

doi: 10.12131/20180194

麻醉剂丁香酚对鳃弧菌抑菌效果初步研究

李朝^{1,2}, 柯常亮², 古小莉², 李惠青², 黎智广², 黄珂², 李刘冬², 李来好²

(1. 浙江海洋大学, 浙江舟山 316021; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 农业农村部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心(广州), 广东广州 510300)

摘要: 水产麻醉剂丁香酚具有良好的抑菌和杀菌作用, 不仅对食源性致病菌具有良好的抑制作用, 也对水产致病细菌具有潜在的抑菌效力。为探讨丁香酚对水产养殖业主要致病菌的抑菌作用, 文章初步开展了丁香酚对鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的抑菌效果研究。丁香酚质量浓度为 $6\ 400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 鳃弧菌培养平板中抑菌圈直径为 $(21.13\pm 0.74)\ \text{mm}$, 表明鳃弧菌对此浓度的丁香酚表现为极敏。吸光度测定结果显示微孔中丁香酚质量浓度 $\geq 400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时弧菌没有生长, 表明丁香酚对鳃弧菌的最低抑菌浓度 (MIC) 为 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1\ 600\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 微孔中溶液涂抹于培养平板继续培养 24 h, 质量浓度 $\geq 800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时鳃弧菌没有生长, 表明最小杀菌浓度 (MBC) 为 $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。研究结果表明丁香酚对鳃弧菌具有良好的抑菌作用。

关键词: 丁香酚; 鳃弧菌; 抑菌圈; 最低抑菌浓度; 最小杀菌浓度; 渔用麻醉剂

中图分类号: S 942.2

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2019)02-0058-06

Preliminary study of antibacterial effects of fish anesthetic eugenol on *Vibrio anguillarum*

LI Chao^{1,2}, KE Changliang², GU Xiaoli², LI Huiqing², LI Zhiguang², HUANG Ke², LI Liudong², LI Laihao²

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Fishery Environment and Aquatic Products Quality Supervision and Testing Center (Guangzhou), Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Fish anesthetic eugenol, which has good antibacterial and bactericidal effects, has presented great efficacy on the food borne pathogens as well as the pathogenic bacteria in aquaculture. In order to investigate the antibacterial effect of eugenol on the typical pathogenic bacteria in aquaculture, we studied the antibacterial effect of eugenol on *Vibrio anguillarum*. After 24-hour incubation, the diameter of the inhibition zone was $(21.13\pm 0.74)\ \text{mm}$ at $6\ 400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of eugenol, indicating that *V. anguillarum* was extremely sensitive to eugenol. It is shown that *V. anguillarum* did not grow while the eugenol concentration was over $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Hence, the minimum inhibitory concentration (MIC) was $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of eugenol against the bacteria. The solution in the cells of $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $1\ 600\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were continually incubated for 24 h after being scribbled on the plate surface. When the concentration of eugenol were over $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, no *V. anguillarum* grew in the plates. It is indicated that the minimum bactericidal concentration (MBC) of eugenol against *V. anguillarum* was $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and eugenol has excellent antibacterial effects on *V. anguillarum*.

收稿日期: 2018-09-04; 修回日期: 2018-11-06

资助项目: 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2017YB14, 2017YB05, 2016TS15); 国家农产品质量安全风险评估重大专项 (GJFP201600902)

作者简介: 李朝 (1993—), 男, 硕士研究生, 从事食品加工与贮藏研究。E-mail: 1780733895@qq.com

通信作者: 李来好 (1963—), 男, 博士, 研究员, 从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: laihao@163.com

Key words: eugenol; *Vibrio anguillarum*; inhibition zone; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; fish anesthetic

