



## 银离子对几种细菌的杀菌效应

资英娟<sup>1</sup>, 李岩<sup>1</sup>, 黎烽<sup>1</sup>, 杨敏璇<sup>1</sup>, 赵丽娟<sup>1</sup>,  
李凤麟<sup>1</sup>, 林鑫<sup>1\*</sup>, 秦真东<sup>1,2\*</sup>

- (1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,  
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225;  
2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室,  
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510225)

**摘要:** 由抗生素导致的耐药性问题日益严重, 因此新型抗菌药物的研发迫在眉睫。银离子因具有抗菌作用, 以及安全、无耐药性、稳定性高等优点而备受关注。为了探究银离子的抗菌机制, 本实验选择几种常见水生细菌, 研究其对银离子的耐受性和细菌种内和种间的“僵尸效应”(被银离子杀死的细菌可以杀死其他新鲜的细菌), 以进一步明确银离子长效杀菌的机理。结果显示, 银离子对5种细菌都表现出了明显的生长抑制。同种细菌和异种细菌之间都表现出明显的“僵尸效应”, 并且随着银离子浓度的提高, “僵尸效应”的效果越明显。为进一步研究银离子杀菌机制, 通过透射电镜观察银离子处理后的嗜水气单胞菌和无乳链球菌, 结果显示银离子处理后的细菌出现胞质皱缩, 细胞膜呈弥散状态, 甚至破裂, 细胞内容物外流, 最终致使细菌死亡。研究表明, 本研究结果发现银离子对5种细菌都有明显的生长抑制效应, 并发现细菌之间存在的“僵尸效应”, 为研发新型的抗菌药物提供参考。

**关键词:** 银离子; 细菌; 长效杀菌机制; 僵尸效应

**中图分类号:**

**文献标志码:** A

人们对水产品需求量的日益增加, 导致水产养殖的规模和养殖密度不断增加, 加之养殖水域环境不断恶化, 多种细菌和病毒病的频繁暴发, 给水产养殖产业带来了巨大威胁和经济损失。大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为水产养殖中常见的细菌, 常被选做实验微生物菌株。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属于弧菌科(vibrionaceae)气单胞菌属(*Aeromonas*)的革兰氏阴性菌, 是淡水养殖鱼类的主要致病菌, 引起多种水产养殖动物的出血症<sup>[1-4]</sup>; 鲶爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)属于肠

杆菌科(*Enterobacteriaceae*)爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)的革兰氏阴性菌, 对斑马鱼(*Barchydanio rerio var*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲌(*Leiocassis longirostris*)等都有致病性, 主要危害斑点叉尾鲌(*Ictalurus punctatus*), 引起败血症<sup>[5-7]</sup>; 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)属于革兰氏阳性球菌, 是鱼类条件致病菌, 主要危害温水性鱼类, 引起败血症和脑膜炎<sup>[8-10]</sup>。

抗生素一直作为抗菌药物的首选, 而抗生素的滥用导致细菌出现的抗药性问题也越来越

收稿日期: 2019-09-07 修回日期: 2019-12-13

资助项目: 农业农村部渔用药物创制重点实验室开放课题基金(201805); 南海水产经济动物增殖重点实验室开放课题(KFKT2019YB04); 2018广东省仲恺农业工程学院研究生科技创新基金(KA180582610)

通信作者: 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn; 秦真东, E-mail: 575512829@qq.com

严重,因此“无抗”药物的开发迫在眉睫。目前常见的水体消毒除菌技术有氯系除菌技术、臭氧除菌技术、紫外除菌技术、活性炭吸附和膜截留除菌技术、金属离子除菌技术<sup>[11]</sup>。但在氯消毒过程中,水中含有的有机物常与氯气发生化学反应,生成的消毒副产物(DBPs)不利于水产养殖生物的健康生长<sup>[12-13]</sup>;而臭氧使用过程不稳定,且生产成本低<sup>[14-15]</sup>;紫外线消毒能力不持久,存在设备投资费用高等缺陷;活性炭吸附、膜截留除菌属于物理除菌,对细菌没有灭活作用<sup>[11]</sup>;在众多的金属抗菌材料中,银由于具有安全、高效、广谱、释性好、无耐药性等特点,一直是抗菌领域的一个研究热点<sup>[16-17]</sup>。已有研究表明抗菌金属主要通过缓慢释放其阳离子,来防止微生物定殖和增殖<sup>[18-20]</sup>。银离子的杀菌原理是 $Ag^+$ 作用细菌的细胞壁和细胞膜并使之肿胀、疏松、通透性增加、内容物流出,导致细菌死亡<sup>[21-24]</sup>。Wakshlak等<sup>[24]</sup>研究发现,被 $Ag^+$ 杀死的细菌会持续吸收环境中的 $Ag^+$ ,在其接触正常菌体时,会将储存在体内的 $Ag^+$ 又释放到环境中,从而杀死正常的细菌,并把这种现象称为“僵尸效应”,拓展了银离子抗微生物长效性的新机制。因此,银离子抗菌药物的开发具有重要的应用意义。

本研究以银离子为对象,探究银离子对几种常见水产细菌的杀菌活性,以及不同细菌对银离子的耐受情况,同时探究同种细菌或者异种细菌之间的“僵尸效应”,并通过透射电镜进一步探究了银离子对嗜水气单胞菌和无乳链球菌的杀菌机制。本研究结果将为“无抗”抗菌药物的开发提供新的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

枯草芽孢杆菌(ATCC<sup>®</sup> 2 3857<sup>TM</sup>)、无乳链球菌(ATCC<sup>®</sup> 12 386<sup>TM</sup>)、大肠杆菌(ATCC<sup>®</sup> 1 3706<sup>TM</sup>)、嗜水气单胞菌(ATCC<sup>®</sup> 7 966<sup>TM</sup>)、鲎爱德华氏菌(ATCC<sup>®</sup> 3 320<sup>TM</sup>)均由华中农业大学微生物实验室保存。

