水生生物学报. 2022, 46(12): 1845–1854 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0388>

黄颡鱼拟态弧菌的鉴定、毒力相关因子及药敏特性

IDENTIFICATION, VIRULENCE-RELATED FACTORS, AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *VIBRIO MIMICUS* FROM YELLOW CATFISH, *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2020, 44(4): 799–810 <https://doi.org/10.7541/2020.096>

斑节对虾(非洲群体)肠道中哈维氏弧菌拮抗菌的筛选、鉴定及生理特性分析

SCREENING, IDENTIFICATION AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF INTESTINAL BACTERIA AGAINST *VIBRIO HARVEYI* FROM *PENAEUS MONODON*

水生生物学报. 2022, 46(12): 1876–1887 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0286>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0248

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0248

大蒜E素对副溶血弧菌的抑菌活性及机制

蔡雪^{1,2*} 黄雷^{2*} 郑阿钦² 褚宽² 林华利³ 杨艳杰^{1,2}
原居林² 宋大伟^{1#} 姚嘉赞^{2#}

(1. 湖州师范学院生命科学学院, 湖州 313000; 2. 浙江省淡水水产研究所, 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州市渔业环境与水产品质量安全重点实验室, 湖州 313001;
3. 上海莱慎生物科技股份有限公司, 上海 201600)

摘要: 为探究大蒜E素(ALE)对副溶血弧菌的抑菌活性及作用机制, 通过测定最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)和抑菌动态生长曲线, 评价ALE对副溶血弧菌的抑菌作用; 基于电镜观察及胞外 β -D-半乳糖苷酶、蛋白质含量测定, 分析ALE对副溶血弧菌细胞结构的影响; 采用结晶紫染色法检测ALE对副溶血弧菌生物被膜形成的影响; 利用RNA-Seq技术分析ALE对副溶血弧菌转录水平表达的影响。结果显示, ALE对副溶血弧菌的MIC为7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC为31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与对照组相比, MIC浓度ALE组副溶血弧菌胞外 β -D-半乳糖苷酶活性和蛋白质含量显著增加($P<0.05$), 细胞壁膜消融、内容物流失, 生物被膜形成量显著减少($P<0.05$)。转录组分析结果显示, 与对照组相比, 1/4MIC浓度的ALE组副溶血弧菌中显著下调基因145个, 主要富集在MAPK信号转导、鞭毛组装、生物膜形成等通路; ALE组副溶血弧菌中显著上调基因133个, 主要富集在氨基酸代谢、降解等通路; RNA-Seq结果与RT-qPCR验证试验结果一致。研究表明, ALE对副溶血弧菌抑菌作用强, 可能通过破坏细菌菌体结构, 抑制其生物被膜形成, 以及调控鞭毛、生物膜等基因表达, 从而发挥抑菌、减毒作用。研究结果为探明ALE抑制副溶血弧菌的作用及机理奠定良好基础。

关键词: 弧菌; 大蒜素; 抗菌药物; 抑菌机制; 转录组

中图分类号: S943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)02-022511-10



副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是水产动物最常见的致病菌之一, 可感染鱼、虾、蟹等数十种水产养殖动物, 尤其对对虾养殖危害巨大, 由其引发的急性肝胰腺坏死症(AHPND)在全球对虾主产区广泛蔓延传播, 每年造成10亿美元以上的直接经济损失^[1]。副溶血弧菌也是一种食源性致病菌, 人类食用了被该菌污染的水产品, 会出现腹泻、呕吐等急性肠胃炎症状, 严重时甚至危及生命安全^[2]。在水产养殖中, 抗生素、消毒剂等仍是防治副溶血弧菌感染的主要药物^[3], 但长期使用抗生素不仅会造成菌株耐药性, 破坏微生态平衡, 还会引起食品安全问题。随着我国水产绿色健康养殖“五大行

动”的实施, 水产养殖抗生素用药减量势在必行, 亟须寻求更加绿色安全的“替抗”药物。

大蒜被誉为“土里长出来的天然抗生素”, 在我国有着悠久的药用历史。大蒜素是大蒜主要的生物活性成分, 其学名为二烯丙基硫代亚磺酸酯, 它能不可逆的抑制巯基蛋白酶活性^[4], 从而发挥抗菌作用。大蒜素具有广谱抗菌特性, 不仅对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等人类病原菌有抗菌活性^[5-7], 而且还能抑制哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)和副溶血弧菌等水产动物病原菌的生

收稿日期: 2024-06-19; 修订日期: 2024-08-13

基金项目: 浙江省“领雁”研发攻关计划(2024C02005和2022C2027); 国家自然科学基金-青年项目(32303057)资助 [Supported by the “Leading Goose” R & D Program of Zhejiang (2024C02005 and 2022C2027); National Natural Science Foundation of China (32303057)]

作者简介: 蔡雪(2000—), 女, 硕士研究生; 主要从事水生动物病害研究。E-mail: cx2423465312@163.com 黄雷(1992—), 男, 助理研究员; 主要从事水生动物病害防控研究。E-mail: huanglein@sina.com *共同第一作者

通信作者: 宋大伟, 博士, 副教授; E-mail: 03059@zjhu.edu.cn 姚嘉赞, 博士, 研究员; E-mail: yaojiayun@126.com #共同通信作者

长^[8-10]。由于大蒜具有食药同源的特性,水产养殖人员常在养殖过程中投喂大蒜素或大蒜提取物,用于提高养殖动物免疫力和抗病能力。据报道,在饲料中拌服大蒜素能显著提高大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[11]、印度明对虾(*Fenneropenaeus indicus*)^[12]抗弧菌感染的能力。然而,大蒜素稳定性较差,在光、热、碱性条件下很容易降解,无法起到长效抗菌作用,使其推广和应用受到限制。

为创制更加稳定长效的大蒜素类药物,人们通过改造大蒜素的分子结构,研制出新的仿生抗菌药物。乙蒜素是最具代表性的大蒜素仿生药物之一,它是大蒜素的乙基同系物,目前被作为广谱杀菌仿生农药,广泛用于防治植物青枯病、炭疽病、瓜类霜霉病、辣椒疫病等细菌、真菌性病害^[13,14]。大蒜素硫代亚磺酸类似物也具有较好的抗菌效果,其热稳定性优于大蒜素,而且对大肠杆菌、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)和真菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的抑菌活性更强^[15]。大蒜素仿生药物的卓越抗菌能力主要归因于其硫代亚磺酸盐基团,它能与菌体巯基结合抑制酶活性,通过影响细菌正常生物代谢、降低细菌分泌物生成和黏附能力发挥抗菌作用^[16,17]。裴天容等^[18]研究发现大蒜素前体物蒜氨酸能与大肠杆菌、金黄葡萄球菌菌体蛋白质、细菌酶蛋白结合,进而阻断细菌与环境物质交换,抑制细菌生命活动。Liu等^[19]研究发现乙蒜素可破坏丁香假单胞菌细胞膜的完整性,抑制生物膜形成,并下调鞭毛组装相关基因的表达,从而影响其运动能力和致病力。当前研究表明,大蒜素仿生药物在病菌防治上有很好的应用前景,但此类药物多见于植物病害的防治^[20-22],鲜有用于水产病害的研究与应用。

