



## 维生素 C 碳点对水产养殖主要病原菌的 抗菌性能及其生物相容性

何 稳, 田丹阳, 孔令娇, 菅攀阳,  
方 洁, 孙丙耀, 宋学宏\*

(苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

**摘要:** 为了验证维生素 C 碳点对水生动物病原菌的抑制效率, 实验采用 3 倍梯度稀释法检测了维生素 C 碳点对嗜水气单胞菌、副溶血性弧菌、灿烂弧菌、诺卡氏菌等 12 种常见水产病原菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC), 在此基础上, 测定了其对这 12 种水产病原菌的抑菌动力学曲线。此外, 基于纳米材料可能存在的生物相容性等问题, 实验采用 MTT 法检测了维生素 C 碳点对草鱼肾细胞的细胞毒性, 并以斑马鱼胚胎为测试对象, 测定其经维生素 C 碳点暴露后的胚胎毒性。结果显示, 维生素 C 碳点对所监测的 12 种水产病原菌均有显著的抑制作用, MIC 为 20.6~61.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 基本达到与抗生素氟苯尼考同等的抗菌作用。维生素 C 碳点在 MIC 范围内胚胎和细胞存活率可接近 100%, 与对照组无差异。研究表明, 维生素 C 碳点对水产主要病原菌有良好的杀菌和抗菌效果, 具有较好的生物相容性, 在水产养殖细菌性病害防治上具有潜在的开发应用前景。

**关键词:** 水产病原菌; 维生素 C 碳点; 抗菌性能; 生物相容性

**中图分类号:** S 942.2

**文献标志码:** A

随着国内水产养殖业高密度集约化养殖模式的不断推广<sup>[1]</sup>, 细菌性病害频发, 常导致养殖鱼类大量死亡, 养殖效益下降<sup>[2]</sup>。目前, 养殖水产中主要采取水体泼洒或口服抗生素类药物来预防和防治细菌性病害<sup>[3]</sup>。但是, 由于经济利益的驱动, 以及缺乏科学有效的监管措施, 水产养殖业抗生素滥用问题日益严峻<sup>[4-5]</sup>。抗生素滥用容易导致水体环境污染<sup>[6]</sup>、水产品抗生素残留<sup>[7]</sup>, 甚至通过食物链传递直接迁移至人体, 进而引发对抗生素耐药性等安全隐患<sup>[8]</sup>。因此, 寻找一种绿色有效的抗生素替代物势在必行。

研究表明, 金属纳米材料具有良好的抗菌性能, 主要包括以金纳米颗粒、银纳米颗粒为主的

金属单质纳米材料<sup>[9-10]</sup>和以二氧化钛、氧化锌、氧化铁为代表的金属氧化物纳米材料<sup>[11-13]</sup>, 这些金属纳米材料是通过自身大量产生活性氧 (ROS)<sup>[14]</sup>或者释放金属离子产生静电作用破坏细胞膜, 导致细胞内容物外泄以杀死细胞从而发挥抗菌作用<sup>[15]</sup>, 但是上述金属纳米材料在使用过程中会释放重金属离子, 由此导致的降解性差和各种二次污染等问题<sup>[7]</sup>限制了其实际生产应用。近年来, 新型复合纳米材料碳点 (carbon dots, CDs) 凭借其抗菌性能好, 生物相容性高的优点受到广泛关注。碳点主要是指以糖、柠檬酸和维生素 C 等有机小分子为碳源, 制备成主要成分为碳、氢、氧且粒径小于 10 nm 的新型荧光碳纳米材料<sup>[16]</sup>, 这种材

收稿日期: 2021-06-29 修回日期: 2021-10-09

资助项目: 国家自然科学基金 (31772896); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

第一作者: 何稳, 从事鱼类病害方面研究, E-mail: 15156172900@163.com

通信作者: 宋学宏 (照片), 从事鱼类病害方面研究, E-mail: songxh@suda.edu.cn



料有别于传统金属纳米材料, 可降解, 降解后的成分不会造成二次污染。且碳点制备方法简单, 相较于传统金属纳米材料而言原料易得, 更适用于生产应用。

目前, 有关碳点抗菌性能的研究主要集中在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等临床病原菌, 关于水产病原菌方面的研究甚少。此外, 碳点具体的生物相容性评估也主要集中在模式生物以及人源细胞上, 而关于水产动物的生物相容性还未知。因此, 本研究以 Li 等<sup>[17]</sup> 制备的维生素 C 碳点 (vitamin C-based CDs, V<sub>C</sub>-CDs) 为对象, 探究了其对 12 种主要水产病原菌的抗菌性能, 同时以草鱼肾组织细胞 (*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎为实验对象, 评估了维生素 C 碳点与草鱼、斑马鱼等硬骨鱼类的生物相容性, 旨在为碳点这一新型纳米材料在水产养殖行业的研制与开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