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是水产养殖中最常见的致病菌之一^[1]。当养殖环境恶化或机体受创时, 养殖水产品极易感染鳃弧菌, 进而导致体表“出血”, 甚至全身性组织病变, 最终死亡^[2]。近年来, 随着养殖技术不断提高, 水产养殖向高密度、集约化发展的同时, 养殖水产品弧菌病的爆发也日趋严重, 给水产养殖业带来巨大损失^[3]。由于鳃弧菌可对水产养殖造成严重危害, 大量抗生素被用于防治该致病菌^[4-5], 这不仅导致细菌耐药性的产生, 还给水产品质量安全带来巨大风险和隐患^[6]。

丁香酚是一种天然产物, 广泛存在于丁香、月桂和罗勒等植物的茎、叶和花蕾中^[7]。研究表明丁香酚具有良好的杀菌、抑菌效果^[8-12], 其不仅是一种传统口腔治疗剂, 还被用于水产食品防腐以延长货架期^[13-14]。同时, 丁香酚还是一种良好的渔用麻醉剂, 可以缓解转运过程的应激反应, 大幅提高养殖生产和流通环节鲜活水产品的成活率^[15-16]。近年来, 有研究发现丁香酚对水产致病菌有一定的抑菌作用^[17-18]。由于毒性低、消除快, 有学者认为丁香酚有望替代抗生素成为一种安全、绿色的新型抗菌剂, 用于防治水产养殖中的细菌性疾病^[19]。

随着人民生活水平的不断提高, 水产品质量安全日益受到重视。近年来水产品中的违禁药物添加屡禁不止, 给水产业造成巨大冲击。因此, 亟需一种安全、有效的渔用药物为水产养殖业的健康发展保驾护航。本文以鳃弧菌为研究对象, 探索丁香酚对水产养殖业典型致病菌的抑菌效果, 为水产养殖业中鱼类细菌性疾病的防控提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

生化培养箱 (IC612C, 日本 Yamato); 酶标仪 (VERSMAX, 美国 MD); 可见分光光度计 (L2, 上海仪电分析仪器有限公司); 生物安全柜 (MSC1.8, 美国 Thermo); 多轨道恒温培养振荡器 (ZHWHY-200D, 上海智诚分析仪器制造有限公司); 比浊仪 (WGZ-2XJ, 上海昕瑞仪器仪表有限公司); 天平 (XS603S, 瑞士梅特勒); 移液枪 (10~100 μL , 100~1 000 μL , 1~10 mL); 中央纯水系统 (Centra R-200/purilab classia, ELGA)。

1.2 实验材料

鳃弧菌 ATCC43308 (广东环凯微生物科技有限公司); 丁香酚 (纯度 $\geq 99\%$, 上海医疗器械有限公司); 无水乙醇 (广州化学试剂厂, 99%); 2216E 琼脂 (美国 BD 公司); 2216 液体培养基 (美国 BD 公司); MH 肉汤 (青岛高科技园海博生物技术有限公司); 游标卡尺 (广陆数字测控股份有限公司); 牛津杯 ($\Phi 6 \text{ mm} \times 8 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$, 上海精密仪器仪表有限公司); 细菌培养板 (96 孔, 海门市海克拉斯实验器材有限公司); 生理盐水 (广东环凯微生物科技有限公司)。实验所用试剂与耗材均作灭菌处理。

1.3 实验方法

1.3.1 丁香酚储备溶液配制 称取 0.64 mg 丁香酚于烧杯中, 以 5 mL 无水乙醇助溶后, 转移至容量瓶中, 超纯水稀释定容至 100 mL, 储备液质量浓度为 6 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验所需系列浓度均用此储备液稀释配制。

1.3.2 鳃弧菌菌液配制 挑取一环鳃弧菌接种至 2216 液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24 h 增菌。测定增菌液麦氏浊度值 (McFarland, MCF), 用生理盐水稀释至 MCF 值约为 0.5 (0.5 MCF 的菌液浓度相当于 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续稀释至菌液浓度为 $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。