ALE是改变普通大蒜素抗菌活性基团外分子结构合成的有机化合物,它保留了抗菌活性部位——硫代亚磺酸酯结构,不仅性质稳定、无异味,而且杀菌消毒效果良好^[23]。研究表明,ALE可抑制青霉菌(*Penicillium raperi*)的孢子萌发和菌丝生长,对青霉菌的抑制效果是普通大蒜素的41.6倍^[24]。目前ALE主要用于蔬果保鲜、种子消毒等领域,其对水产病原菌的抑菌活性及作用机制仍不清楚。本文探究ALE对副溶血弧菌的体外抑菌活性,并从细胞结构、转录组水平解析其抗菌作用机制,以期对弧菌病绿色药物研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药品

大蒜E素(ALE,上海莱慎生物科技股份有限公

司)、二甲基亚砷(DMSO,麦克林生物技术有限公司)、刃天青(上海源叶生物科技有限公司)、2216E肉汤和2216E营养琼脂(青岛海博生物技术有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司)、邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG,北京索莱宝科技有限公司)、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl,北京索莱宝科技有限公司)、考马斯亮蓝G-250(上海碧云天生物技术股份有限公司)、电镜固定液(赛维尔生物技术有限公司)、Prime-Script™ RT reagent Kit逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司)。

1.2 菌株培养

副溶血弧菌CICC 21617购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。从冰箱取出菌株副溶血弧菌,接种于2216E琼脂培养基,于28℃条件下静置培养1—2d,直至长出形态一致的菌落,即完成细菌的活化复苏。挑取单菌落接种于含5 mL 2216E肉汤培养基的试管中,于28℃ 150 r/min条件下震荡培养24h,通过比浊法测定副溶血弧菌菌液浓度,在后续实验中用2216E肉汤培养基调至所需浓度。

1.3 最小抑菌浓度(MIC)测定

采用刃天青法^[25]测定ALE对副溶血弧菌的MIC,在96孔板中加入100 μ L 1×10^5 CFU/mL的副溶血弧菌菌液,在第一排孔中200 μ L ALE原液,逐排进行2倍梯度稀释,使药物终浓度分别为7.8、3.9、1.9、1、0.5和0.2 μ g/mL,另设置1排阳性对照(100 μ L菌液+100 μ L 2216E肉汤培养基)和1排阴性对照(200 μ L 2216E肉汤培养基),每组3个孔(即3个重复)。将96孔板置于28℃恒温培养箱中培养24h,每孔加入50 μ L刃天青溶液,培养24h后观察菌液颜色(粉色表示有菌生长,蓝色表示抑菌),无菌生长的最低药物浓度即为MIC。

1.4 最小杀菌浓度(MBC)测定

在MIC实验基础上,从清澈透明的孔中吸取100 μ L菌液,均涂布于2216E琼脂平板上,于28℃的恒温培养箱培养24h,以平板上未长出菌落的最低浓度作为该药物对该菌株的MBC。

1.5 生长曲线测定

用2216E肉汤培养基将副溶血弧菌菌液浓度调整至 1×10^7 CFU/mL,添加ALE并进行2倍梯度稀释,使得ALE的终浓度分别为MIC、1/2MIC和1/4MIC。将试管置于28℃、180 r/min摇床中培养,每隔2h取培养液测定OD₆₀₀吸光值。以培养时间为横坐标,OD₆₀₀值为纵坐标绘制生长曲线^[26]。

1.6 细胞膜通透性测定

设置3个不同浓度(MIC、1/2MIC和1/4MIC)的

ALE组和1个空白对照组(添加等量PBS), 每组3个试管。将所有试管放入28℃、180 r/min 摇床中培养, 6h后测定蛋白质泄露量(考马斯亮蓝法)^[27], 12h后测定β-半乳糖苷酶活性(ONPG法)^[28]。

1.7 电镜观察

在含 1×10^7 CFU/mL副溶血弧菌菌液的试管中, 加入终浓度为1/2MIC的ALE (ALE组), 另设置添加等量PBS的对照组, 在28℃ 180 r/min条件下培养24h, 分别取1.5 mL菌液, 于4℃ 8000 r/min条件下离心5min, 弃去上清, 用无菌PBS洗涤沉淀3次, 收集沉淀, 加入2.5%戊二醛, 放入4℃冰箱中固定12h, 通过透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察菌体结构和形态。

1.8 生物被膜含量测定

在 1×10^7 CFU/mL副溶血弧菌菌液中加入终浓度为1/4MIC、1/2MIC和MIC的ALE, 于28℃、180 r/min条件下培养6h, 置于恒温培养箱静置培养12h, 待管壁上形成细菌生物膜, 弃去菌液。参考Mizan等^[29]的结晶紫染色法测定生物膜含量, 即在试管中加入1 mL 2% (v/v)结晶紫染色2min, 用自来水反复轻洗3—5次, 再加入1 mL冰醋酸溶解试管壁显色物质, 测定溶液的570 nm吸光值。

1.9 转录组学分析

样品制备、RNA提取和cDNA文库构建及测序 在 1×10^8 CFU/mL副溶血弧菌菌液中加入终浓度为1/4MIC的ALE, 作为ALE组(ALE), 另设加入等量PBS的对照组(CK), 每组3个重复。将所有试管置于28℃、180 r/min条件下培养16h, 取出样品迅速置于液氮中, 随后转存-80℃冰箱。参照程安怡等^[30]所述方法处理样品, 即采用TRIzol法提取菌液总RNA, 去除rRNA, 合成双链cDNA, 再依次进行末端修复、加碱基A、加测序接头处理、PCR纯化和富集等操作, 构建最终的cDNA文库, 然后用Nova SeqXPlus平台进行测序。

测序数据质控、功能注释及差异表达分析 对下机数据进行质控处理, 去除包含Adapter的序列和低质量序列(如测序质量值小于Q20的序列), 使用统计学方法对所测得的reads进行碱基质量、碱基错误率等分析。采用Bowtie2^[31]将所有测序reads与GenBank中副溶血弧菌RIMD 2210633株基因组进行比对, 获得用于后续分析的mapped data。将测序数据上传至KEGG数据库进行注释, 全面获得基因的功能信息。采用主成分分析(PCA)表征不同组别样品转录组的总体差异。使用DESeq2包^[32]筛选出各组间差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs), 即符合 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$, $q < 0.05$ (q 值为

校正后的 P -value)的基因, 并通过表达量差异火山图可视化显著上调、下调的基因数量及分布。采用R脚本对DEGs进行KEGG富集分析^[33], 当经过校正的 P 值(P adjust) < 0.05 时, 认为此KEGG PATHWAY被显著富集。