维生素 C 碳点由苏州大学医学部基础医学与生物科学学院黄健副教授课题组馈赠, 采用一步电化学法处理维生素 C 水溶液后合成, 电子显微镜和原子力显微镜显示维生素 C 碳点的平均尺寸约为 5 nm, 晶格间隔值为 0.21 nm<sup>[17]</sup>, 原液浓度为 5 mg/mL。

### 1.2 致病菌菌种、细胞和斑马鱼胚胎

本实验采用的水产养殖动物致病性指示菌包括嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌 (*A. veronii*)、温和气单胞菌 (*A. sobria*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*)、霍乱弧菌 (*V. cholerae*)、鳃弧菌 (*V. anguillarum*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、河流弧菌 (*V. fluvialis*) 和诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.), 由苏州大学药学院王义鹏教授课题组馈赠。CIK 细胞株由江苏省水生动物疫病预防控制中心提供, 本实验室保存。斑马鱼胚胎由苏州大学生物钟研究中心王晗教授馈赠。

### 1.3 维生素 C 碳点和氟苯尼考的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 测定

MIC 的测定采用梯度微量稀释法进行, 以

12 种水产养殖主要病原菌作为指示菌, 用 LB 液体培养基将维生素 C 碳点原液、氟苯尼考标准使用液 (上海阿拉丁科技股份有限公司) 按 3 倍梯度稀释, 得到 8 个不同浓度的稀释液, 将稀释液按每孔 295  $\mu$ L 加入 96 孔板中。然后取预先活化至对数生长期的菌液, 调整菌液浓度至  $6 \times 10^7$  CFU/mL, 按每孔 5  $\mu$ L 补加菌液使其终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。置于 28  $^{\circ}$ C 培养箱培养 36 h, 取 36 h 后能抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。从浓度高于 MIC 的各孔中取 100  $\mu$ L 均匀涂布到 LB 平板上, 28  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后以不长菌落平板所对应药物浓度为 MBC。

### 1.4 维生素 C 碳点抑菌动力学曲线

以 12 种水产致病菌作为指示菌, 过夜活化至对数期后调整菌液浓度至  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 再调整药物浓度指示菌对应的 MIC 和 MBC, 28  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养, 分别于 0、2、4、6、8、12 和 24 h 取样, 分光光度计 OD<sub>600</sub> 读值后绘制动力学曲线。

### 1.5 维生素 C 碳点的细胞毒性测定

采用 MTT 检测法测定维生素 C 碳点对 CIK 细胞的毒性。取培养于 1640 细胞培养基中处于对数生长期的 CIK 细胞, 用胰酶消化后调整细胞密度至  $5 \times 10^4$  个/mL, 按每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中, 并以不滴加细胞的 3 个孔用作调零, 细胞板置于 28  $^{\circ}$ C 生化培养箱中继续培养 12 h 至贴壁后吸除培养基。参照已有文献<sup>[17]</sup> 的研究结果, 以 900  $\mu$ g/mL 为起始浓度, 用培养基 3 倍稀释成不同浓度的维生素 C 碳点, 暴露胚胎 24 h, 并以细胞培养基为空白对照。利用细胞毒性检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 并依照说明书描述的实验步骤进行细胞毒性测定, 显色后在酶标仪上读取 OD<sub>490</sub> 值, 按公式计算细胞相对生长率 (relative growth rate, RGR, %):

$$RGR = \frac{\text{用药组 OD 值的平均值}}{\text{空白组 OD 值的平均值}} \times 100\%$$

### 1.6 维生素 C 碳点的胚胎毒性测定

在 28.5  $^{\circ}$ C 水温条件下, 斑马鱼卵发育至原肠胚期需约 10 h。因此, 本研究在显微镜下挑选发育至 12 hpf (hours post-fertilization) 的正常受精卵进行毒性测定实验。预实验发现, 5 mg/mL 的维生素 C 碳点原液短时间使斑马鱼胚胎全部死亡。因此, 用培养斑马鱼胚胎的 Holt 缓冲液按 3 倍浓

度梯度将原液稀释成7个不同浓度的稀释液。实验于12孔细胞培养板中进行,每孔20枚胚胎。设置7个药物处理组,每组3个重复孔,每孔加入3 mL稀释液。同时,以Holt缓冲液为空白对照组。将处理后的培养板置于生化培养箱中培养观察,温度设置为28.5 °C,光暗比为14:10。每4小时镜检1次,记录各组斑马鱼胚胎发育情况,统计胚胎孵化率和畸形率。