1.3.3 抑菌活性的测定 将牛津杯置于培养皿中央, 吸取 3 mL 浓度为 $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液于 90 mL 的 2216E 培养基中混合均匀, 倾注平板 (约 20 mL·平板⁻¹), 静置待平板凝固。凝固后用镊子将牛津杯轻轻拔出, 吸取质量浓度为 6 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丁香酚 150 μL 注入孔中。丁香酚抑菌平板实验设置 9 个平行。由于丁香酚溶液配制过程中用到乙醇, 故于平板孔中注入 150 μL 体积分数为 5% 的乙醇为背景比较。为比较分析丁香酚与抗生素的抑菌差异性, 于平板孔中注入 150 μL 质量浓度为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯霉素溶液进行对比实验。平板孔中药物注入完成后, 将平板置于培养箱中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。培养完毕, 以游标卡尺用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.3.4 最低抑菌浓度 (minimum inhibit concentration, MIC) 测定 根据微量二倍稀释法, 采用 96 孔微孔板 (8 行 \times 12 列) 进行抑菌实验^[17]。抑菌实验设实

验组4平行(A、B、C、D行)、空白对照(E行)、阳性对照(F行)和阴性对照(G行)。预先于所有微孔中加入100 μL 的MH肉汤, 各组操作如下。

实验组: 于第1列微孔中加入100 μL 质量浓度为6 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丁香酚溶液, 与预先添加的MH肉汤充分混合后, 吸取100 μL 混合液注入第2列, 充分混合后再次吸取100 μL 混合液注入第3列, 逐级稀释至最后1列, 吸取100 μL 混合液弃去, 最后于各微孔中添加100 μL 菌液。

空白对照: 第1列加入100 μL 体积分数为5%的乙醇溶液, 与预先添加的MH肉汤充分混合后, 与实验组操作类似, 逐级稀释, 最后于各微孔中添加100 μL 菌液。

阴性对照: 第1列加入6 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丁香酚溶液, 逐级稀释后, 于各微孔中添加100 μL 生理盐水。

阳性对照: 各微孔中添加100 μL 菌液, 与预先添加的MH肉汤充分混合。

最后将微孔板置于培养箱中30 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。培养结束后, 将微孔板置于酶标仪中于560 nm波长下读取吸光值, 并根据吸光值确定丁香酚对鳗弧菌的MIC值。

1.3.5 最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 测定 吸取MIC所在列及其之前两列微孔中的培养液100 μL 于预先添加2216E培养基的平板上均匀涂布, 随后置于培养箱中30 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。培养结束后根据细菌生长情况判定MBC值。

1.3.6 丁香酚对鳗弧菌的抑菌时效 取1 mL 鳗弧菌菌液分别接种到丁香酚质量浓度为0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (空白对照组)、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MIC组) 和800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MBC组) 的2216培养液中, 每组双平行。30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养36 h。在培养过程中, 每隔2 h于波长为560 nm处测定培养液的吸光值。

2 结果

2.1 丁香酚对鳗弧菌的抑菌活性

抑菌圈直径 ≥ 20 mm为极敏, 15~20 mm为高敏; 10~15 mm为中敏; 小于10 mm为低敏^[20]。结果显示, 丁香酚质量浓度为6 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径为(21.13 \pm 0.74) mm, 相对标准偏差为3.50% (表1)。表明鳗弧菌对丁香酚极敏, 此浓度丁香酚具有良好的抑菌活性。5%的乙醇溶液抑菌圈直径为8 mm, 即鳗弧菌对其不敏感, 证明丁香酚溶液助溶剂背景对其抑菌敏感性几乎没有影响。从氯霉素的抑菌圈直径[(44.38 \pm 0.75) mm]看, 鳗弧菌对其极敏, 相对标准偏差为1.69%, 抑菌效果明显强于丁香酚, 这也可能是氯霉素禁而不绝的原因之一。

2.2 丁香酚对鳗弧菌的MIC

丁香酚对鳗弧菌的MIC实验结果显示(图1), 当丁香酚质量浓度 ≥ 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养24 h实验组吸光值与阴性对照基本一致, 表明鳗弧菌没有生长; 当丁香酚质量浓度 < 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 实验组吸光值与阳性对照基本一致, 表明鳗弧菌的生长没有受到抑制。因此, 丁香酚对鳗弧菌的MIC值为400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。从空白对照组结果来看, 丁香酚溶液助溶剂背景对鳗弧菌生长基本没有影响。