RT-qPCR 验证 为验证RNA-Seq测序结果的可靠性, 随机选取8个鞭毛组装、生物膜形成、MAPK信号通路和VI型分泌系统相关的差异表达基因进行RT-PCR验证实验。使用NCBI网站的Primer-BLAST功能设计目的基因引物(表1), 并由浙江尚亚生物技术有限公司合成。采用逆转录试剂盒将菌液RNA反转录为cDNA, 参照Ma等^[34]的方法进行RT-PCR实验: (1)总体系10 μL: $2 \times Taq$ Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL; 上、下游引物各0.4 μL; cDNA模板1 μL; ddH₂O 3.2 μL; (2)反应程序: 95℃预变性10min; 95℃变性10s; 55℃退火10s; 72℃延伸30s, 45个循环。以16S RNA为内参基因, 每个样品设置3个重复。

1.10 数据处理与分析

实验数据采用SPSS 27.0.1进行统计分析, 采用

表1 RT-qPCR所用引物

Tab. 1 Primers used for RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')	T_m 值 T_m value	产物 Product (bp)
27-F	AGAGTTTGATCCTGGC TCAG	55.40	1465
1492-R	TACGGCTACCTTGTTA CGACTT	55.81	
<i>FliF</i> -F	CTATCGCATGCAGGAG CAGA	55.75	115
<i>FliF</i> -R	ATCCAATCCGGTTGGC AGTT	55.40	
<i>FliG</i> -F	GAAACGCTGGCGCGA TTTAT	55.40	145
<i>FliG</i> -R	GCTGCGCAATACGGA AGATG	57.45	
<i>FlgE</i> -F	TCTAGCAAAAAGTGAG CGGCA	55.40	209
<i>FlgE</i> -R	TTAGGTTCGACGTTTGA GCC	55.75	
<i>FleQ</i> -F	CCAAAACCTGGCAGAA GTGGC	57.45	153
<i>FleQ</i> -R	GTCCCATGGAGTAGG GGAGT	59.50	
<i>CAT1</i> -F	CTAACCTAGCGGGCG ATCTG	59.50	103
<i>CAT1</i> -R	GCAAGACGCGAACCG TATTC	57.45	
<i>Hcp</i> -F	CACATGGCAAGAAGC TCACG	57.45	113
<i>Hcp</i> -R	GACGGTGTACACGTTG ACCA	57.45	
<i>ClpV</i> -F	ACGAAGCAGAAACCA CGCTA	55.40	190
<i>ClpV</i> -R	GCACGAGCAGTTTCGG TTTT	55.40	
<i>Lip</i> -F	TCACGAACTGACGTCA CCAG	57.45	190
<i>Lip</i> -R	GCGAAACGCGACTGA GAATC	57.45	

单因素方差分析(One-way ANOVA)和独立样本 T 检验(Independent T -test)计算各组数据的差异。文中图表用Origin 2021或Microsoft Visio 2023绘制。

2 结果

2.1 体外抑菌活性

刃天青试验结果显示, ALE浓度大于 $7.81 \mu\text{g/mL}$ 时菌液显蓝色(无细菌生长), 表明ALE对副溶血弧菌的MIC为 $7.81 \mu\text{g/mL}$ (图 1a); 从96孔板中吸取大于MIC浓度的各孔菌液进行平板涂布, 结果显示ALE浓度大于 $31.25 \mu\text{g/mL}$ 时无菌落长出(图 1b), 表明其MBC为 $31.25 \mu\text{g/mL}$ 。

2.2 生长曲线

基于菌液 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 吸光值比较各组副溶血弧菌的生长情况, 从生长曲线图 2中可见, 3个ALE处理组(MIC、1/2MIC、1/4MIC)菌液的 OD_{600} 值均低于对照组, 且药物浓度越高其 OD_{600} 值越低, 其中MIC组的 OD_{600} 值始终保持在较低水平(图 2)。

2.3 细胞膜通透性

基于 β -D-半乳糖苷酶活性以及蛋白质含量表征ALE对副溶血弧菌细胞膜通透性的影响, 结果显示: 随着药物浓度增加, β -D-半乳糖苷酶活性和蛋白质含量均呈上升趋势, 其中MIC组的 β -D-半乳糖苷酶活性和蛋白质含量均显著高于对照组($P < 0.05$), 1/2MIC组的 β -D-半乳糖苷酶活性显著高于对照组($P < 0.05$; 图 3), 表明ALE处理增加了细菌细胞膜通

透性, 破坏了细菌对细胞内外物质交换的调控作用, 导致胞内大分子物质外漏, 进而影响细菌生理代谢活动, 甚至导致细菌死亡。

2.4 电镜观察结果

从透射电镜图中可见, 对照组副溶血弧菌结构完整, 表面光滑, 细胞内容物分布均匀(图 4a); 而ALE处理细菌细胞质大量减少, 颜色变浅, 部分细

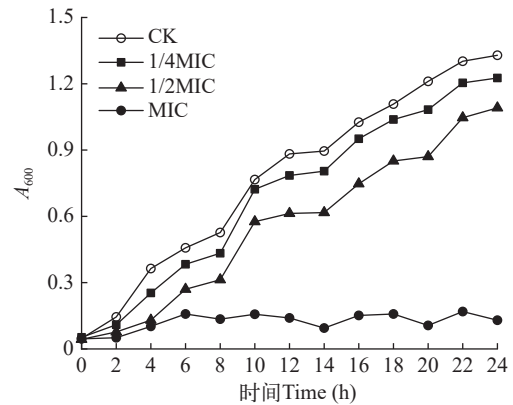


图 2 不同浓度ALE作用下副溶血弧菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *V. parahaemolyticus* with different concentrations of ALE treatment

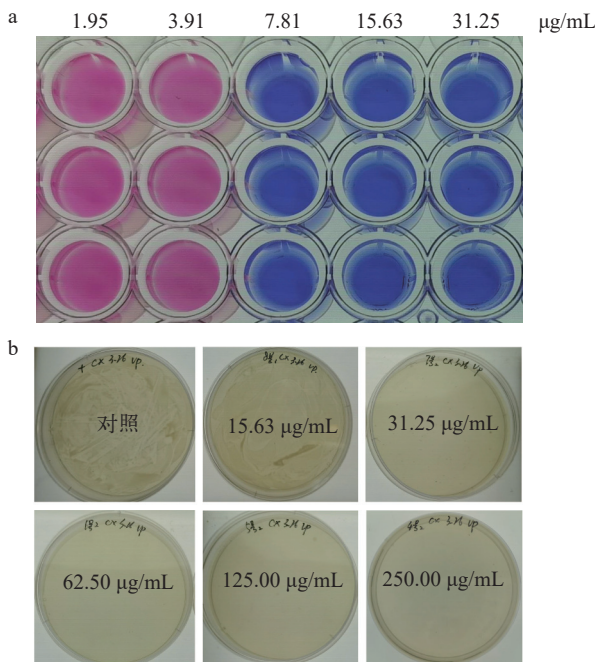


图 1 ALE对副溶血弧菌的MIC (a) 和MBC (b)