胚胎孵化率(%) = 孵化成幼鱼的胚胎数/胚胎总数 × 100%

畸形率(%) = (畸形数+死亡数)/胚胎总数 × 100%

### 1.7 数据分析

实验数据均以“平均值±标准差”表示;采用SPSS 22软件进行*t*检验,比较处理组与对照组之间的差异显著性,差异性水平用\*表示(\*.  $P < 0.05$ ; \*\*.  $P < 0.01$ ; \*\*\*.  $P < 0.001$ )。利用Origin 8.0和Prism软件进行数据绘图。

## 2 结果

### 2.1 维生素C碳点和氟苯尼考的抗菌性能

维生素C碳点对12种病原菌MIC与MBC的测定结果见表1。结果显示,维生素C碳点对灿烂弧菌、霍乱弧菌、鳗弧菌、河流弧菌的MIC和MBC值较高,分别为61.7和185.2 μg/mL,对其余8种水产致病菌的MIC和MBC值较低,分

别为20.6和61.7 μg/mL。

维生素C碳点的抑菌动力学曲线见图1,以上述12种病原指示菌经61.7 μg/mL维生素C碳点处理24 h后均未生长;经20.6 μg/mL维生素C碳点处理后,除灿烂弧菌、霍乱弧菌、鳗弧菌和河流弧菌外,其他均未生长,与MIC测定结果一致。而添加生理盐水的对照组菌液随着时间推移,OD<sub>600</sub>值不断升高。

### 2.2 维生素C碳点的生物相容性检测

不同浓度维生素C碳点处理24 h对CIK细胞的细胞毒性结果见图2,经900 μg/mL维生素C碳点处理后,细胞存活率仅为64.9%±3.1%,显著低于对照组( $P < 0.05$ ),表明该浓度的维生素C碳点产生一定的细胞毒性;当浓度降低到100 μg/mL时,细胞存活率为95.8%±2.9%,与对照组间无显著差异。

维生素C碳点对斑马鱼的胚胎毒性检测结果显示,当碳点浓度为1666.7 μg/mL时,大多数斑马鱼胚胎只能发育至体节期,死亡率高达85.0%±5.0%(表2)。碳点浓度为555.6 μg/mL时,胚胎可发育至咽囊期,51.7%±2.9%的胚胎停止发育。浓度下降至185.2 μg/mL时,有18.3%±7.6%停止在长-胸鳍期,碳点浓度低于61.7 μg/mL以下时,绝大多数能孵化出膜,只有低于5.0%的胚胎停止在胸鳍期、突口期。碳点浓度为1666.7 μg/mL时的斑马鱼孵化率为0,浓度为555.6 μg/mL时,只有

表1 维生素C碳点和氟苯尼考对12种水产病原菌的MIC和MBC  
Tab. 1 MIC and MBC of V<sub>C</sub>-CDs and florfenicol against 12 aquatic pathogenic bacteria μg/mL

病原菌 pathogenic bacterium	维生素C碳点 V <sub>C</sub> -CDs		氟苯尼考 florfenicol	
	最小抑菌浓度 MIC	最小杀菌浓度 MBC	最小抑菌浓度 MIC	最小杀菌浓度 MBC
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	20.6	61.7	20.6	61.7
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	20.6	61.7	20.6	61.7
温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>	20.6	61.7	20.6	61.7
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	20.6	61.7	61.7	185.2
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	20.6	61.7	61.7	185.2
灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	61.7	185.2	61.7	185.2
霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	61.7	185.2	20.6	61.7
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	61.7	185.2	61.7	185.2
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	20.6	61.7	20.6	61.7
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	20.6	61.7	61.7	185.2
河流弧菌 <i>V. fluvialis</i>	61.7	185.2	20.6	61.7
诺卡氏菌 <i>Nocardia</i> sp.	20.6	61.7	61.7	185.2

