

两种海藻提取物抗水产动物病原菌活性的初步研究

路 远¹, 闫茂仓², 徐宏翔¹, 南春容¹

(1. 温州医学院 生命科学学院, 浙江 温州 325035; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

摘要: 研究了两种大型海藻——羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)、条浒苔(*Enteromorpha clathrata*)提取物对 11 种水产动物病原菌的抑制活性。结果显示: 羊栖菜乙醇粗提取物乙酸乙酯相对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)的抑制作用最明显, 抑菌圈可达 21.6 mm; 薄层层析表明羊栖菜乙醇粗提取物乙酸乙酯相有 6 条层析带, 其中 $R_f=0.54$ 带对哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的抑制作用最强, 抑菌圈可达 13.6 mm; 条浒苔乙醚粗脂对 11 种水产动物病原菌均表现出了较强的抑制作用, 其中对灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)的抑制作用最强, 抑菌圈可达 24.7 mm; 进一步的实验显示, 条浒苔乙醚粗脂 3 种洗脱组分抗菌性均比粗脂减弱了, 而其 95%乙醇洗脱组分对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的抑菌圈仍可达 13.8 mm。说明利用羊栖菜、条浒苔为开发海洋药物资源提供了可能。

关键词: 羊栖菜(*Sargassum fusiforme*); 条浒苔(*Enteromorpha clathrata*); 提取物; 水产动物病原菌; 抗菌活性

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)10-0028-05

近 20 年来, 我国的水产养殖业得到了飞速发展, 但随着集约化养殖程度的不断提高, 养殖水域的污染逐渐加重, 水产病害日益严重, 用药量也越来越大^[1]。细菌性疾病是水产养殖鱼类最主要的病害之一^[2], 其中弧菌病尤为严重, 给我国的水产养殖业造成了巨大的危害。长期以来我国主要依靠各种农药、抗生素、喹诺酮类等化学药物及各种消毒剂对水产动物病害进行控制和防治。抗菌药物的大量使用不仅使药物的作用效果受到制约, 使致病菌产生耐药性, 而且一些药物残留于水产动物的体内及养殖水域, 给养殖环境造成了严重的污染, 同时也会引发一系列的水产品质量安全问题^[3]。

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)和条浒苔(*Enteromorpha clathrata*)是浙江沿海常见的大型藻类。羊栖菜隶属于褐藻门(Phaeophyta)、马尾藻科(Sargassaceae)、马尾藻属(*Sargassum*), 在我国温州洞头地区大量栽培。已有的研究发现, 海藻中不仅存在许多抑制细胞毒活性、抗炎等作用的物质^[4,5], 而且具有较好的抗细菌、抗病毒的作用^[6], 如从羊栖菜中分离出来的 SP4-2 组分对 HIV-1 感染有较好的抑制作用^[7]。条浒苔隶属绿藻门(Chlorophyta)、石莼科(Ulvaceae)、浒苔属(*Enteromorpha*), 不仅是沿海人民采集食用或用作饲料的藻类, 可以鲜食, 而且其乙醇提取物乙酸乙酯相对金黄色葡萄球菌具有抑制作用^[8]。但近年来随着海洋生态环境污染及水体富营养

化程度的加重, 浒苔大量繁殖, 造成了严重的“绿潮”灾害, 对海洋生态环境构成了巨大的威胁^[9]。因此如何加大对该藻类的开发和利用成为目前亟待解决的问题。本实验以羊栖菜和条浒苔为材料, 用不同有机溶剂提取其活性物质, 并验证各种提取物对 11 种水产动物病原菌的抑制效果, 为更好地开发利用羊栖菜和条浒苔资源开辟新的途径, 同时为将其开发为海洋天然药物奠定基础。

1 材料

1.1 供试海藻

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*), 购自浙江省温州市洞头县羊栖菜养殖户。

条浒苔(*Enteromorpha clathrata*), 采自浙江省宁波市北仑港, 野生。

1.2 指示菌

实验所用指示菌由浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发和保护重点实验室提供。具体如下:

收稿日期: 2009-09-30; 修回日期: 2009-12-11

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y506224); 温州市科技计划项目(S20100020)

作者简介: 路远(1984-), 男, 山东淄博人, 硕士, 主要从事海藻提取物活性的研究, 电话: 15858832152, E-mail: luyuan11@126.com; 南春容, 通信作者, 电话: 0577-86699360, E-mail: nanchunrong@163.com