Fig. 1 MIC (a) and MBC (b) of ALE against *V. parahaemolyticus*

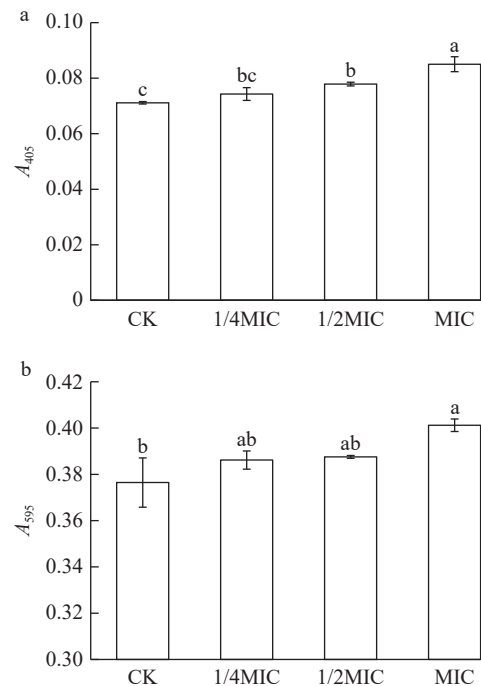


图 3 ALE对副溶血弧菌 β -D-半乳糖苷酶活性(a)及蛋白质含量(b)的影响

Fig. 3 Effects of ALE on the β -D-galactosidase activity (a) and protein content (b) of *V. parahaemolyticus*

误差线上字母不同表示组间存在显著差异; 下同

Different letters on the error line indicate significant differences between groups. The same applies below

胞壁、膜边缘出现消融(图 4b), 菌体细胞有一些明亮的孔洞, 出现了空泡化现象(图 4c)。在扫描电镜图中, 对照组菌体细胞保持了完整的形态, 边缘分明且整齐, 外观圆润且具有较好的光折射性(图 4d); 经 ALE 处理后菌体细胞形态遭到破坏, 细胞发生裂解, 细胞表面粘附了大量破损的细胞碎片(图 4e), 而且部分菌体呈现凹陷、起皱及囊泡状变化, 并且有断裂的迹象(图 4f)。透射电镜和扫描电镜结果均表明, ALE 能破坏副溶血弧菌细胞结构的完整性, 可直接导致菌体裂解死亡, 或通过影响细胞膜的通透性, 造成胞内大分子的泄漏, 从而影响细菌正常生理活动。

2.5 生物被膜含量

对照组副溶血弧菌可在摇菌管壁上形成一层生物被膜, 结晶紫染色后颜色较深(结果未展示), 而 ALE 处理后副溶血弧菌的生物被膜形成显著减少, 其中 1/2MIC 和 MIC 组细菌生物被膜含量显著低于对照组($P < 0.05$; 图 5), 表明 ALE 处理抑制了副溶血弧菌生物被膜的形成, 有助于阻止细菌对宿主的定植和感染, 切断细菌群体间的信号交流, 并降低细菌生物被膜的耐药作用。

2.6 转录组学分析

数据质控及总体差异分析 质控后所有样品均获得 2200 万条以上 Clean Reads, 碱基错误率均低于 0.012%, Q20 质控合格率均大于 98.8%, 与参考基因组的比对率均大于 92.5% (表 2), 表明测序数据可靠, 可用于后续分析。PCA 分析结果显示, ALE 组和对照组样品沿 PC1 轴明显区分开(图 6a), 表明二者转录组存在差异。基于 DESeq2 软件筛选出各组样品转录显著差异的基因, 并绘制表达量差异火山图, 结果显示: 与对照组相比, ALE 组有 133 个显

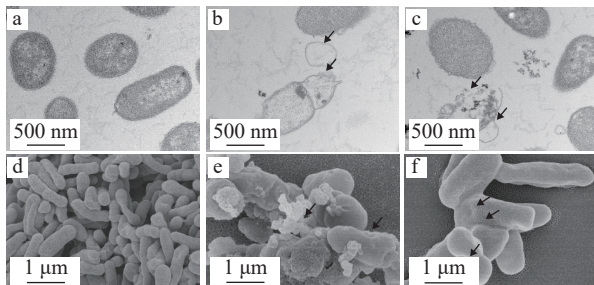


图 4 ALE 对副溶血弧菌细胞结构的影响

Fig. 4 Effects of ALE on cell structure of *V. parahaemolyticus* a, b, and c are transmission electron microscopy images; e, f, and g are scanning electron microscopy images; a and d represent the CK group; b, c, f, and g represent the ALE group

著上调基因和 145 个显著下调基因(图 6b)。

KEGG 富集分析 将 ALE 组中显著下调、上调基因分别进行 KEGG 富集分析, 结果显示: 下调基因有 6 条通路被显著富集($P_{\text{adjust}} < 0.05$), 主要包括 MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、鞭毛组装(Flagellar assembly)、生物膜形成-铜绿假单胞菌(Biofilm formation - *Pseudomonas aeruginosa*)等通路, 其中涉及 MAPK 信号通路的为过氧化氢酶相关基因, 鞭毛组装通路的为极性鞭毛蛋白(*FlaD*、*FlaJ*、*FlgM*、*MotX*)、趋化性蛋白(*LafT*)、鞭毛组装蛋白等相关基因, 生物膜形成通路的为保守假设蛋白、*ClpA/B* 型蛋白酶等相关基因(图 7a); 上调基因也有 6 条通路被显著富集($P_{\text{adjust}} < 0.05$), 主要包括精氨酸、脯氨酸、 β -丙氨酸、丙酸等代谢相关通路, 以及赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解相关通路(图 7b)。

RT-qPCR 验证 随机选取转录组测序结果中显著下调的 8 个基因进行 RT-qPCR 验证试验。结果显示, 与转录组测序结果一致, RT-qPCR 试验中鞭毛组装相关基因(*FliF*、*FliH*、*FlgE*)、生物膜形成相关基因(*FleQ*、*Hcp*、*ClpV*)、MAPK 信号通路相关基因(*CAT1*)及细菌 VI 型分泌系统相关基因(*Lip*)