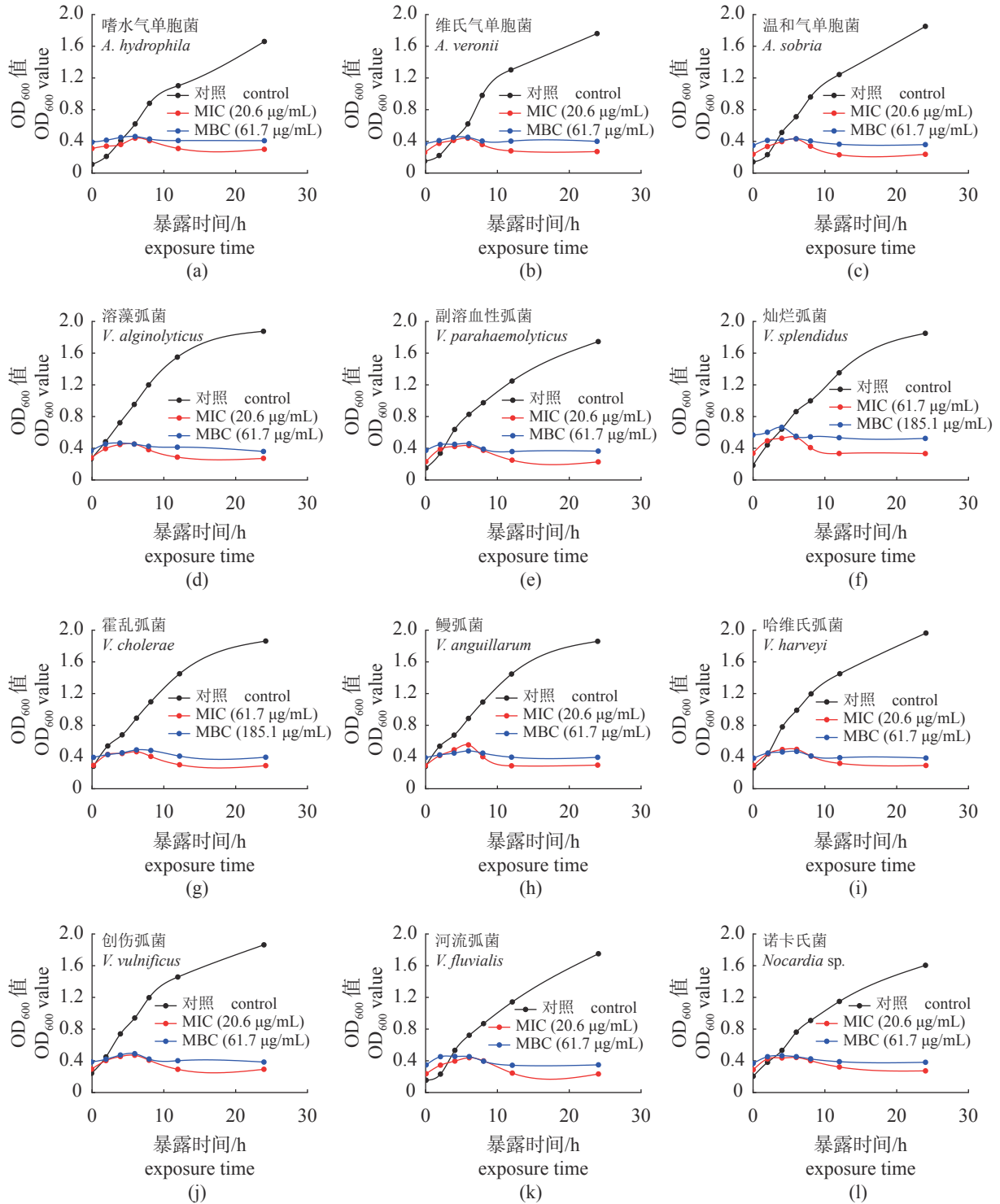


图 1 维生素 C 碳点对水生动物病原菌的抑菌动力学

Fig. 1 Antibacterial kinetics of VC-CDs against aquatic pathogenic bacteria

18.3%±5.8% 孵化出膜, 孵化率显著低于对照组 ( $P<0.05$ ) (图 3)。浓度为 185.2 μg/mL 时, 孵化率达到 81.7%±7.6%, 与对照组相比, 无显著差异。当浓度下降至 61.7 μg/mL 后, 孵化率与对照组基本一致。

经浓度为 555.6 μg/mL 的维生素 C 碳点暴露处理后, 斑马鱼孵化率显著低于对照组, 孵化出膜后的幼鱼尾鳍等处出现畸形 (图 4-a), 畸形率为 88.3%±2.9% (图 4-b)。处理浓度为 185.2 和 61.7 μg/mL 时, 畸形幼鱼与对照组无显著差异。更低