2.3 丁香酚对鳗弧菌的MBC

丁香酚对鳗弧菌的MBC实验结果显示(图2), 涂抹丁香酚质量浓度为400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液的平板上, 鳗弧菌生长良好, 而涂抹丁香酚质量浓度为800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和1 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液的平板上, 无鳗弧菌生长。根据《食品中抗菌药物残留的化学分析》^[21], 以无菌生长的最低浓度为丁香酚对鳗弧菌的MBC值。即该实验条件下丁香酚对鳗弧菌的MBC为800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表1 丁香酚对鳗弧菌的抑菌圈直径

Tab.1 Inhibition zone diameter of eugenol on *V. anguillarum*

mm

	直径 diameter	平均 mean	标准差 standard deviation	相对标准偏差/% relative standard deviation
丁香酚 eugenol	21.06 22.24 20.86 20.64 20.56 21.63 20.05 20.94 22.16	21.13	0.74	3.50
氯霉素 (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) chloramphenicol	44.32 45.23 43.26 43.34 44.64 45.28 43.86 44.88 44.62	44.38	0.75	1.69
5%乙醇 ethanol	8.00 8.00 8.00 8.00 8.00 8.00 8.00 8.00 8.00	8.00	0.00	0.00

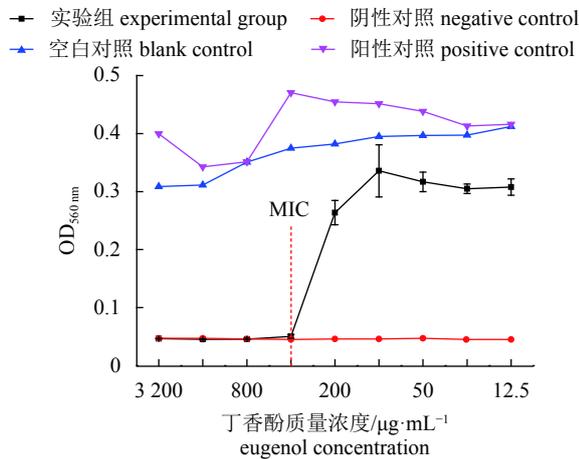


图1 丁香酚对鳃弧菌的MIC

Fig.1 Minimum inhibitory concentration of eugenol against *V. anguillarum*



图2 30 °C培养24 h平板上鳃弧菌的生长状况

Fig.2 Growth of *V. anguillarum* on plate incubated at 30 °C for 24 h

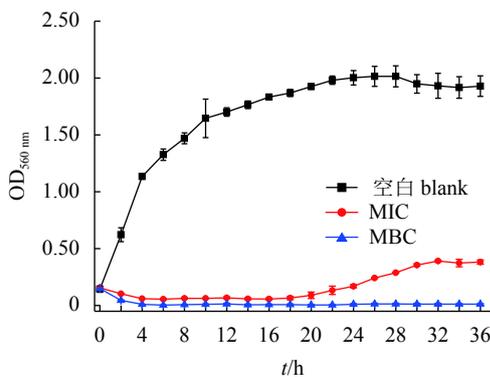


图3 丁香酚对鳃弧菌的抑菌时效

Fig.3 Antibacterial aging effect of eugenol on *V. anguillarum*

3 讨论

随着养殖池塘的老化以及种质资源的退化,水产养殖病害日趋严重^[22-23]。因此,大量抗生素类药物被用于鱼病防治^[24]。然而,随着研究的不断深入,抗生素的危害也逐渐被人们认识。研究表明,一些抗生素如氯霉素、呋喃西林等对人体产生“三