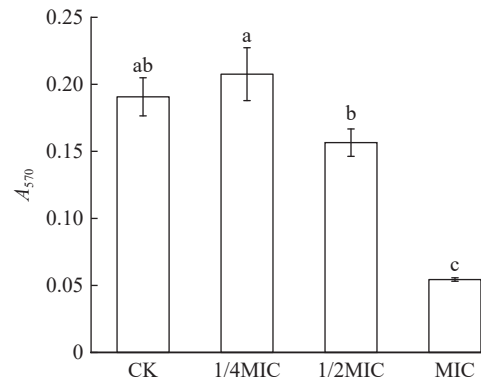


图 5 ALE 对副溶血弧菌生物被膜的影响

Fig. 5 Effects of ALE on the biofilms of *V. parahaemolyticus*

表 2 质控数据统计

Tab. 2 Quality control data statistics

样品名称 Sample name	Reads 数 Clean Reads	碱基错误率 Raw error rate (%)	Q20 Raw Q20 (%)	参考基因比对率 Reference gene alignment rate (%)
CK1	20596202	0.0117	98.87	92.50
CK2	22410474	0.0119	98.80	93.03
CK3	21736136	0.0118	98.85	93.41
ALE1	20806782	0.0118	98.87	94.59
ALE2	20969700	0.0117	98.89	94.91
ALE3	22944334	0.0118	98.88	94.97

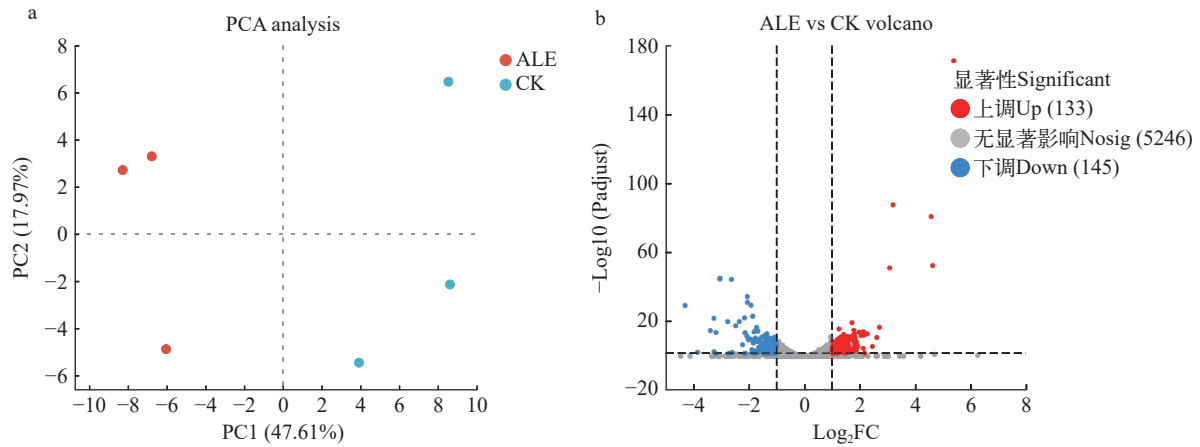
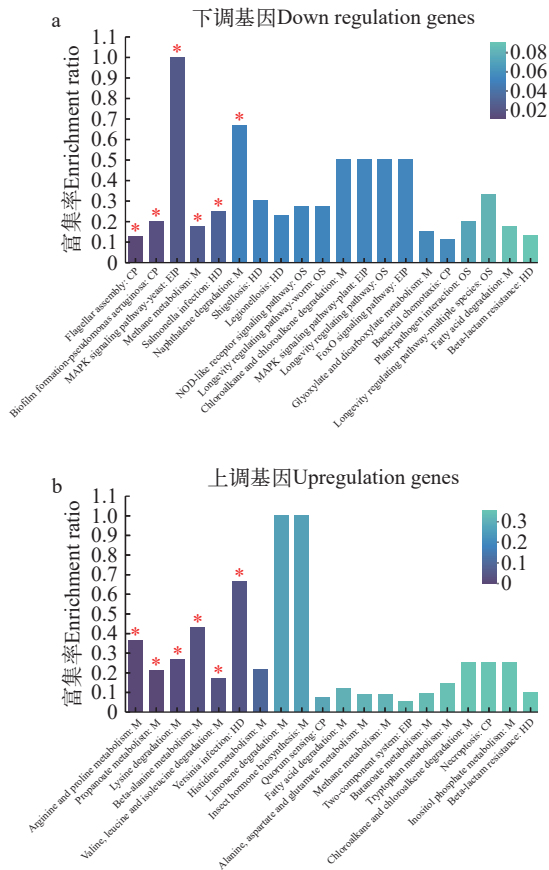


图6 主成分分析(PCA)图(a)与差异表达基因火山图(b)

Fig. 6 Principal component analysis (a) and volcano plots of significantly differentially transcribed genes (b)

图7 ALE组中显著下调(a)、上调(b)基因的KEGG富集分析
Fig. 7 KEGG enrichment analysis of significantly downregulated (a) and upregulated (b) genes in the ALE group compared to the control group

横坐标表示通路的名称, 柱子颜色表示富集的显著性(即P值), $P < 0.05$ 标记为红色星号

The horizontal axis represents the pathway name, and the column color represents the significance of the difference (P value). $P < 0.05$ is marked with a red asterisk

的表达量均显著下调($P < 0.05$; 图8), 表明转录组测序结果可信度较高。

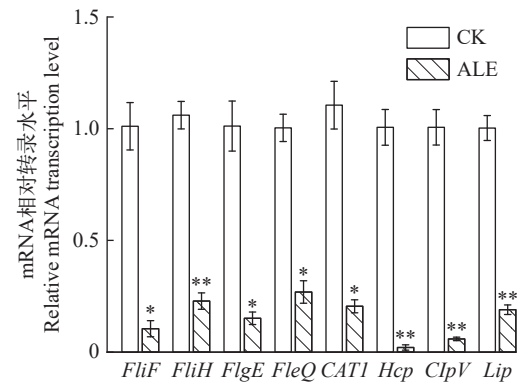


图8 差异表达基因的RT-qPCR验证

Fig. 8 Verification of differentially expressed genes by qRT-PCR

*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$

* indicates $P < 0.05$; ** indicates $P < 0.01$

3 讨论

3.1 ALE对副溶血弧菌具有较强的抑杀活性

大蒜素有着“天然抗生素”之称, 具有广谱的抗菌作用, 可抑制鲁耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)、哈维氏弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和副溶血弧菌等水产致病菌的生长^[8-10, 35], 对对虾黑鳃病、草鱼肠炎病、烂腮病、赤皮病和鲢暴发性出血症的治疗效果较好^[12, 36]。然而, 大蒜素存在刺激性大、热稳定性差等缺点, 因此人们通过改造大蒜素分子结构研制性质更稳定的仿生药物。本研究的ALE即为改造大蒜素抗菌活性基团外合成的大蒜素衍生物, 研究结果表明ALE对副溶血弧菌MIC为 $7.81 \mu\text{g/mL}$ 、MBC为 $31.25 \mu\text{g/mL}$, 约为魏宇清等^[37]报道的大蒜乙醇提取物对副溶血弧菌MIC值(6.25 mg/mL)的1/800, 以及马弋等^[9]报道的大蒜提取物MIC值(18.25 mg/mL)的1/2300, 与氟苯尼考、硫酸新霉素、多西环素等抗生素的MIC值接近^[38, 39], 表明ALE对