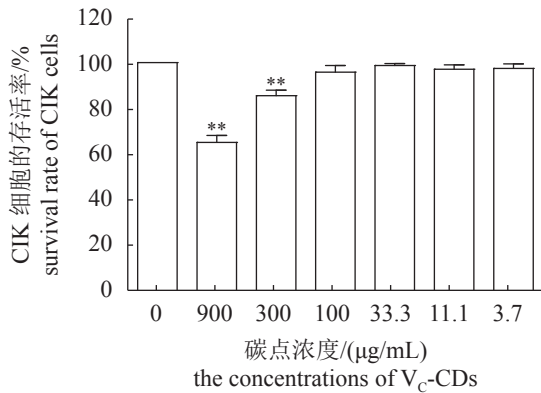


图2 不同浓度维生素C碳点暴露24 h后草鱼CIK细胞的存活率

\*\*表示  $P < 0.01$

Fig. 2 Survival rate of CIK cells after 24-h exposure to different concentrations of  $V_C$ -CDs

\*\* represents significant difference at  $P < 0.01$

表2 不同浓度维生素C碳点对斑马鱼胚胎发育的影响

Tab. 2 Effects of different concentrations of  $V_C$ -CDs on the embryonic development in *D. rerio*

碳点浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ ) concentration of $V_C$ -CDs	发育停滞期 arrested stage of development	发育停滞期的 胚胎形态 embryo morphology at arrested stage	发育停滞期 胚胎死亡率/% embryonic mortality at arrested stage
1 666.7	体节期		85.0±5.0
555.6	咽囊期		51.7±2.9
185.2	长-胸鳍期		18.3±7.6
61.7	胸鳍期		5.0±2.9
20.6	突口期		3.3±2.9

浓度维生素C碳点处理后,未见畸形鱼,与对照组一致。

### 3 讨论

碳点是一种具有巨大应用前景的新型纳米材料,凭借其粒径尺寸小、抗菌性能好和生物相容性高的优点,在生物医学领域的应用日益广泛<sup>[18]</sup>。但迄今为止,新型生物合成纳米碳点抗菌性能研究主要集中在金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等临床致病菌,对水产致病菌的抗菌性能检测还鲜见报

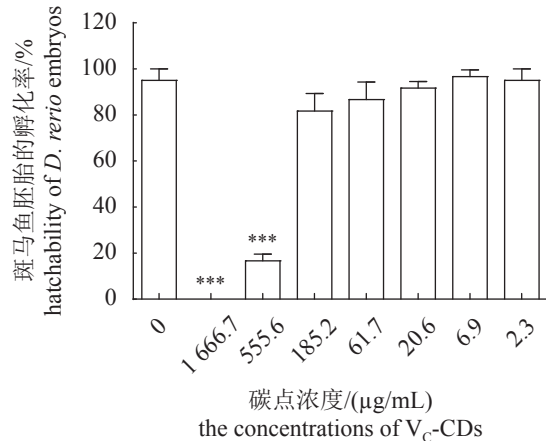


图3 维生素C碳点暴露对斑马鱼胚胎孵化率的影响

\*\*\*表示  $P < 0.001$ , 下同

Fig. 3 Effects of exposure to  $V_C$ -CDs on the hatchability of *D. rerio* embryos

\*\*\* represents significant difference at  $P < 0.001$ , the same below

道。本研究以12种主要水产致病菌为指示菌,对Li等<sup>[17]</sup>所制备的维生素C碳点进行抗菌性能测定。研究发现,维生素C碳点对嗜水气单胞菌的MIC为20.6  $\mu\text{g/mL}$ ,远低于Velmurugan等<sup>[19]</sup>用腰果壳液与金银合成的纳米材料对嗜水气单胞菌MIC的250  $\mu\text{g/mL}$ 。维生素C碳点对溶藻弧菌的MIC为63  $\mu\text{g/mL}$ ,远低于王丽红等<sup>[20]</sup>利用植物乳杆菌Lp21绿色合成的纳米硒及对溶藻弧菌MIC的286  $\mu\text{g/mL}$ 。且维生素C碳点对于革兰氏阳性菌诺卡氏菌的MIC也达到21  $\mu\text{g/mL}$ ,与革兰氏阴性菌嗜水气单胞菌基本一致,这说明维生素C碳点不受革兰氏阳性菌较厚的细胞壁影响,纳米金颗粒受革兰氏阳性菌细胞壁影响而不敏感<sup>[21]</sup>。这表明,维生素C碳点相较于传统金属纳米颗粒,具有更好的抗菌性能。此外,研究过程中还利用氟苯尼考作为对照,比较发现,维生素C碳点和氟苯尼考二者的抗菌性能相当,这表明维生素C碳点具有替代抗生素的潜力,有望缓解当下所面临的抗生素滥用等问题。但是,养殖水环境的离子强度、pH和温度可影响纳米材料的抗菌性能<sup>[22-23]</sup>。因此,维生素C碳点的实际生产应用还需要考虑养殖水体中以上因素带来的影响。