LB培养液(酵母粉5.0 g,蛋白胨10.0 g, NaCl 10.0 g, 加蒸馏水至1 L, NaOH调节pH值至7.4, 121 °C高压灭菌25 min)。

BHI培养液(脑心浸出粉38.5 g, 加蒸馏水至1 L, 121 °C高压灭菌25 min)。

硝酸银溶液(0.5 g  $AgNO_3$ 粉末溶于500 mL蒸馏水, 0.22  $\mu m$ 滤膜过滤备用)。

硝酸银中和液(0.2%硫代乙酸钠、1.9%硫代硫酸钠、1%吐温80、1.4%卵磷脂)。

### 1.2 细菌银离子耐受实验

将保种的细菌按照1:100的比例接种200  $\mu L$ 到20 mL的培养液,置于恒温摇床200 r/min培养8 h。其中枯草芽孢杆菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌的培养基为LB培养液,无乳链球菌、鲎爱德华氏菌的培养基为BHI培养液。枯草芽孢杆菌、无乳链球菌、大肠杆菌37 °C培养;嗜水气单胞菌、鲎爱德华氏菌28 °C培养。

将培养8 h后活化好的菌液分成5管,每管加入不同剂量的硝酸银溶液,使其终浓度分别为0、5、10、20和40 mg/L,在不同时间点于各管取200  $\mu L$ 菌液,酶标仪测定菌液OD<sub>600</sub>值。

### 1.3 同种细菌之间的“僵尸效应”

如“细菌银离子耐受实验”中的方法,将各菌株分别与不同浓度的银离子培养6 h后,将 $Ag^+$ 浓度为0 mg/L的对照在沸水中煮沸5 min,然后将各组菌液通过5 000 r/min, 4 °C离心10 min,上清液用0.22  $\mu m$ 滤膜过滤后,移至无菌的10 mL离心管中备用,沉淀用4 mL新鲜的培养液重悬备用。吸取上述重悬菌液和上清液各1 mL,分别加入1 mL同种新鲜菌液中,继续恒温震荡培养6 h后。在菌液中加入等体积的硝酸银中和液,稀释涂平板,进行菌落计数,具体实验方案见图1。

### 1.4 异种细菌间的“僵尸效应”

如“细菌银离子耐受实验”中的方法,将无乳链球菌和嗜水气单胞菌分别与不同浓度的银离子处理培养6 h;同“同种细菌之间的‘僵尸效应’”中的方法,将 $Ag^+$ 浓度为0 mg/L的对照热灭活,然后将各组菌液离心分为上清液和菌液,吸取菌液和上清液各1 mL,分别加入1 mL异种新鲜菌液中,继续恒温振荡培养6 h,在菌液中加入等体积的硝酸银中和液,涂平板,进行菌落计数。

### 1.5 透射电镜观察银离子杀菌机制

将无乳链球菌和嗜水气单胞菌分别与终浓度10和40 mg/L的 $Ag^+$ 培养6 h,然后5 000 r/min 4 °C离心10 min,去上清液,加入800  $\mu L$ 的2.5%的戊二醛重悬,室温固定过夜,转移至1.5 mL EP管中,离心,倒掉固定液,用PBS洗涤3次,每次15 min,用1%的锇酸溶液固定样品2 h,分