对副溶血弧菌的抗菌作用远强于大蒜素,可作为抗生素的潜在替代药物。

3.2 ALE破坏副溶血弧菌细胞结构的完整性

抗菌药物可通过破坏细菌细胞膜结构,使其选择通透性功能受损,从而影响细菌的功能^[40]。胞外 β -D-半乳糖苷酶活性和蛋白质含量是评价细菌细胞膜通透性的重要指标,目前已被用于评估抗菌药物对大肠杆菌^[28]、解淀粉芽孢杆菌^[41]、嗜水气单胞菌^[42]等细胞膜完整性的影响。代博仁等^[41]研究发现大蒜有机硫化物处理可提高解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)胞外 β -半乳糖苷酶活性,从而判定该物质影响了细菌细胞膜的完整性;孙杨等^[43]研究发现柠檬草精油处理副溶血弧菌后,导致上清液中蛋白质含量、AKP活性和电导率上升,细胞结构遭到破坏。本研究ALE处理后副溶血弧菌胞外的 β -D-半乳糖苷酶活性、蛋白质泄露量提高,表明ALE处理可能损伤了副溶血弧菌细胞膜结构,导致其细胞膜通透性增加。电镜结果显示,经ALE处理后,副溶血弧菌的细胞壁、膜边缘出现消融,菌体内染色不均匀,细胞内容物泄露,表明ALE破坏了副溶血弧菌的细胞结构,增加了其细胞膜通透性,导致细胞内容物外漏,进而可能影响一系列生理活动。

3.3 ALE抑制副溶血弧菌生物被膜的形成

生物被膜是细菌为适应环境而形成的天然屏障,副溶血弧菌形成生物被膜后能更好地躲避抗菌药物的杀伤作用,更加有效地抵御宿主的免疫防御机制^[44],给弧菌病治疗带来了极大的困难。现有研究表明,抑制细菌生物被膜形成是抗副溶血弧菌药物的重要作用机制,如肖苗^[45]的研究发现亚抑菌浓度下麝香草酚可有效抑制副溶血弧菌生物被膜的形成和毒力基因的表达水平;芦平等^[46]研究显示1/8MIC浓度以上原儿茶酸显著抑制副溶血弧菌生物被膜的形成,抑制率达20%以上;孟赫诚等^[47]研究表明舍曲林对副溶血弧菌具有良好的抗菌活性与生物被膜抑制作用,在不影响副溶血弧菌生长的浓度下,可降低其毒力基因的转录水平。与这些研究结论一致,本研究发现1/2MIC以上浓度的ALE能有效抑制副溶血弧菌生物被膜的形成,表明其可能通过抑制细菌生物被膜形成发挥减毒作用。

3.4 ALE对副溶血弧菌转录组的影响

转录组学技术可以全面研究药物干预后菌体细胞内所有转录基因的表达变化,能够更深入、系统地确定药物的作用机制。大量研究表明,大蒜素类衍生物处理可显著改变病原菌的转录组组成,如Liu等^[19]用乙蒜素处理丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种,筛选到1793个差异表达基因;冯少龙等^[48]研

究发现大蒜提取物中有机硫化物阿藿烯和二烯丙基硫醚能显著改变阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)的转录组,并通过与细胞内含巯基的蛋白或酶结合致细菌死亡。在本研究中,ALE组和对照组细菌转录组存在明显差异,ALE处理主要引起副溶血弧菌的MAPK信号通路、鞭毛组装、生物膜形成-铜绿假单胞菌等通路相关基因下调。MAPK信号通路具有调节细胞的增殖、转化、分化和凋亡等功能,能够抑制由过氧化氢、白细胞介素-1 β 等因素诱导的细胞损伤^[49]。细菌鞭毛具有运动性和趋化性的功能,还参与生物膜形成、毒力因子分泌等过程^[50]。细菌生物膜具有物质运输、信息传递、能量转换等功能,维持细菌各项正常的生理活动^[51]。因此,ALE处理抑制MAPK信号通路、鞭毛组装、生物膜形成相关基因的表达,可能会影响副溶血弧菌的抗炎功能、运动性能和致病能力,甚至会造成菌体细胞凋亡。

4 结论

ALE在体外对副溶血弧菌的抑菌活性强,可通过破坏菌体细胞结构,改变其细胞膜通透性,并抑制细菌生物被膜的形成能力,进而发挥副溶血弧菌的杀灭作用。ALE可能通过下调副溶血弧菌鞭毛组装、生物膜形成、MAPK信号转导等通路,调控其生理生化功能、毒力及致病性。本研究为探明ALE抑制副溶血弧菌作用机理奠定了良好的基础,有望进一步将其开发为新型抗菌药,为副溶血弧菌防治提供新的解决方案。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Yu Y B, Choi J H, Kang J C, et al. Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022(166): 105545.
- [2] Yu Q, Niu M, Yu M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai [J]. *Food Control*, 2016(60): 263-268.
- [3] Chen H J, Zhang X, Xu G P, et al. Screen of disinfectant against *Vibrio parahaemolyticus* and the applicable evaluation of PHMG in preventing *Litopenaeus vannamei* AHPNS [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 252-260. [陈红菊, 张轩, 许高朋, 等. 副溶血弧菌高效消毒剂的筛选及PHMG防治对虾AHPNS的应用研究 [J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 252-260.]
- [4] Cai Y, An M M, Wang R. Research progress on the antibacterial effect of allicin [J]. *Chinese Journal of Drug Application and Monitoring*, 2007(5): 12-14. [蔡芸, 安毛毛, 王睿. 大蒜素抗菌作用的研究进展 [J]. 中国药物应