- (1) 需钠弧菌^[10](*Vibrio natriegens*), 源于文蛤(*Meretrix meretrix*);
- (2) 副溶血弧菌^[11](*Vibrio parahaemolyticus*), 源于文蛤(*Meretrix meretrix*);
- (3) 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 源于青蛤(*Cyclina sinensis*);
- (4) 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 源于黄姑鱼(*Nibea albiflora*);
- (5) 哈氏弧菌^[10](*Vibrio harveyi*), 源于文蛤(*Meretrix meretrix*);
- (6) 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 源于美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*);
- (7) 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 源于凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*);
- (8) 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*), 源于管角螺(*Hemifusus tuba*);
- (9) 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 源于条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*);
- (10) 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 源于锯缘青蟹(*Scylla serrata*);
- (11) 灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*), 源于美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*);

2 方法

2.1 海藻提取物的制备

将新鲜健康羊栖菜、条浒苔去除表面杂藻、泥沙及附着物, 用蒸馏水清洗去除表面盐分, 50℃下烘干, 粉碎至 40 目。取两种海藻粉末各 30 g 分别置于 150 mL 的无水乙醇中, 50℃温浴浸提 6 d, 分两次浸提合并提取液, 过滤, 得两种海藻乙醇浸提液, 真空旋转蒸干, 得到黑褐色的固体浸膏, 质量分别为 1.18、3.00 g; 两种海藻石油醚提取物操作同上, 质量分别为 0.60、0.24 g。将得到的两种海藻乙醇粗提物分别混悬于 10 倍的蒸馏水中, 充分混悬后用乙酸乙酯进行萃取, 得到乙酸乙酯相和水相, 分别蒸干, 乙酸乙酯相质量分别为 0.06、0.13 g; 水相质量分别为 0.41、0.87 g。

2.2 活性组分的 TLC 制备层析

本实验对羊栖菜乙酸乙酯相, 用薄层层析法(TLC)分离, 薄层层析板采用硅胶 G 型。对于羊栖菜的乙酸乙酯相选用的是石油醚: 丙酮(3:1)作为层析液进行层析分离。用碘缸和石英紫外检测仪检测出特征带, 刮取特征带(特征带用层析后化合物移动的

距离与展层剂移动距离的比值用 R_f 表示共得 6 个带) R_f 值分别为 0.00、0.24、0.34、0.40、0.45、0.54, 质量分别为 0.01、0.01、0.02、0.01、0.02、0.03 g。

2.3 索氏抽提粗脂的制备

取两种海藻各 30 g 置于索式抽提器中, 底部容器分别装入 150 mL 的乙醚、氯仿, 分别在 45℃和 72℃的水浴条件下回流抽提 3 天, 真空旋转蒸干, 得到粗脂提取物, 羊栖菜、条浒苔乙醚粗脂质量分别为 0.62、0.25 g; 氯仿粗脂的质量分别为 0.39、0.31 g。

2.4 海藻乙醚粗脂柱层析洗脱制备

羊栖菜、条浒苔乙醚粗脂经硅胶(G60 型)柱层析分离, 先后用苯、乙酸乙酯和 95%的乙醇进行洗脱, 将洗脱下来的洗脱液分别蒸干, 得苯组分质量分别为 0.03、0.10 g; 乙酸乙酯组分质量分别为 0.18、0.05 g; 乙醇组分质量分别为 0.10、0.08 g。

2.5 抗菌实验

采用平板扩散法^[12]。将各种病原菌接种到 2216E 液体培养基中, 培养 18 h 后, 用 0.85% 无菌生理盐水调节菌液浓度为 5.0×10^6 CFU/mL, 分别取 200 μ L 菌液均匀涂布于 2216E 固体培养基平板上。将提取物溶解到相对应的浸提溶剂或洗脱剂配成 0.1 g/mL 浓度的药液, 用移液枪吸取药液 10 μ L 滴于已灭菌的圆形纸片上(6 mm)待完全扩散后, 晾干, 贴于涂布有病原菌的固体培养基平板上, 28℃恒温培养 24 h 后, 观察并测量抑菌圈的大小。

3 结果与分析

3.1 两种海藻不同有机溶剂提取物抗水产动物病原菌活性

表 1 显示, 羊栖菜的较高极性浸提物要比低极性浸提物活性略强。如羊栖菜乙醇粗提物乙酸乙酯相和氯仿抽提物对溶藻弧菌的抑制作用最强, 而石油醚和乙醚提取物对其的抑制作用次之。