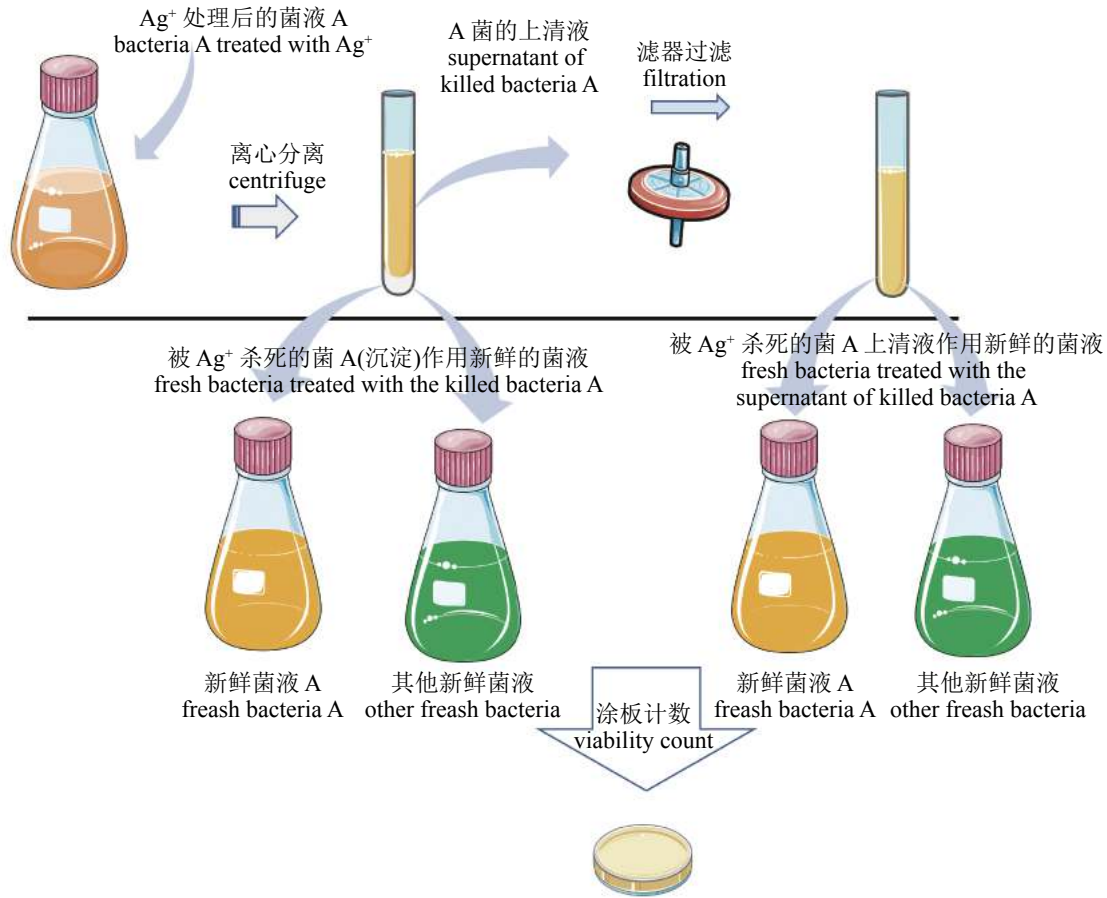


图 1 实验方案

Fig. 1 Experimental protocol

别用50%、70%、80%、90%、95%的乙醇对样品进行脱水处理, 每次15 min, 后用无水乙醇处理20 min, 再用丙酮处理20 min, 最后用丙酮和包埋剂的混合液(V/V=1/1)处理样品1 h; 将经过渗透处理的样品分装到0.5 mL的EP管中包埋起来, 70 °C加热过夜; 样品切片(60~70 nm)后用2%乙酸双氧铀染色5 min, 经过水洗后用0.25%~0.3%的枸缘酸染色5 min; 透射电子显微镜观察并拍照。

### 1.6 数据统计分析

使用GraphPad Prism 7作图软件作图, 用SPSS 18软件的单因素方差分析对照组和不同浓度处理间显著性差异, 数据均为平均值±标准偏差(SD)表示,  $P < 0.05$ 的值有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细菌对银离子的耐受

随着 $Ag^+$ 浓度的增加, 对不同细菌都表现出

了明显的生长抑制并且不同细菌对银离子的耐受浓度存在差异: 大肠杆菌在 $Ag^+$ 浓度20 mg/L时, OD值在0.6波动未变, 即停止生长(图2-a); 在 $Ag^+$ 浓度为5 mg/L时, 嗜水气单胞菌的OD值基本未变(图2-b); 在 $Ag^+$ 浓度大于等于5 mg/L时, 鲷爱德华氏菌的OD值趋势一致, 细菌浓度基本没有变化(图2-c); 枯草芽孢杆菌在 $Ag^+$ 浓度10 mg/L时, OD值下降直至为零(图2-d); 无乳链球菌在 $Ag^+$ 浓度10 mg/L时基本不变(图2-e)。

### 2.2 同种细菌之间“僵尸效应”的传递

同种细菌之间存在明显的“僵尸效应”, 即被 $Ag^+$ 杀死的细菌菌体或菌液上清, 均能使得新鲜的细菌数量显著减少, 各实验组的菌落数下降明显, 并且, 随着 $Ag^+$ 的浓度增加, 细菌菌体和上清液产生的“僵尸效应”更明显。随着 $Ag^+$ 浓度的增加,  $Ag^+$ 杀死的大肠杆菌使得新鲜的大肠杆菌数量明显减少(图3-a); 该结果与嗜水气单胞菌(图3-b)、鲷爱德华氏菌(图3-e)结果一致; 无乳

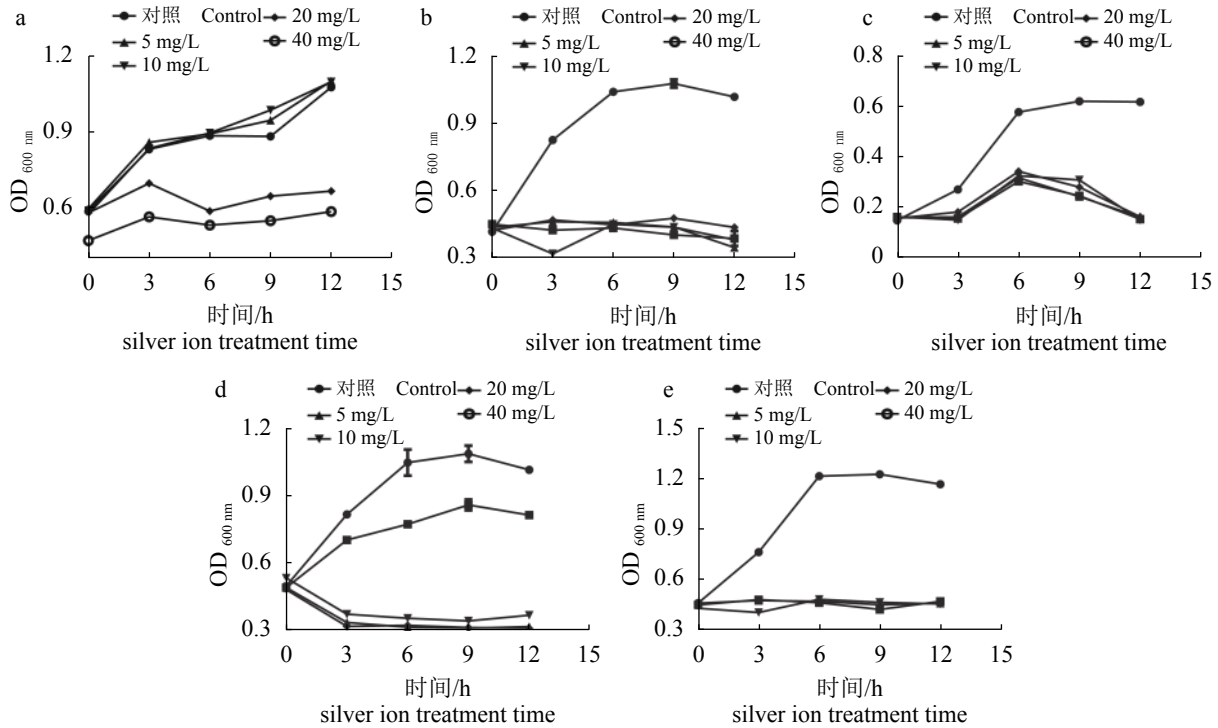


图2 银离子对5种细菌的生长抑制效果

(a)大肠杆菌, (b)嗜水气单胞菌, (c)鲮爱德华氏菌, (d)枯草芽孢杆菌, (e)无乳链球菌

Fig. 2 Inhibitory effect of silver ions on the growth of five bacteria

(a) *E. coli*, (b) *A. hydrophila*, (c) *E. ictaluri*, (d) *B. subtilis*, (e) *S. agalactiae*