- 用与监测, 2007(5): 12-14.]
- [5] Sharifi-Rad J, Hoseini Alfatemi S, Sharifi Rad M, *et al.* Antimicrobial synergic effect of allicin and silver nanoparticles on skin infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spp [J]. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 2014, **4**(6): 863-868.
- [6] Bhatwalkar S B, Gound S S, Mondal R, *et al.* Antibiofilm and antibacterial activity of *Allium sativum* against drug resistant Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from patient samples and food sources [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2019, **59**(2): 171-179.
- [7] Guo Q H, Meng J, Zhao L X, *et al.* Analysis of bacteriostasis and volatile components of ultrasonic garlic extract [J]. *China Condiment*, 2023, **48**(6): 36-40. [郭全海, 孟君, 赵利雪, 等. 超声波大蒜提取物抑菌性及挥发性成分分析 [J]. 中国调味品, 2023, **48**(6): 36-40.]
- [8] Vaseeharan B, Prasad G S, Ramasamy P, *et al.* Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrio harveyi* isolated from black gill-diseased *Fenneropenaeus indicus* [J]. *Aquaculture International*, 2011, **19**(3): 531-539.
- [9] Ma Y, Zhu B T, Wang T. Study on the antibacterial effect of allicin on *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2017, **28**(1): 130-132. [马弋, 朱必婷, 王田. 大蒜素对副溶血弧菌抑菌作用的研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2017, **28**(1): 130-132.]
- [10] Zheng X Y, Ouyang Y N, Yang Y C, *et al.* Study on the synergistic effect of allicin and gallnut on the inhibition of *Vibrio* [J]. *Agricultural Development & Equipments*, 2019, **4**: 115-117. [郑小燕, 欧阳屹南, 杨焯灿, 等. 大蒜素与五倍子协同作用对弧菌的抑制研究 [J]. 农业开发与装备, 2019, **4**: 115-117.]
- [11] Li H T, Huang B, Liu B L, *et al.* Effects of allicin on growth and disease resistance in turbot [J]. *Fisheries Science*, 2020, **39**(4): 539-544. [李会涛, 黄滨, 刘宝良, 等. 大蒜素对大菱鲆幼鱼生长及抗病力的影响 [J]. 水产科学, 2020, **39**(4): 539-544.]
- [12] Yang Z M, Vaseeharan B, S. Prasad G, *et al.* Antibacterial activity of *Allium sativum* against multidrug-resistant *Vibrio harveyi* isolated from black gill-diseased *Fenneropenaeus indicus* [J]. *Fishery Information & Strategy*, 2012, **27**(3): 219-223. [杨仲明, Vaseeharan B, S. Prasad G, 等. 大蒜对印度明对虾黑鳃病原耐药菌株哈维氏弧菌抗菌活性的研究 [J]. 渔业信息与战略, 2012, **27**(3): 219-223.]
- [13] Yang T M, Tang M L, Zhang S Y, *et al.* Field efficacy evaluation of three pesticides, including Ethylicin on black rot disease of citrus fruits [J]. *Southern Horticulture*, 2018, **29**(6): 21-22. [阳廷密, 唐明丽, 张素英, 等. 乙蒜素等3种药剂对贡柑黑腐病的田间药效评价 [J]. 南方园艺, **29**(6): 21-22.]
- [14] Zheng D Y, Gu A X, Zuo D Y, *et al.* Effects of three plant growth regulators on fungicides against *Fusarium wilt* of cotton [J]. *China Cotton*, 2022, **49**(5): 14-18. [郑德有, 顾爱星, 左东云, 等. 3种植物生长调节剂对杀菌剂防治棉花枯萎病效果的影响 [J]. 中国棉花, 2022, **49**(5): 14-18.]
- [15] Leontiev R, Hohaus N, Jacob C, *et al.* A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin [J]. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1): 6763.
- [16] Marchese A, Barbieri R, Sanches-Silva A, *et al.* Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016(52): 49-56.
- [17] Chang C L, Qu F, Feng H, *et al.* Evaluation of the activity of nine biogenic fungicides against apple anthracnose leaf blight in laboratory [J]. *South China Agriculture*, 2020, **14**(15): 133-134. [常翠莲, 渠非, 冯浩, 等. 9种生物源杀菌剂对苹果炭疽叶枯病菌的室内活性评价 [J]. 南方农业, 2020, **14**(15): 133-134.]
- [18] Pei T R, Li M Q. Study on the antibacterial mechanism of alliin in vitro [J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2022, **38**(10): 1629-1633. [裴天容, 李明强. 蒜氨酸体外抗菌机制的研究 [J]. 现代医药卫生, 2022, **38**(10): 1629-1633.]
- [19] Liu T, Ren X, Cao G, *et al.* Transcriptome analysis on the mechanism of ethylicin inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit [J]. *Microorganisms*, 2021, **9**(4): 724.
- [20] Zhang S, Zhang M, Khalid A R, *et al.* Ethylicin prevents potato late blight by disrupting protein biosynthesis of *Phytophthora infestans* [J]. *Pathogens*, 2020, **9**(4): 299.
- [21] Lu H, Shen Z, Xu Y, *et al.* Immune mechanism of ethylicin-induced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* in Rice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, **71**(1): 288-299.
- [22] Huang Y, Li H, Zhao G, *et al.* Ethylicin inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* in vitro and in vivo [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, **71**(3): 1405-1416.
- [23] Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences. A synthesis method of allicin derivatives: CN201110324112.9 [P]. 2013-04-24. [中国科学院上海有机化学研究所. 一种大蒜素类衍生物的合成方法: CN201110324112.9 [P]. 2013-04-24.]
- [24] Qi F L. Antifungal activity and mechanism of Allicin sulfoxide [D]. Shanghai: Fudan University. 2004. [戚飞龙. 乙蒜素亚砷抗真菌活性及机制 [D]. 上海: 复旦大学. 2004.]
- [25] Ismail T F, Nakamura A, Nakanishi K, *et al.* Modified resazurin microtiter assay for in vitro and in vivo assessment of sulfamonomethoxine activity against the fish pathogen *Nocardia seriolae* [J]. *Fisheries Science*, 2012, **78**(2): 351-357.
- [26] Zhu L D, Chen K, Xi B W, *et al.* In vitro antibacterial