2.4 丁香酚对鳃弧菌的抑菌时效

丁香酚对鳃弧菌的抑菌时效实验结果显示(图3),与空白对照相比,MIC组中鳃弧菌的生长状况存在较大差异。4~18 h 鳃弧菌基本没有生长(OD_{560 nm}为0.05~0.06),18~32 h 鳃弧菌开始缓慢生长(OD_{560 nm}为0.06~0.39),32 h后处于稳定生长(OD_{560 nm}为0.37~0.39)。各阶段相应时间MIC组中培养液的吸光值远小于空白对照组。MIC组中鳃弧菌在18 h后开始生长,但是与空白对照相比十分缓慢,32~36 h的吸光值仅为空白对照组的1/5。即使鳃弧菌开始生长,但是丁香酚对其生长依然存在较大的抑制作用。相对于空白对照组和MIC组,MBC组培养液所测吸光值极小(0.003~0.01),表明鳃弧菌基本没有生长。

致”作用,严重危害人体健康^[25]。抗生素能持久存在于养殖环境中,使得细菌产生耐药性,不仅使得药物对鱼病的治疗效力降低,也使得人体的抗病能力下降^[19,26]。为确保水产品质量安全,保护人体健康,近年来多种抗生素药物已被禁止用于水产养殖业。研究发现多种中草药具有抑菌作用^[27-28],但从中草药抑菌效果来看,难以在水产养殖业中广泛应用^[29]。丁香酚作为一种天然的植物提取物,因其具有良好的抑菌效果,且毒副作用小、不易产生耐药性且价格低廉受到研究者的广泛关注。

目前,在食品领域丁香酚已被广泛用于食品贮藏保鲜,以延长货架期^[13]。并且在水产领域十分重视丁香酚对鲜活水产品的麻醉效果,但是关于丁香酚对养殖和流通环节鲜活水产品致病菌的抑菌作用的研究甚少^[15-16]。本研究显示丁香酚对鳃弧菌的MIC和MBC分别为400 μg·mL⁻¹和800 μg·mL⁻¹,表明其对水产养殖环境中广泛存在的主要致病菌鳃弧菌具有良好的抑菌效果。且抑菌时效实验表

明(图3), 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丁香酚在 18 h 内基本抑制了鳃弧菌的生长。即使在 18 h 后鳃弧菌开始缓慢生长, 但是与空白对照组相比, 对应时间(32~36 h)的吸光值仅为空白对照组的 1/5, 表明丁香酚依然对鳃弧菌的生长存在较大的抑制作用。

与食源性致病菌研究结果相比(表2), 鳃弧菌对丁香酚的敏感性与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella anatum*)、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)相似, 表明丁香酚不仅可以应用于食品领域贮藏保鲜, 也可应用于水产行业细菌性疾病防控。与水产致病菌研究结果相比(表2), 鳃弧菌对丁香酚的敏感性高于嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*), 低于格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*), 由此可见鳃弧菌对丁香酚的敏感性相对较高, 具有较高的研究价值。

从本研究结果与相关研究结果的差异性来看(表2), 不同水产致病菌对丁香酚的敏感性差异明显, 这可能与丁香酚的抑菌机理有关。目前关于丁香酚抑菌机制的说法尚不统一。有研究认为丁香酚通过作用于细菌细胞内酶系统或功能蛋白, 进而抑制细胞新陈代谢, 从而起到抑菌作用^[30]; 还有研究认为丁香酚通过改变细菌毒力达到抑菌效果^[31]; 然

而普遍接受的理论是丁香酚通过破坏细菌细胞膜产生抑菌作用^[10-11,36]。因此, 深入了解丁香酚对鳃弧菌的抑菌机理, 对其未来应用于水产养殖业细菌性疾病防控和在鲜活水产品流通环节中如何起到麻醉和抑菌双重作用至关重要。