链球菌(图3-c)和芽孢杆菌(图3-d)随着 $Ag^+$ 浓度的增加, 新鲜的细菌数量减少, 菌落数下降相对较缓。

### 2.3 异种细菌之间“僵尸效应”的传递

为进一步验证银离子处理后的细菌是否存在不同细菌之间的“僵尸效应”, 选择银离子处理后的嗜水气单胞菌和无乳链球菌, 分别利用其菌体和上清液处理新鲜的其他异种细菌(如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和鲮爱德华氏菌), 研究结果显示, 银离子处理后的嗜水气单胞菌对于大肠杆菌(图4-a)、无乳链球菌(图4-b)、芽孢杆菌(图4-c)和鲮爱德华氏菌(图4-d)均有杀伤作用。细菌上清液处理液的杀菌效果比菌体效果更明显, 并且随着 $Ag^+$ 浓度增加, “僵尸效应”更加明显。在银离子处理无乳链球菌的实验中, 得到了相似的研究结果(图4-e-h)。

### 2.4 嗜水气单胞菌和无乳链球菌透射电镜观察

为进一步探究银离子的杀菌机制, 利用透射电镜观察银离子处理后的嗜水气单胞菌和无乳链球菌, 结果显示, 正常的嗜水气单胞菌呈

长梭杆状, 形状规则、外形饱满, 细胞质均匀, 状态良好(图版 I -1~2); 10 mg/L  $Ag^+$ 处理后, 细胞质皱缩, 细胞膜和细胞壁分离, 细胞内部形成纤维状结核, 在细菌中可以发现部分银离子的存在(图版 I -5~6); 40 mg/L  $Ag^+$ 处理后, 细胞膜破裂, 细胞质内容物流出, 细菌死亡, 在细菌中可以看到大量的银离子出现(图版 I -9~10)。在无乳链球菌研究中发现, 正常的无乳链球菌, 细菌呈圆形球状, 外形饱满, 细胞质均匀, 状态良好(图版 I -3~4); 而10 mg/L  $Ag^+$ 处理后, 细胞质皱缩, 在细菌中可以发现部分银离子的存在(图版 I -7~8), 40 mg/L  $Ag^+$ 处理后, 细胞膜呈弥散状态, 细胞内容物外流, 导致细菌死亡, 在细菌中可以看到大量的银离子出现(图版 I -11~12)。

## 3 讨论

人们从远古时代就开始使用抗菌材料, 发现用银容器留存的水不宜变质, 并习惯使用银筷子或者将银制成饰品佩带等。人们很早就开始认识到银有抗菌作用, 并利用银的抗菌能力, 将银制成抗菌剂, 然后将其加入到相应的

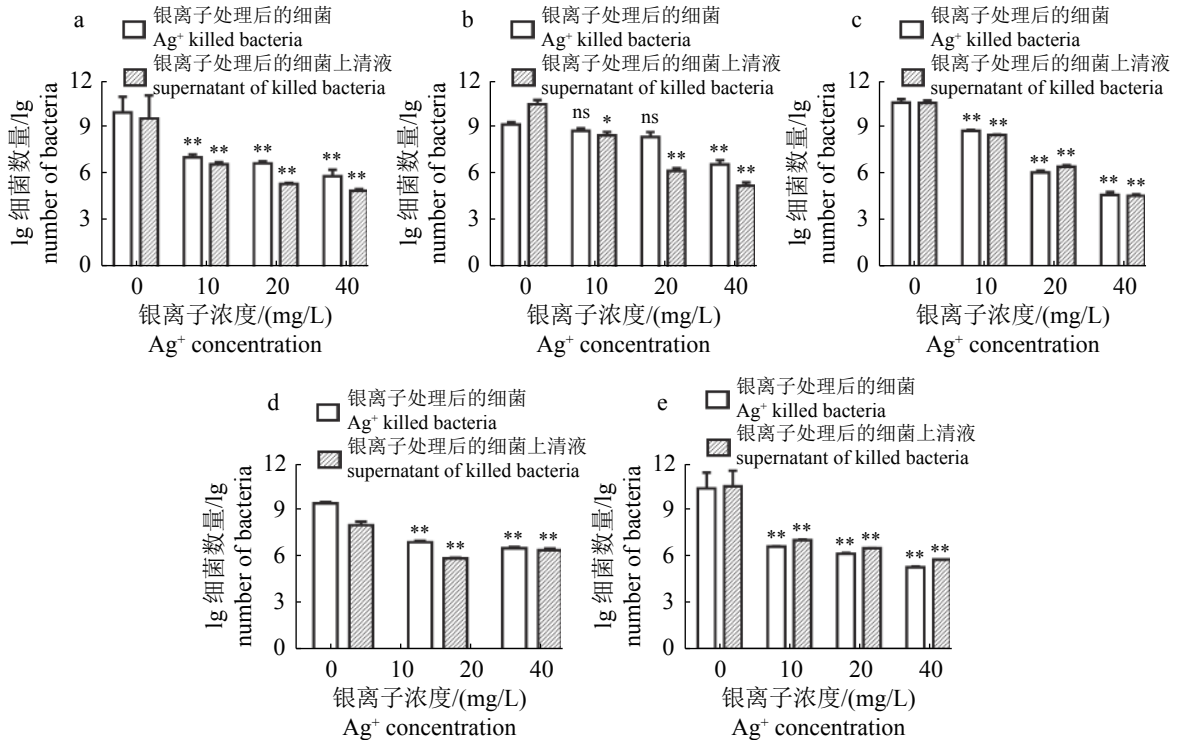


图 3 同种细菌的“僵尸效应”