- effect of fraxetin on pathogenic *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(5): 984-992. [朱璐丹, 陈凯, 刁丙文, 等. 秦皮素的抑菌作用及其对嗜水气单胞菌毒力的影响 [J]. 中国水产科学, 2019, **26**(5): 984-992.]
- [27] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2): 248-254.
- [28] Liu R J, Xing X G, Yu Z Z, *et al.* The effect of phospholipase C on the membrane permeabilization of *Escherichia coli* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, **31**(7): 32-36. [刘睿杰, 幸新干, 于榛榛, 等. 磷脂酶C对大肠杆菌细胞膜通透性的影响 [J]. 现代食品科技, 2015, **31**(7): 32-36.]
- [29] Mizan M F R, Jahid I K, Kim M, *et al.* Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation [J]. *Biofouling*, 2016, **32**(4): 497-509.
- [30] Cheng A Y, Wang Y Y, Weng H S *et al.* Transcriptome analysis revealed the immune response of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in early stage of *Vibrio alginolyticus* infection [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, **46**(12): 1845-1854. [程安怡, 王永阳, 翁华松, 等. 转录组分析揭示溶藻弧菌感染早期大黄鱼的免疫应答特征 [J]. 水生生物学报, 2022, **46**(12): 1845-1854.]
- [31] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nature Methods*, 2012, **9**(4): 357-359.
- [32] Anders S, Huber W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package [J]. *Heidelberg, Germany: European Molecular Biology Laboratory (EMBL)*, 2012(10): f1000research.
- [33] Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, *et al.* KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010(38): D355-D360.
- [34] Ma W, Zhang D, Li G, *et al.* Antibacterial mechanism of daptomycin antibiotic against *Staphylococcus aureus* based on a quantitative bacterial proteome analysis [J]. *Journal of Proteomics*, 2017(150): 242-251.
- [35] Choo S, Chin V K, Wong E H, *et al.* Antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications [J]. *Folia Microbiologica*, 2020(65): 451-465.
- [36] Huang H, Pan L, Pan S, *et al.* Effects of dietary herbal formulae combined by *Astragalus polysaccharides*, chlorogenic acid and allicin in different combinations and proportions on growth performance, non-specific immunity, antioxidant status, vibriosis resistance and damage indexes of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Research*, 2018, **49**(2): 701-716.
- [37] Wei Y Q, Xie T, Liu H, *et al.* Inhibition effects of spices on biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, **38**(4): 101-105. [魏宇清, 谢婷, 刘欢, 等. 香辛料提取物对副溶血弧菌生物膜的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2017, **38**(4): 101-105.]
- [38] Li A, Shi C, Qian S, *et al.* Evaluation of antibiotic combination of *Litsea cubeba* essential oil on *Vibrio parahaemolyticus* inhibition mechanism and anti-biofilm ability [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022(168): 105574.
- [39] Miao R Z, Wang S Y, Gao S, *et al.* Study on the in vitro synergistic antibacterial effects of chito-oligosaccharides with five antibiotics on common pathogenic bacteria [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023(24): 101-105. [苗润泽, 王松禹, 高上, 等. 壳寡糖与五种抗生素对常见致病菌的体外协同抑菌效果研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(24): 101-105.]
- [40] Gan Y Y, Yuan Z W, Zhang T Y, *et al.* Antibacterial mechanism of carvacrol against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2019, **37**(2): 276-282. [甘盈盈, 袁中伟, 张天翼, 等. 香芹酚对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(USA300)抑菌机制的研究 [J]. 四川农业大学学报, 2019, **37**(2): 276-282.]
- [41] Dai B R. Antibacterial and antibiofilm of garlic ethanol extract against *Bacillus* spp. responsible for spoilage [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022: 39-40. [代博仁. 大蒜乙醇提取物对腐败芽孢杆菌及其生物膜的抑制作用 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2020: 39-40.]
- [42] Wang S B, Xiong L W, Ji Z N. Antibacterial effect and mechanism of Emodin on *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, **59**(3): 140-146. [王帅兵, 熊良伟, 季振南. 大黄素对嗜水气单胞菌的抑菌作用及其机制 [J]. 中国兽医杂志, 2023, **59**(3): 140-146.]
- [43] Sun Y, Wang X D, Zhu J L, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of lemon grass essential oil (LG-EO) on *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, **23**(3): 157-167. [孙杨, 王晓迪, 朱军莉, 等. 柠檬草精油对副溶血性弧菌的抑菌活性及机制 [J]. 中国食品学报, 2023, **23**(3): 157-167.]
- [44] Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, **76**(1): 88-92.
- [45] Xiao M. The antibacterial mechanism of thymol against *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Yangling: Shanxi University of Science and Technology, 2022: 36-38. [肖苗. 麝香草酚对副溶血弧菌的抑菌机制研究 [D]. 杨凌: 陕西科技大学, 2022: 36-38.]
- [46] Lu P, Liu H, Xiao M, *et al.* Antibacterial and virulence-attenuating effects of protocatechuic acid against *Vibrio*

- parahaemolyticus* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, **38**(5): 278-285. [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.]
- [47] Meng H C, He C H, Cai P Y, *et al.* Inhibitory effect of Sertraline on *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of South China University of Technology* (Natural Science Edition), 2023, **51**(12): 131-139. [孟赫诚, 何长衡, 蔡萍瑶, 等. 舍曲林对副溶血弧菌的抑制作用 [J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2023, **51**(12): 131-139.]
- [48] Feng S, Eucker T P, Holly M K, *et al.* Investigating the responses of *Cronobacter sakazakii* to garlic-driven organosulfur compounds: a systematic study of pathogenic-bacterium injury by use of high-throughput whole-transcriptome sequencing and confocal micro-Raman spectroscopy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80**(3): 959-971.
- [49] Chen R Y, Huang Y, Xu W J, *et al.* Mechanism of moxa smoke extract on attenuating blue light induced ARPE-19 cell injury based on MAPK signaling pathway [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, **53**(11): 3376-3384. [陈如一, 黄妍, 徐文静, 等. 基于MAPK信号通路研究艾柱燃烧产物减轻蓝光诱导ARPE-19细胞损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2022, **53**(11): 3376-3384.]
- [50] Li J K, Nan M H, Wu X L, *et al.* The functions of bacterial flagella in physiological activity [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, **30**(6): 673-679. [李交昆, 南美花, 吴学玲, 等. 细菌鞭毛在生理活动中的作用 [J]. *生命科学*, 2018, **30**(6): 673-679.]
- [51] Tu C T, Wang Y, Yi L, *et al.* Roles of signaling molecules in biofilm formation [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, **35**(4): 558-566. [涂春田, 汪洋, 易力, 等. 信号分子调控细菌生物被膜形成的分子机制 [J]. *生物工程学报*, 2019, **35**(4): 558-566.]

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ALLICIN E AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

CAI Xue^{1,2}, HUANG Lei², ZHENG A-Qin², CHU Kuan², LIN Hua-Li³, YANG Yan-Jie^{1,2},
YUAN Ju-Lin², SONG Da-Wei¹ and YAO Jia-Yun²

(1. Life Science College, Huzhou University, Huzhou 31300, China; 2. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Key Laboratory of Fishery Environment and Aquatic Product Quality and Safety of Huzhou City, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. Shanghai Landcent Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201600, China)

Abstract: To investigate the antibacterial activity of Allicin E (ALE) against *Vibrio parahaemolyticus*, the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and growth curve were determined. The antibacterial mechanisms were investigated by exploring the influence of ALE on the extracellular β -D-galactosidase activity, protein content, bacterial morphological structure, biofilm formation ability, and transcriptome of *V. parahaemolyticus*. The results showed that the MIC and MBC of ALE against *V. parahaemolyticus* were 7.8 and 31.2 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Treatment with ALE resulted in damage to the cell wall and membrane structure of *V. parahaemolyticus*, leading to the leakage of intracellular substances. Compared with the control group, extracellular β -D-galactosidase activity and protein content in the ALE-treated group were significantly increased ($P < 0.05$), while the amount of bacterial biofilm formation was significantly decreased ($P < 0.05$). The transcriptome analysis results showed that 145 genes were significantly downregulated in the ALE group, mainly enriched in pathways such as MAPK signal transduction, flagella assembly, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Conversely, 133 genes were significantly upregulated, mainly related to amino acid metabolism and degradation pathways. The RNA-seq results were consistent with the RT-qPCR validation tests. Our results demonstrated that ALE showed a strong antimicrobial effect against *V. parahaemolyticus* by disrupting bacterial structure, inhibiting biofilm formation, and regulating the expression of genes such as flagella and biofilms. This study laid an important foundation for exploring the role and mechanism of ALE against *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio*; Allicin; Antibacterial drugs; Antibacterial mechanism; Transcriptome