表 2 显示, 条浒苔的低极性浸提物要比高极性浸提物的活性要强。如条浒苔石油醚提取物对需钠弧菌和哈氏弧菌(文蛤)的抑制作用最强; 乙醚粗脂对灿烂弧菌的抗性最强; 乙醇提取物乙酸乙酯相和水相对 11 种水产病原菌均没有抗性。

3.2 羊栖菜乙酸乙酯相薄层层析分离组分抗水产动物病原菌活性

表 3 显示, 羊栖菜乙酸乙酯相经薄层层析(TLC)

表 1 羊栖菜提取物抗水产动物病原菌活性结果

Tab. 1 Antimicrobial activities of the extracts from *S. fusiforme* against aquatic animal pathogens

指示菌(来源)	抑菌圈直径(mm)				
	乙酸乙酯相	水相	石油醚	氯仿	乙醚
需钠弧菌(文蛤)	0	0	9.9	8.0	12.6
副溶血弧菌(文蛤)	0	0	9.2	0	12.2
副溶血弧菌(青蛤)	11.9	0	0	12.0	0
副溶血弧菌(黄姑鱼)	0	0	8.4	10.5	11.3
哈氏弧菌(文蛤)	13.4	0	0	9.0	0
哈氏弧菌(美国红鱼)	7.9	0	0	9.1	15.6
哈氏弧菌(凡纳滨对虾)	9.8	0	8.6	9.8	0
哈氏弧菌(管角螺)	15.1	0	9.5	10.5	0
恶臭假单胞菌(条石鲷)	0	0	0	0	0
溶藻弧菌(锯缘青蟹)	21.6	0	17.5	22.5	19.3
灿烂弧菌(美国红鱼)	13.9	0	7.5	0	0

表 2 条浒苔提取物抗水产动物病原菌活性结果

Tab. 2 Antimicrobial activities of the extracts from *E. clathrata* against aquatic animal pathogens

指示菌(来源)	抑菌圈直径(mm)				
	乙酸乙酯相	水相	石油醚	氯仿	乙醚
需钠弧菌(文蛤)	0	0	14.2	12.0	10.9
副溶血弧菌(文蛤)	0	0	12.5	11.1	13.4
副溶血弧菌(青蛤)	11.9	0	0	12.0	0
副溶血弧菌(黄姑鱼)	0	0	0	9.2	12.0
哈氏弧菌(文蛤)	0	0	14.1	9.4	10.6
哈氏弧菌(美国红鱼)	0	0	0	9.2	9.6
哈氏弧菌(凡纳滨对虾)	0	0	0	11.0	13.1
哈氏弧菌(管角螺)	0	0	0	9.6	12.4
恶臭假单胞菌(条石鲷)	0	0	0	9.3	7.7
溶藻弧菌(锯缘青蟹)	0	0	12.7	10.2	11.4
灿烂弧菌(美国红鱼)	0	0	13.0	7.0	24.7

表 3 羊栖菜乙酸乙酯相薄层层析分离组分抗水产动物病原菌活性结果

Tab. 3 Antimicrobial activities of the ethyl acetate fractions of *S. fusiforme* against aquatic animal pathogens

指示菌(来源)	抑菌圈直径(mm)					
	R_f 0.00	R_f 0.24	R_f 0.34	R_f 0.40	R_f 0.45	R_f 0.54
需钠弧菌(文蛤)	8.1	8.1	0	8.3	8.4	7.9
副溶血弧菌(文蛤)	0	0	0	0	7.9	8.2
副溶血弧菌(青蛤)	10.6	8.0	9.0	9.2	7.7	10.2
副溶血弧菌(黄姑鱼)	7.1	8.1	8.3	8.7	8.0	8.4
哈氏弧菌(文蛤)	0	0	0	8.2	8.0	9.1
哈氏弧菌(美国红鱼)	7.9	8.7	7.3	8.1	7.8	7.9
哈氏弧菌(凡纳滨对虾)	0	0	0	9.0	11.4	13.6
哈氏弧菌(管角螺)	9.5	7.7	10.9	8.4	9.3	7.9
恶臭假单胞菌(条石鲷)	0	7.5	8.7	8.1	9.6	9.4
溶藻弧菌(锯缘青蟹)	19.2	16.7	17.4	17.7	16.2	19.1
灿烂弧菌(美国红鱼)	8.4	8.3	7.9	10.4	9.2	7.9