(a)大肠杆菌, (a)嗜水气单胞菌, (c)无乳链球菌, (d)芽孢杆菌, (e)鲷爱德华氏菌。单因素方差分析, 与对照处理的平均值±SD相比, ns表示无显著差异, \*表示p<0.05, \*\*表示p<0.01。下同

Fig. 3 The "zombie effect" of the same kind of bacteria

(a) *E. coli*, (a) *A. hydrophila*, (c) *S. agalactiae*, (d) *B. subtilis*, (e) *E. ictalurid*. These data are expressed as the mean ± SD relative to the control. ns no significant difference vs. control; \*p < 0.05 vs. control; \*\*p < 0.01 vs. control. The same below

制品中即获得具有抗菌能力的材料。但是, 目前关于银在水产上的应用还比较少, 其对水产常见细菌的抗菌作用相关研究还未见详细报道。Wakshlak等<sup>[25]</sup>在研究Ag<sup>+</sup>对绿脓杆菌的毒性作用时发现, 其对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)有显著的抑制作用, 并且处理后的绿脓杆菌与新鲜的绿脓杆菌存在传递性, 该研究中研究者选取了绿脓杆菌这一种革兰氏阴性菌。但是不同细菌之间是否存在传递性尚不明确, 本实验选取了常见的水产动物致病菌包括革兰氏阳性菌(无乳链球菌)和革兰氏阴性菌(嗜水气单胞菌和鲷爱德华氏菌), 不仅探究了Ag<sup>+</sup>毒性在同种细菌之间的传递性, 还涉及了异种细菌之间的“僵尸效应”<sup>[22]</sup>。细菌耐受性实验发现, 革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌和鲷爱德华氏菌的最小抑制浓度较革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌和无乳链球菌的最小抑制浓度低, 这与Sütterlin等<sup>[26]</sup>的研究相似, Sütterlin等实验表明, Ag<sup>+</sup>对革兰氏阳性菌的最低杀菌浓度(MBC)是革兰氏阴性菌MBC的32倍以上。“僵尸效应”实验中, 结果表明Ag<sup>+</sup>不仅在

同种细菌之间存在广泛的传递性, 与Wakshlak等<sup>[25]</sup>研究一致, 同时不同细菌之间也存在广泛的传递性, 明确了Ag<sup>+</sup>对细菌的耐受限度, 对杀灭细菌时如何控制Ag<sup>+</sup>浓度有重要借鉴意义。

研究发现, 银离子杀菌主要通过以下途径: Ag<sup>+</sup>与细菌细胞膜相互作用, 从而破坏细胞膜; Ag<sup>+</sup>与细胞内的核酸和酶相互作用, 从而影响细胞的生理生化作用; 产生活性氧(ROS)杀死细菌<sup>[26-27]</sup>。其中银离子与细胞膜的相互作用是Ag<sup>+</sup>杀菌最重要的机制之一<sup>[28]</sup>。Jung等<sup>[29-30]</sup>证明了在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中, Ag<sup>+</sup>在细菌细胞膜中积累后, 细胞质膜(CM)与细胞壁分离, 这与本研究中透射电镜观察的结果一致。

本实验中的电镜观察结果显示, 无论是革兰氏阴性的嗜水气单胞菌还是革兰氏阳性的无乳链球菌, 均可看到随着Ag<sup>+</sup>浓度增加, 细胞质逐渐皱缩直至胞内内容物流出, 细菌死亡。10 mg/L Ag<sup>+</sup>处理的无乳链球菌, 细胞内容物与细胞膜分离, 40 mg/L Ag<sup>+</sup>处理的无乳链球菌, 细胞膜呈弥散状态, 细胞膜周围大量银离子, 与Ivan等<sup>[31-32]</sup>

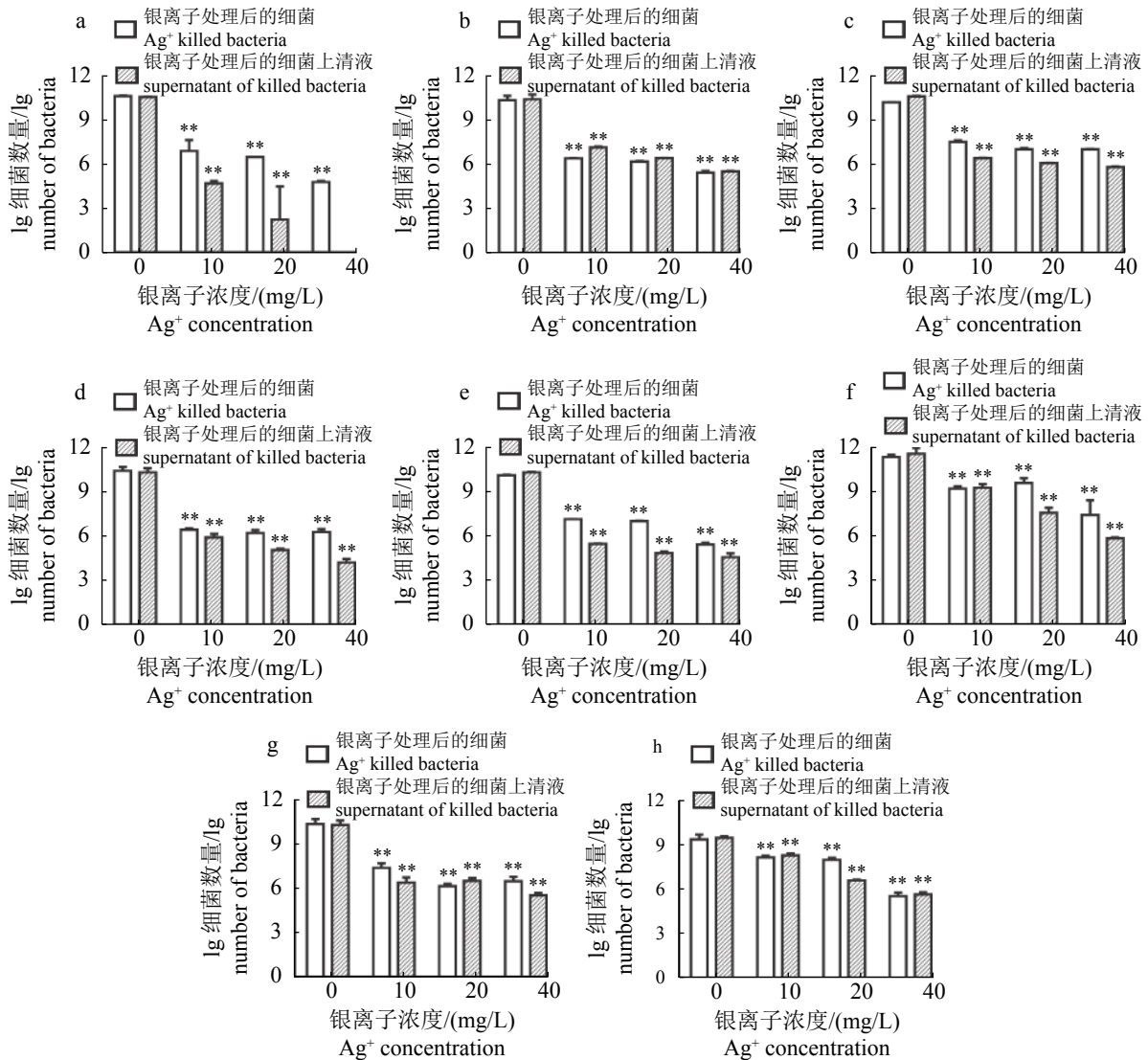


图4 异种细菌之间“僵尸效应”的传递

(a)  $\text{Ag}^+$ 处理后的嗜水气单胞菌再作用于大肠杆菌, (b)  $\text{Ag}^+$ 处理后的嗜水气单胞菌再作用无乳链球菌, (c)  $\text{Ag}^+$ 处理后的嗜水气单胞菌再作用枯草芽孢杆菌, (d)  $\text{Ag}^+$ 处理后的嗜水气单胞菌再作用鮭爱德华氏菌, (e)  $\text{Ag}^+$ 处理后的无乳链球菌再作用大肠杆菌, (f)  $\text{Ag}^+$ 处理后的无乳链球菌再作用嗜水气单胞菌, (g)  $\text{Ag}^+$ 处理后的无乳链球菌再作用枯草芽孢杆菌, (h)  $\text{Ag}^+$ 处理后的无乳链球菌再作用鮭爱德华氏菌

Fig. 4 Transmission of "zombie effect" between different bacteria

(a)  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila* reprocessed *E. coli*, (b)  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila* reprocessed *S. agalactiae*, (c)  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila* reprocessed *B. subtilis*, (d)  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila* reprocessed *E. ictaluri*, (e)  $\text{Ag}^+$  treated *S. agalactiae* reprocessed *E. coli*, (f)  $\text{Ag}^+$  treated *S. agalactiae* reprocessed *S. agalactiae*, (g)  $\text{Ag}^+$  treated *S. agalactiae* reprocessed *B. subtilis*, (h)  $\text{Ag}^+$  treated *S. agalactiae* reprocessed *E. ictaluri*

研究的大肠杆菌电镜图相似, 都说明细胞膜在  $\text{Ag}^+$  的作用下受到了极大的损伤, 并且阻断了细胞内容物与细胞膜的联系。10 mg/L  $\text{Ag}^+$  处理的嗜水气单胞菌和无乳链球菌细胞内部形成纤维状结核, 这与王晓岚等<sup>[33]</sup>和Feng等<sup>[34]</sup>的研究结果一致, 说明  $\text{Ag}^+$  已经入侵到细胞内部, 可能改变了其生理生化性质。本研究结果将为水产动物的病害防控提供参考, 并且为“无抗”药物筛选提供新的参考。

<http://www.scxuebao.cn>

资英娟和李岩为并列第一作者。

#### 参考文献:

[1] 田甜. 鱼源嗜水气单胞菌的分离鉴定及耐药性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.

Tian T. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* strains from freshwater fish and their antibacterial resistance[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010(in Chinese).

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- [2] 戚睿斌, 袁平, 赵静, 等. 草鱼、鲤鱼源嗜水气单胞菌的分离鉴定与耐药性检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(8): 175-178, 295.  
Qi R B, Yuan P, Zhao J, *et al.* Isolation, identification and drug resistance detection of *Aeromonas hydrophila* from grass carp and carp[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(8): 175-178, 295(in Chinese).
- [3] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2008, 27(1): 78-86.  
Shen J Y. Research progresss on *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2008, 27(1): 78-86(in Chinese).
- [4] 邱德全, 何建国, 钟英长, 等. 嗜水气单胞菌的致病性和免疫性研究[J]. 中山大学学报论丛, 1996(S1): 98-108.  
Qiu D Q, He J G, Zhong Y C, *et al.* Studies on the Pathogenesis and Immunity of *Aeromonas hydrophila*[J]. Supplement to the Journal of Sun Yatsen University, 1996(S1): 98-108(in Chinese).
- [5] 王荣华. 鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)菌蛻疫苗的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.  
Wang R H. The Study of *Edwardsiella ictaluri* ghosts vaccine[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014(in Chinese).
- [6] 耿毅, 汪开毓, 范方玲, 等. 养殖黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)鲷爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 61-67.  
Geng Y, Wang K Y, Fan F L, *et al.* Isolation, identification and biological characterization of *Edwardsiella ictaluri* from cultured yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(1): 61-67(in Chinese).
- [7] 李强, 刘海燕, 黄华, 等. 鲷爱德华氏菌黄颡鱼分离株外膜蛋白的抗原性分析[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(3): 85-89.  
Li Q, Liu H Y, Huang H, *et al.* Antigenic characterization of the outer membrane proteins of *Edwardsiella ictaluri*, isolated from *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(3): 85-89(in Chinese).
- [8] 蔡玉臻, 刘志刚, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼无乳链球菌 Sip蛋白乳酸菌活载体口服疫苗的研制及其免疫效果[J]. 水产学报, 2019, 43(3): 661-670.  
Cai Y Z, Liu Z G, Lu M X, *et al.* Preparation of live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing Sip protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) and immunogenicity analysis[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(3): 661-670(in Chinese).
- [9] Garcia J C, Klesius P H, Evans J J, *et al.* Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture*, 2008, 281(1-4): 151-154.
- [10] Mian G F, Godoy D T, Leal C A G, *et al.* Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136(1-2): 180-183.
- [11] 熊旭华. 不同形态纳米银的制备及其杀菌性能研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.  
Xiong X H. Preparation of silver nanostructures with different shapes and its antibacterial activity[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014(in Chinese).
- [12] 罗晓鸿, 王占生, 张锡辉. 饮用水消毒剂的比较与评价[J]. 给水排水, 1994(10): 43-45.  
Luo X H, Wang Z S, Zhang X H. Assessment of disinfectants for drinking water[J]. *Water & Wastewater Engineering*, 1994(10): 43-45(in Chinese).
- [13] 陈华, 彭东升. 三种常用饮用水消毒剂的应用和前景评价[J]. 中国环保产业, 1999(3): 32-34.  
Chen H, Peng D S. The application and prospect evaluation of three potable water disinfectants in common use[J]. *China Environmental Protection Industry*, 1999(3): 32-34(in Chinese).
- [14] 蔡璇, 魏源源, 李然, 等. 饮用水化学消毒方法及其影响因素研究进展[J]. 卫生研究, 2011, 40(5): 660-663.  
Cai X, Wei Y Y, Li R, *et al.* Research progress on chemical disinfection methods and influencing factors of drinking water[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2011, 40(5): 660-663(in Chinese).
- [15] 阮复昌, 莫炳禄, 公国庆, 等. 一种理想的杀菌消毒剂—稳定性二氧化氯[J]. 广东化工, 1995(1): 36-39.  
Ruan F C, Mo B L, Gong G Q, *et al.* An ideal disinfectant-stable chlorine dioxide[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 1995(1): 36-39(in Chinese).
- [16] 熊旭华, 胡勇有, 洪学森, 等. 纳米银对水中大肠杆菌

- 的杀菌性能研究[J]. *工业用水与废水*, 2014, 45(3): 39-43.
- Xiong X H, Hu Y Y, Hong X S, *et al.* Study on bactericidal capability of silver nanoparticles to *Escherichia coli* in water[J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2014, 45(3): 39-43(in Chinese).
- [17] 沈芑. 银离子消毒与抗菌应用研究现状[J]. *中国消毒学杂志*, 2007, 24(1): 73-75.
- Shen P. Research status of silver ion disinfection and antibacterial application[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2007, 24(1): 73-75(in Chinese).
- [18] Brady M J, Lisay C M, Yurkovetskiy A, *et al.* Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria[J]. *American Journal of Infection Control*, 2003, 31(4): 208-214.
- [19] Liu J Y, Sonshine D A, Shervani S, *et al.* Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(11): 6903-6913.
- [20] Boateng J S, Matthews K H, Stevens H N E, *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: A review[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97(8): 2892-2923.
- [21] Rafińska K, Pomastowski P, Buszewski B. Study of *Bacillus subtilis* response to different forms of silver[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 661: 120-129.
- [22] Ben-Knaz R, Pedahzur R, Avnir D. Bioactive doped metals: High synergism in the bactericidal activity of chlorhexidine@silver towards wound pathogenic bacteria[J]. *RSC Advances*, 2013, 3(21): 8009-8015.
- [23] Randall C P, Oyama L B, Bostock J M, *et al.* The silver cation ( $Ag^+$ ): Antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(1): 131-138.
- [24] Wu K H, Wang J C, Huang J Y, *et al.* Preparation and antibacterial effects of Ag/AgCl-doped quaternary ammonium-modified silicate hybrid antibacterial material[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 98: 177-184.
- [25] Wakshlak R B K, Pedahzur R, Avnir D, *et al.* Antibacterial activity of silver-killed bacteria: The "zombies" effect[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9555.
- [26] Sütterlin S, Tano E, Bergsten A, *et al.* Effects of silver-based wound dressings on the bacterial flora in chronic leg ulcers and its susceptibility *in vitro* to silver[J]. *Acta Dermato-Venereologica*, 2012, 92(1): 34-39.
- [27] Kędziora A, Speruda M, Krzyżewska E, *et al.* Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): E444.
- [28] Percival S L, Bowler P G, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2005, 60(1): 1-7.
- [29] Jung W K, Koo H C, Kim K W, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(7): 2171-2178.
- [30] Randall C P, Gupta A, Jackson N, *et al.* Silver resistance in gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(4): 1037-1046.
- [31] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 275(1): 177-182.
- [32] 杨文娟. 银离子、银纳米颗粒对细菌影响的显微成像研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2009.
- Yang W J. Study of effects of silver ions and silver nanoparticles on bacteria based on microscopy imaging techniques[D]. Changsha: Hunan University, 2009(in Chinese).
- [33] 王晓岚. 金属离子的抗菌性能及其抗菌机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- Wang X L. Study on antibacterial activity and mechanism of metal ions[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015(in Chinese).
- [34] Feng Q L, Wu J, Chen G Q, *et al.* A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 52(4): 662-668.



## Mechanism underlying prolonged antibacterial effect of silver ion

ZI Yingjuan<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, YANG Minxuan<sup>1</sup>, ZHAO Lijuan<sup>1</sup>,  
LI Fenglin<sup>1</sup>, LIN Li<sup>1\*</sup>, QIN Zhendong<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

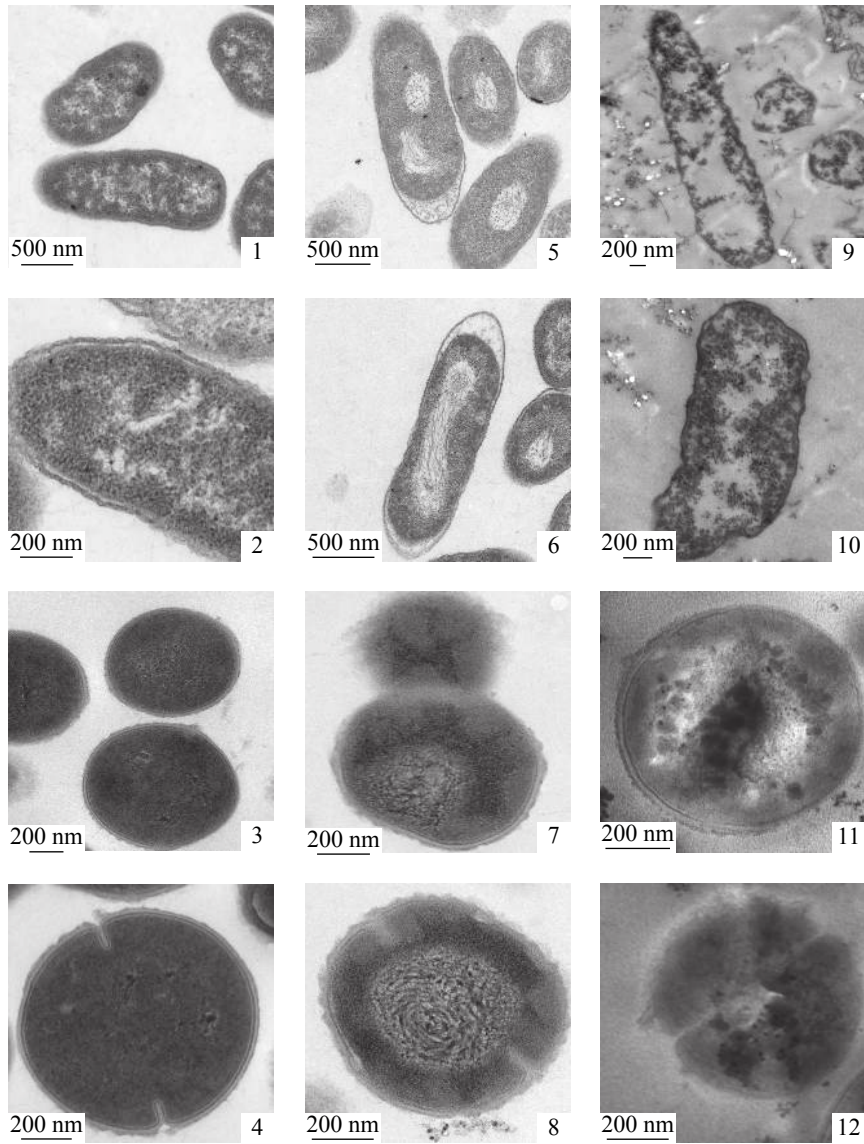
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** Drug resistance mainly caused by the abuse of antibiotics is becoming more and more serious, therefore there is an urgent need to develop novel antibacterial agents. Due to its safety, non-resistance, and high stability, the antibacterial activity of silver ion ( $\text{Ag}^+$ ) has attracted the attention of more and more researchers. In order to explore the antibacterial mechanism of  $\text{Ag}^+$ , several common aquatic bacteria, named (*Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus subtilis*, *Edwardsiella ictaluri*), were used to test the  $\text{Ag}^+$  tolerance or bactericidal activity and its "zombie effect" (the bacteria killed by  $\text{Ag}^+$  can kill other fresh bacteria). The results of tolerance experiments of bacteria to  $\text{Ag}^+$  showed that  $\text{Ag}^+$  had significant growth inhibition on the all five bacteria. The higher concentration of  $\text{Ag}^+$ , the more apparent "zombie effect" was observed between the same species of bacteria as well as different species of bacteria. To further investigate the mechanism underlying of the antibacterial activity of  $\text{Ag}^+$ , the  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila* and *S. agalactiae* were observed by transmission electron microscopy (TEM). The TEM results demonstrated that  $\text{Ag}^+$  could cause the separation of the cytoplasmic membrane (CM) from the cell wall and discharge of cytoplasmic organelles, so as it could cause the lysis of the bacterial cell wall. In summary, this study reveals the prolonged antibacterial mechanism of  $\text{Ag}^+$  which will pave a new way for the development of novel antibacterial agents.

**Key words:** silver ions; bacteria; prolonged antibacterial mechanism; zombie effect

**Corresponding authors:** LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn; QIN Zhendong. E-mail: 575512829@qq.com

**Funding projects:** Agricultural and Rural Ministry of Agriculture Key Laboratory of Fishery Drugs Open Project Fund (201805); South China Sea Aquatic Economic Animal Breeding Key Laboratory Open Project Fund (KFKT2019YB04); Zhongkai University of Agriculture and Engineering Graduate Technology Innovation Fund (KA180582610)



图版 I 不同银离子浓度处理的嗜水气单胞菌和无乳链球菌的电镜图

1~2.  $\text{Ag}^+$ 未处理的嗜水气单胞菌, 5~6. 10 mg/L的 $\text{Ag}^+$ 处理后的嗜水气单胞菌, 9~10. 40 mg/L的 $\text{Ag}^+$ 处理后的嗜水气单胞菌, 3~4.  $\text{Ag}^+$ 未处理的无乳链球菌, 7~8. 10 mg/L的 $\text{Ag}^+$ 处理后的无乳链球菌, 10~11. 40 mg/L的 $\text{Ag}^+$ 处理后的无乳链球菌

**Plate I TEM of *A. hydrophila* and *S. agalactiae* treated with different concentrations of silver ions**

1-2. untreated *A. hydrophila*, 5-6. 10 mg/L  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila*, 9-10. 40 mg/L  $\text{Ag}^+$  treated *A. hydrophila*, 3-4. untreated *S. agalactiae*, 7-8. 10 mg/L  $\text{Ag}^+$  treated *S. agalactiae*, 11-12. 40 mg/L  $\text{Ag}^+$  treated *S. agalactiae*