目前,关于碳点抗菌的确切机理还不清楚。有研究认为,碳点能够破坏细菌细胞壁,进而扰乱细菌DNA二级结构,从而达到杀灭细菌的效果<sup>[24-26]</sup>,这与本研究所使用维生素C碳点所报道<sup>[17]</sup>的抑菌机制一致。但是,de Lima等<sup>[27]</sup>在探究抗菌机制时还发现其也可使细胞膜出现穿孔,通过

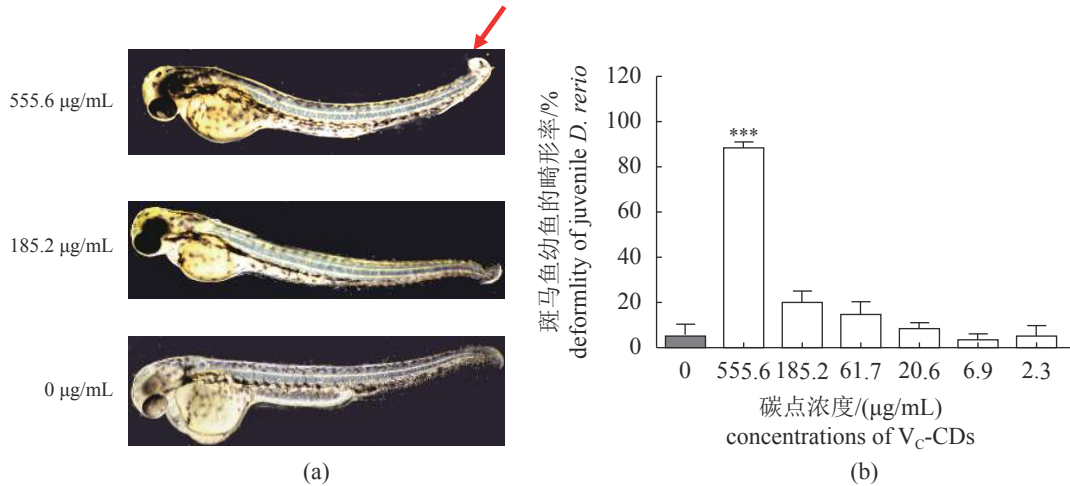


图 4 维生素 C 碳点暴露后的斑马鱼幼鱼畸形情况

(a) 高浓度维生素 C 碳点暴露后斑马鱼幼鱼的尾部弯曲 (箭头所指); (b) 不同浓度维生素 C 碳点暴露后的斑马鱼幼鱼畸形率

Fig. 4 Deformity observed in juvenile *D. rerio* after exposure to VC-CDs

(a) deformity of the curved tail (arrow) in juvenile *D. rerio* after exposure to high concentrations of VC-CDs; (b) the deformity rate of juvenile *D. rerio* after exposure to different concentrations of VC-CDs

细胞膜后到达细胞核, 与 DNA 相互作用, 引起细胞凋亡。所以, 纳米材料在作用浓度下的生物相容性问题在实际生产使用过程中不容忽视, 实验以草鱼 CIK 细胞和斑马鱼胚胎为对象, 发现暴露于 MIC 浓度的碳点时, CIK 细胞在 24 h 内安全性不受影响, 而斑马鱼胚胎在 72 h 内安全性无显著影响。此外, 有研究表明, 传统的金属或金属氧化物纳米颗粒在使用过程中会造成重金属离子污染, 对环境产生不良影响<sup>[28]</sup>, 这些金属离子甚至还会在动物体内迁移, 在肝脏、脾脏和肾脏等器官中逐渐积聚, 造成机体损伤<sup>[29]</sup>。与传统的合成技术不同, 本研究中所使用的维生素 C 碳点是利用植物维生素 C 水溶液采用一步法合成所得, 在可见光照射或常温条件下 20 d 可完全降解为 CO<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sup>[17]</sup>, 对环境和生物体几乎无影响, 绿色安全。

迄今为止, 碳点对水产病原菌的抗菌性能及其水生动物相容性的报道较少。本研究首次以维生素 C 碳点为对象, 测定了其对常见水产病原菌的抗菌性能及其对水生动物相容性, 这为碳点在水产养殖中的应用提供理论基础, 也可在养殖环境条件下进一步探究维生素 C 碳点的抗菌性能, 筛选出适宜的给药方式与剂量、开发绿色替抗产品、实现生产提供参考。

感谢苏州大学基础医学与生物科学学院黄健副教授提供维生素 C 碳点材料, 药学院王义鹏教

授提供病原菌, 生物钟研究中心王晗教授提供斑马鱼胚胎。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Cao L, Naylor R, Henriksson P, et al. China's aquaculture and the world's wild fisheries[J]. *Science*, 2015, 347(6218): 133-135.