分离后各层带对溶藻弧菌仍保持较强的活性,而且 R_f 0.45 带、 R_f 0.54 带对 11 种水产动物病原菌均具有较好的抗性。

3.3 两种海藻乙醚粗脂洗脱组分抗水产动物病原菌活性

表 4 和表 5 显示,两种海藻乙醚粗脂三种洗脱组分的抗菌性比粗脂的抗菌性略有减弱,原因可能是共同起作用的活性物质被分开,从而在分离后降低了其抗菌能力。

4 讨论

本实验显示,大型海藻羊栖菜、条浒苔体内含有抗水产动物病原菌的活性物质,其中羊栖菜不同提取液浸提物对溶藻弧菌具有最明显的抑制作用,条浒苔乙醚粗脂对灿烂弧菌的抑制作用最强。但有活性的提取物均为粗提物,含有多种成分,化学性质复杂,对实

验结果影响较大。如在薄层层析分离实验当中发现, R_f 值最大的两条带的抗性最好,而林雄平等^[13]在羊栖菜提取物抗动植物病原菌活性的实验中提到较低的 R_f 值对 3 种动物病原菌具有较好的抑制作用,可能是不同的实验菌种对羊栖菜乙醇粗提物乙酸乙酯相各层带敏感性不同造成的,其中 $R_f=0.45$ 带、0.54 带的化学成分还有待进一步的研究分析;从柱层析分离实验结果来看,粗脂中的活性物质分别在各洗脱组分当中,各组分抗菌性略有减弱说明粗提物中的抑菌物质可能为多种成分共同起作用,而且有几种洗脱组分的基团它们之间可能存在相互作用,或者被其他基团所屏蔽,分离后屏蔽基团被分开,抗菌活性才显现出来。

徐年军等在研究海藻乙醇提取物抗菌活性实验中提到,从不同门类海藻的抗菌活性看,褐藻最强,红藻次之,而绿藻活性最弱^[8]。而从本实验的结果来看,绿藻条浒苔乙醇提取物对本实验指示菌没有抗

表 4 羊栖菜乙醚粗脂洗脱组分抗水产动物病原菌活性结果

Tab. 4 Antimicrobial activities of three elution fractions of *S. fusiforme* against aquatic animal pathogens

指示菌(来源)	抑菌圈直径(mm)		
	苯	乙酸乙酯	95%乙醇
需钠弧菌(文蛤)	0	0	11.2
副溶血弧菌(文蛤)	0	11.8	0
副溶血弧菌(青蛤)	14.0	0	0
副溶血弧菌(黄姑鱼)	12.3	0	0
哈氏弧菌(文蛤)	0	13.1	0
哈氏弧菌(美国红鱼)	0	13.6	0
哈氏弧菌(凡纳滨对虾)	0	0	0
哈氏弧菌(管角螺)	0	0	0
恶臭假单胞菌(条石鲷)	13.1	0	10.9
溶藻弧菌(锯缘青蟹)	0	11.0	11.9
灿烂弧菌(美国红鱼)	11.3	0	0

表 5 条浒苔乙醚粗脂洗脱组分抗水产动物病原菌活性结果

Tab. 5 Antimicrobial activities of three elution fractions of *E. clathrata* against aquatic animal pathogens

指示菌(来源)	抑菌圈直径(mm)		
	苯	乙酸乙酯	95%乙醇
需钠弧菌(文蛤)	0	9.8	0
副溶血弧菌(文蛤)	0	0	11.9
副溶血弧菌(青蛤)	0	0	10.8
副溶血弧菌(黄姑鱼)	9.6	0	0
哈氏弧菌(文蛤)	9.7	0	0
哈氏弧菌(美国红鱼)	8.8	0	0
哈氏弧菌(凡纳滨对虾)	10.2	0	0
哈氏弧菌(管角螺)	11.9	0	0
恶臭假单胞菌(条石鲷)	8.7	0	13.8
溶藻弧菌(锯缘青蟹)	8.3	9.6	0
灿烂弧菌(美国红鱼)	0	7.9	0

性,但乙醚提取物中表现出的抗菌活性一定程度上超过了褐藻羊栖菜的活性,可见不同藻类使用不同的溶剂提取得到的活性物质及其抗菌能力也不一样。

利用海藻提取物添加到饲料中以替代抗生素等化学药物在水产养殖病害防治方面已有一些研究。如 Immanuel 等^[14]曾研究发现热带海藻石莼(*Ulva lactuca*)和马尾藻属的围氏马尾藻(*Sargassum wightii*)提取物具有抗副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的活性,其抑菌圈高达 17.5 mm ± 0.81 mm、16.3 mm ± 0.47 mm,并将提取物添加到饲料中喂养印度对虾(*Penaeus indicus*),发现印度对虾体中的副溶血弧菌明显地减少了。本文羊栖菜乙醇粗提物乙酸乙酯相和条浒苔乙醚粗脂分别对溶藻弧菌和灿烂弧菌有很强的抑制作用,其有效成分的分离纯化,有待进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 赵明军,黄志斌. 无公害渔药研发面临的问题和急需研究的课题[J]. 中国渔业经济, 2008, 26(1): 52-60.
- [2] 黄琪琰. 中国水产动物疾病学研究进展[J]. 水产学报, 1996, 20(1): 51-57.
- [3] 徐维海,朱校斌,王新亭. 抗菌药物在鱼、虾体内的残留及代谢动力学研究[J]. 海洋科学, 2003, 28(9): 62-65.
- [4] 史大永,李敬郭,郭书举,等. 5种南海海藻醇提取物活性初步研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 40-43.
- [5] 史大永,李晓红,李敬,等. 海藻提取物环氧加酶-2抑制活性研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(7): 30-32.
- [6] 林雄平,郑怡,陈晓清. 三种褐藻乙醇提取物抗动植物病原菌活性[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2005, 21(1): 112-116.
- [7] Elena E Paskaleva, Xudong Lin, Karen Duus, James J McSharry. *Sargassum fusiforme* fraction is a potent and specific inhibitor of HIV-1 fusion and reverse transcriptase[J]. *Virology Journal*, 2008, 5(8): 1-9.
- [8] 徐年军,范晓,等. 海藻乙醇提取物抗菌活性的研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 265-270.
- [9] Hiraoka M, Ohno M, Kawaguchi S, et al. Crossing test among floating *Ulva thalli* forming 'green tide' in Japan[J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512: 239-245.
- [10] 刘连生,闫茂仓,林志华,等. 引起文蛤暴发性死亡病原菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 71-77.
- [11] 李国,闫茂仓,常维山,等. 文蛤副溶血弧菌间 ELISA 检测技术的研究[J]. 海洋通报, 2008, 27(5): 85-90.
- [12] Nagashima Y, Kikuchi N, Shimakura K, et al. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegelii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 2003, 136, 63-71.
- [13] 林雄平,郑怡,陈晓清. 羊栖菜提取物抗动植物病原菌活性及化学成分初步分析[J]. 热带海洋学报, 2009, 28(2): 77-80.
- [14] Immanuel G, Vincylbai V C, Sivaram V, et al. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on shrimp *Penaeus indicus* juveniles[J]. *Aquaculture*, 2004, 236: 53-65.

Antimicrobial activities of extracts from *Sargassum fusiforme* and *Enteromorpha clathrata* against aquatic animal pathogens

LU Yuan¹, YAN Mao-cang², XU Hong-xiang¹, NAN Chun-rong¹

(1. Life Science School, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035 China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

Received: Sep., 30, 2009

Key words: *Sargassum fusiforme*; *Enteromorpha clathrata*; extract; aquatic animal pathogen; antimicrobial activity

Abstract: Antimicrobial activities of extracts from two macro-algae, *Sargassum fusiforme* and *Enteromorpha clathrata* were assayed against 11 aquatic animal pathogens. The results showed that the ethyl acetate phase of ethanol extracts from *S. fusiforme* exhibited the strongest inhibition effect on *Vibrio alginolyticus* with an inhibition zone of 21.6 mm; the ethyl acetate phase of ethanol extracts from *S. fusiforme* had six chromatographic bands, among which the band with $R_f=0.54$ showed the strongest inhibition effect on *Vibrio harveyi*, with an inhibition zone was 13.6 mm; the crude fat of *E. clathrata* could inhibit all 11 aquatic animal pathogens, and the strongest inhibition effect was toward *Vibrio splendidus* with an inhibition zone of 24.7 mm. Moreover, the antimicrobial activities of the three elution fractions of the crude fat from *E. clathrata* was weaker than that of the crude fat, the inhibition zone of the 95% ethanol elution fractions to *Pseudomonas putida* was still up to 13.8 mm. Our results support the feasibility of developing marine drugs from *S. fusiforme* and *E. clathrata*.

(本文编辑:张培新)