由于丁香酚具有广泛的药理和生物学特性^[37], 用丁香酚防控水产养殖细菌性疾病已成为新兴的研究热点。但在实验室得出的体外抑菌实验结果应用于实际生产时, 要考虑到水产动物对该药的承受能力, 正确的用药范围应是既能防控细菌性疾病又不超过水产动物对该药的耐受力。本研究进行了丁香酚对鳃弧菌的体外抑菌实验, 其结果可作为防控水产养殖和鲜活水产品流通过程中鳃弧菌感染的依据, 但在实际生产中的应用效果有待进一步验证。

4 结论

作为一种高效、安全的渔用麻醉剂, 丁香酚已在许多国家和地区广泛应用, 在中国也已用于鲜活水产品的转移和运输环节^[38-39]。本研究表明丁香酚对水产养殖业典型致病菌鳃弧菌具有抑菌和杀菌效果, 存在防止活体感染和降低违禁药物使用的潜力。但如何充分发挥丁香酚的麻醉效果, 深入发掘丁香酚对水产致病菌的抑菌潜力, 还有待进一步的研究。

表2 丁香酚对不同细菌MIC和MBC

Tab.2 Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of eugenol against different bacteria

细菌种类 bacterial species	最低抑菌浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MIC	最小杀菌浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MBC	文献 Reference
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	600	700	[30]
	128~512	-	[31]
	400	600	[32]
李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	500	800	[33]
弯曲空肠杆菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	1.25	-	[34]
沙门氏菌 <i>Salmonella anatum</i>	400	600	[32]
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	400	600	[32]
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	800	1 600	[18]
	800~3 200	1 600~3 200	[17]
维氏气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	800	1 600	[18]
格氏乳球菌 <i>Lactococcus garvieae</i>	30	-	[35]
弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	1 600	1 600	[18]
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	400	800	本研究

参考文献:

- [1] 王凤青, 孙玉增, 任利华, 等. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展 [J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(2): 49-56.
- [2] 尹清干. 鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 生物膜的形成及三种中草药对其干预的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 2-5.
- [3] 靖凯霖, 徐永平, 李媛, 等. 卵黄抗体在水产养殖病害防治及水产品保鲜中的应用研究进展 [J]. 水产科学, 2016, 35(2): 185-190.
- [4] XU Z N, WANG Y, HAN Y, et al. Mutation of a novel virulence-related gene *mltD* in *Vibrio anguillarum*, enhances lethality in zebra fish[J]. Res Microbiol, 2011, 162(2): 144-150.
- [5] TORANZO A E, BARJA J L. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain[J]. Dis Aquat Organ, 1990, 9(1): 73-82.
- [6] PLAZA N, CASTILLO D, PÉREZ-REYTOR D A, et al. Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios[J]. Electron J Biotechnol, 2018, 31: 24-33.
- [7] 陆志科, 谢碧霞. 植物源天然食品防腐剂的的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2003(1): 94-96, 93.
- [8] 曾荣, 陈金印, 林丽超. 丁香精油及丁香酚对食品腐败菌的抑菌活性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2013(4): 852-857.
- [9] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review[J]. Int J Food Microbiol, 2004, 94(3): 223-253.
- [10] JALALI N, ARIAI P, FATTAHI E. Effect of alginate/carboxyl methyl cellulose composite coating incorporated with clove essential oil on the quality of silver carp fillet and *Escherichia coli* O157: H7 inhibition during refrigerated storage[J]. J Food Sci Tech, 2016, 53(1): 757-765.
- [11] 刁文睿. 公丁香油脂的体外抗氧化、抑菌活性及抑菌机理研究 [D]. 临汾: 山西师范大学, 2015: 25-26.
- [12] GUTIERREZ J, RODRIGUEZ G, BARRY-RYAN C A. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening[J]. J Food Prot, 2008, 71(9): 1846-1854.
- [13] ALBERTOS I, RICO D, MARÍA DIEZ A, et al. Effect of edible chitosan/clove oil films and high-pressure processing on the microbiological shelf life of trout fillets[J]. J Sci Food Agric, 2015, 95(14): 2858-2865.
- [14] VRINDA MENON K, GARG S R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese[J]. Food Microbiol, 2001, 18(6): 647-650.
- [15] BOIJINK C D, QUEIROZ C A, CHAGAS E C, et al. Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*) [J]. Aquaculture, 2016, 457: 24-28.
- [16] 方晓磊, 柯常亮, 李刘冬, 等. 丁香酚辅助鲜活草鱼处理和运输的剂量研究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 275-278.
- [17] SUTILI F J, KREUTZ L C, NORO M A, et al. The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2014, 157(3/4): 142-148.
- [18] BANDEIRA J, PÊS T S, SACCOL E M, et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture[J]. Ind Crops Prod, 2017, 97: 484-491.
- [19] ROMERO J, FEIJOÓ C G, NAVARRETE P. Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives[M]//Health and environment in aquaculture. Slavka Krautzeka: Publisher InTech, 2012: 165-168.
- [20] 张永刚, 栾林林, 任海, 等. 中草药对大菱鲆源哈维氏弧菌的体外抑菌效果 [J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 78-82.
- [21] 沈建忠, 于康震. 食品中抗菌药物残留的化学分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 5-6.
- [22] 陈丽婷, 邹志利, 王晓清, 等. 中草药添加剂在水产养殖中的应用研究进展 [J]. 水产科学, 2014, 33(3): 190-194.
- [23] 崔惠敬, 孟玉霞, 赵前程, 等. 植物精油在鱼类养殖中的研究与应用 [J]. 水产科学, 2018, 37(4): 564-570.
- [24] SANTOS L, RAMOS F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem[J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52(2): 135-143.
- [25] 王玉堂. 禁用渔药化合物及其危害 [J]. 中国水产, 2017(1): 76-80.
- [26] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review[J]. Food Microbiol, 2016, 57: 128-134.
- [27] 童国忠, 石亚素, 马剑茵, 等. 中草药对海水养殖黄鱼病原弧菌抑菌效果研究 [J]. 水产科学, 2007, 26(8): 436-439.
- [28] 刘克奉, 刘克明, 刘鑫. 不同中草药对两株致病菌的抑菌作用研究 [C]//2012 全国海水养殖学术研讨会论文集. 北京: 海洋出版社, 2012: 302-316.
- [29] DIREKBUSARAKOM S. Application of medicinal herbs to aquaculture in Asia[J]. Walailak J Sci Tech, 2004, 1(1): 7-13.
- [30] 马艳玲, 李海贤, 曾荣. 丁香酚对金黄色葡萄球菌抗菌作用的探究 [J]. 中国酿造, 2017(8): 130-133.
- [31] QIU J Z, FENG H H, LU J, et al. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(17): 5846-5851.
- [32] 唐小辉. 肉桂醛、丁香酚及其结构类似物的抑菌活性与化学结构的关系 [D]. 湘潭: 湘潭大学, 2013: 38-50.
- [33] FILGUEIRAS C T, VANETTI M D. Effect of eugenol on growth and listeriolysin o production by *Listeria monocytogenes* [J]. Braz Arch Biol Technol, 2006, 49(3): 405-409.
- [34] 田琦. 丁香酚和茶多酚对空肠弯曲菌抑菌机理研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2014: 39.
- [35] RATTANACHAIKUNSOPON P, PHUMKHACHORN P. Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in tilapia[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(9): 2085-2089.
- [36] ZHANG Y, WANG Y, ZHU X J, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivitis* [J]. Microb Pathogenesis, 2017, 113: 396-402.
- [37] PRAMOD K, ANSARI S H, ALI J. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions[J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(12): 1999-2006.
- [38] 苏明明, 孙兴权, 杨春光, 等. 渔用麻醉剂 MS-222、丁香酚在鲜活水产品运输中的应用及检测方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015(1): 25-29.
- [39] 方晓磊, 柯常亮, 刘奇, 等. 水产品中丁香酚残留的人体健康风险分析 [J]. 水产科学, 2018, 37(1): 140-144.