[2] Liu X, Steele J C, Meng X Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 161-169.

[3] 陈昌福, 王玉堂. 水产养殖中抗生素类药物使用现状、问题与对策(连载二)[J]. *中国水产*, 2015(5): 48-50.

Chen C F, Wang Y T. The current situation, problems and countermeasures of the use of antibiotics in aquaculture (serial 2)[J]. *China Fisheries*, 2015(5): 48-50 (in Chinese).

[4] 肖倩. 水产养殖中抗生素滥用问题研究[J]. *养殖与饲料*, 2020, 19(10): 46-48.

Xiao Q. Study on the abuse of antibiotics in aquaculture[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2020, 19(10): 46-48 (in Chinese).

[5] 包樱钰, 李菲菲, 温东辉. 我国海水养殖业的抗生素污染现状[J]. *海洋环境科学*, 2021, 40(2): 294-302.

Bao Y Y, Li F F, Wen D H. Antibiotic contamination in mariculture in China[J]. *Marine Environmental Science*,

- 2021, 40(2): 294-302 (in Chinese).
- [6] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243-251.
- Zhou Q X, Luo Y, Wang M E. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: a review[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(3): 243-251 (in Chinese).
- [7] He X T, Deng M C, Wang Q, *et al.* Residues and health risk assessment of quinolones and sulfonamides in cultured fish from Pearl River Delta, China[J]. *Aquaculture*, 2016, 458: 38-46.
- [8] Zhang L, Gu J, Wang X J, *et al.* Fate of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during anaerobic co-digestion of Chinese medicinal herbal residues and swine manure[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 799-805.
- [9] 褚光宇, 陈云丰. 纳米金抗菌机制及应用研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(11): 1386-1390.
- Chu G Y, Chen Y F. Antibacterial mechanism and application of gold nanoparticles[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science Edition), 2018, 38(11): 1386-1390 (in Chinese).
- [10] 胡烈海, 朱新根, 余双, 等. 纳米银抗菌应用的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(8): 745-750.
- Hu L H, Zhu X G, Yu S, *et al.* Research progress in antibacterial application of nano-silver in antibacteria[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2020, 45(8): 745-750 (in Chinese).
- [11] 黄利强, 许昱, 郭松林. 纳米TiO<sub>2</sub>光催化杀灭水产病原菌的研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2010, 15(4): 254-257.
- Huang L Q, Xu Y, Guo S L. Disinfecting aquatic pathogenic bacteria by photocatalytic activity with nanometer TiO<sub>2</sub>[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2010, 15(4): 254-257 (in Chinese).
- [12] Mirhosseini M, Firouzabadi F B. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2013, 66(2): 291-295.
- [13] Baniamerian H, Safavi M, Alvarado-Morales M, *et al.* Photocatalytic inactivation of *Vibrio fischeri* using Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub>-based nanoparticles[J]. *Environmental Research*, 2018, 166: 497-506.
- [14] Wang D, Zhao L X, Ma H Y, *et al.* Quantitative analysis of reactive oxygen species photogenerated on metal oxide nanoparticles and their bacteria toxicity: the role of superoxide radicals[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(17): 10137-10145.
- [15] Stoimenov P K, Klinger R L, Marchin G L, *et al.* Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents[J]. *Langmuir*, 2002, 18(17): 6679-6686.
- [16] 颜范勇, 邹宇, 王猛, 等. 荧光碳点的制备及应用[J]. 化学进展, 2014, 26(1): 61-74.
- Yan F Y, Zou Y, Wang M, *et al.* Synthesis and application of the fluorescent carbon dots[J]. *Progress in Chemistry*, 2014, 26(1): 61-74 (in Chinese).
- [17] Li H, Huang J, Song Y X, *et al.* Degradable carbon dots with broad-spectrum antibacterial activity[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(32): 26936-26946.
- [18] Meng W X, Bai X, Wang B Y, *et al.* Biomass-derived carbon dots and their applications[J]. *Energy & Environmental Materials*, 2019, 2(3): 172-192.
- [19] Velmurugan P, Iydroose M, Lee S M, *et al.* Synthesis of silver and gold nanoparticles using cashew nut shell liquid and its antibacterial activity against fish pathogens[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2014, 54(2): 196-202.
- [20] 王丽红, 杨辉, 苏文, 等. 植物乳杆菌Lp21绿色合成纳米硒及对溶藻弧菌的抑菌活性[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 217-223.
- Wang L H, Yang H, Su W, *et al.* Biosynthesis and its antibacterial activity against *Vibrio alginolyticus* of nano-selenium by *Lactobacillus plantarum* Lp21[J]. *Food Science*, 2022, 43(2): 217-223 (in Chinese).
- [21] El-Sheekh M M, El-Kassas H Y. Algal production of nano-silver and gold: their antimicrobial and cytotoxic activities: a review[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2016, 14(2): 299-310.
- [22] Ahmed S, Ahmad M, Swami B L, *et al.* A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise[J]. *Journal of Advanced Research*, 2016, 7(1): 17-28.
- [23] Gora S L, Andrews S A. Adsorption of natural organic matter and disinfection byproduct precursors from surface water onto TiO<sub>2</sub> nanoparticles: pH effects, isotherm modelling and implications for using TiO<sub>2</sub> for drinking

- water treatment[J]. *Chemosphere*, 2017, 174: 363-370.
- [24] 封琦, 孟娜, 赵言世, 等. 绿色合成纳米银材料的制备及其对水产病原菌的抗菌效果测定[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 1201-1208.
- Feng Q, Meng N, Zhao Y S, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal effects against aquaculture pathogens[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1201-1208 (in Chinese).
- [25] 赵光强, 黄云超, 李光剑, 等. 纳米二氧化硅在人支气管上皮细胞内的亚细胞分布和遗传毒性[J]. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(3): 117-124.
- Zhao G Q, Huang Y C, Li G J, *et al.* Subcellular distribution and genotoxicity of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2013, 16(3): 117-124 (in Chinese).
- [26] Nagy A, Harrison A, Sabbani S, *et al.* Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6: 1833-1852.
- [27] de Lima R, Seabra A B, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2012, 32(11): 867-879.
- [28] 刘晨艳, 闫凯, 马建中. 碳点及其纳米复合材料抗菌性能的研究进展[J]. *化工新型材料*, 2022, 50(1): 56-61.
- Liu C Y, Yan K, Ma J Z. Research progress on antibacterial properties of carbon quantum dots and their nanocomposites[J]. *New Chemical Materials*, 2022, 50(1): 56-61 (in Chinese).
- [29] 陈安伟, 曾光明, 陈桂秋, 等. 金属纳米材料的生物毒性效应研究进展[J]. *环境化学*, 2014, 33(4): 568-575.
- Chen A W, Zeng G M, Chen G Q, *et al.* Advance in research on toxicity of metal nanomaterials[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(4): 568-575 (in Chinese).



## Antibacterial activity of vitamin C-based carbon dots against main pathogenic bacteria in aquaculture and its biocompatibility

HE Wen, TIAN Danyang, KONG Lingjiao, JIAN Panyang,  
FANG Jie, SUN Bingyao, SONG Xuehong\*

(School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Vitamin C-based carbon dots are a new class of nanomaterials with antibacterial properties, but their antibacterial activities against aquatic pathogenic bacteria have not been verified. For this reason, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of V<sub>C</sub>-CDs against 12 aquatic pathogenic bacteria such as *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. splendens* and *Nocardia* sp. were determined using 3-fold serial dilutions. The bacteriostatic kinetic curves of the 12 aquatic pathogens were determined. In addition, based on the potential biocompatibility of nano materials, we used MTT method to detect the cytotoxicity of V<sub>C</sub>-CDs on CIK cells. *Danio rerio* embryos were used as test objects to determine the embryotoxicity after exposure to V<sub>C</sub>-CDs. The results showed that V<sub>C</sub>-CDs had significant inhibitory effect on 12 aquatic pathogenic bacteria, and the minimum inhibitory concentrations ranged from 20.6 to 61.7 μg/mL, basically reaching the same antibacterial effect as the antibiotic florfenicol. The survival rate of zebrafish embryos and CIK cells was almost 100% in the range of MIC. This study shows that V<sub>C</sub>-CDs have good bactericidal and antibacterial effects on the main pathogenic bacteria in aquaculture, and have good biocompatibility, which signifies the potential as a promising alternative to antibiotics in the prevention and control of bacterial diseases in aquaculture.

**Key words:** aquatic pathogenic bacteria; vitamin C-based carbon dots; antibacterial property; biocompatibility

**Corresponding author:** SONG Xuehong. E-mail: songxh@suda.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31772896); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions