

王 帆, 张添菊, 王兴娜, 等. 麝香草酚对单增李斯特菌的抑制作用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1402-1407.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.029

麝香草酚对单增李斯特菌的抑制作用

王 帆¹, 张添菊^{1,2}, 王兴娜¹, 周 涛², 李春阳¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 为开发以麝香草酚为主要成分的新型抑菌剂。采用微量肉汤稀释法测定麝香草酚对单增李斯特菌的最小抑制浓度和最小致死浓度分别为 156.25 $\mu\text{g/ml}$ 和 312.50 $\mu\text{g/ml}$ 。通过扫描电镜观察发现, 经过麝香草酚处理后单增李斯特菌细胞出现穿孔式膜损伤。进一步研究结果表明, 麝香草酚分别处理 1 h、2 h 和 3 h 后, 单增李斯特菌胞外的碱性磷酸酶、葡萄糖和核酸含量显著高于对照。SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 麝香草酚处理 6 h 后单增李斯特菌胞内蛋白含量降低, 说明麝香草酚处理使得单增李斯特菌细胞通透性增加, 导致细胞内的物质流失到细胞外。碘化丙啶 (PI) 染色结合倒置荧光显微镜观察结果显示, 麝香草酚处理造成了单增李斯特菌细胞膜的破损, 并最终导致菌体细胞死亡。

关键词: 麝香草酚; 单增李斯特菌; 作用机制

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1402-06

Inhibitory effect of thymol against *Listeria monocytogenes*

WANG Fan¹, ZHANG Tian-ju^{1,2}, WANG Xing-na¹, ZHOU Tao², LI Chun-yang¹

(1. Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The inhibitory effect of thymol against *Listeria monocytogenes* was investigated in this study. The minimum inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration of thymol were 156.25 $\mu\text{g/ml}$ and 312.50 $\mu\text{g/ml}$ respectively determined by micro broth dilution method. Scanning electron microscopic observation revealed that the surface structure of thymol-treated *L. monocytogenes* was damaged. Extracellular contents of alkaline phosphatase, glucose and DNA from *L. monocytogenes* were significantly higher than those of control after treated with thymol for 1–3 h. The SDS-PAGE pattern of intracellular soluble proteins of *L. monocytogenes* was shallow after thymol treatment for 6 h, suggesting that thymol caused the increase of membrane permeability and the leakage of intracellular substances from *L. monocytogenes*. Observation under inverted fluorescence microscope after PI stain indicated that thymol induced the membrane damage and cell death of *L. monocytogenes*.

Key words: thymol; *Listeria monocytogenes*; mechanism

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*,

简称单增李斯特菌) 是一种人畜共患的食源性致病菌, 该菌广泛存在于动植物性食品原料中, 可通过食物链进入人体肠道内, 侵入肠道上皮细胞, 并随血液循环进行传播, 进而引发败血症、脑膜炎以及孕妇流产等, 其致死率高达 20%~30%^[1], 被世界卫生组织列为食品中的四大致病菌之一。单增李斯特菌可在低温 (0~4 $^{\circ}\text{C}$) 环境下生长繁殖, 是冷藏食品以及即

收稿日期: 2017-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NSF31401615)

作者简介: 王 帆 (1983-), 女, 江苏南京人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为食品微生物。 (E-mail) wangfan713@126.com

通讯作者: 李春阳, (E-mail) lichunyang968@126.com; 王兴娜, (E-mail) xingnawang.nn@163.com

食食品(RTE)中威胁人类健康的重要病原菌^[2-3],其感染案例呈现出逐年递增的情况,引起各国的高度关注^[4-5]。目前已有的防控单增李斯特菌的措施中,化学方法在快速杀菌的同时也存在安全隐患,如化学药物残留于食品中对人体造成危害,长期使用可诱导单增李斯特菌产生耐药性并通过食物链传播。因此,开发安全高效的新型杀菌剂替代传统化学杀菌剂来防控单增李斯特菌的污染是食品安全中亟待解决的问题。

麝香草酚(Thymol,又名5-甲基-2-异丙基酚),是一种单萜酚,主要存在于唇形科百里植物中,是百里香属植物挥发油的主要成分^[6]。麝香草酚对食源性致病菌表现出较好的抑制效果,且与其他食源性致病菌相比,单增李斯特菌对麝香草酚具有更高的敏感性^[7-8]。本研究拟探索麝香草酚高效抑制单增李斯特菌的作用机制,以期开发以麝香草酚为主要成分的新型抑菌剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和试剂

单增李斯特菌由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供,脑心浸液(BHI)肉汤培养基由北京陆桥技术股份有限公司提供,麝香草酚由国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 菌液和药液制备

将甘油冷冻保藏的单增李斯特菌接种于灭菌的BHI肉汤培养基中,37℃培养16 h增菌至对数期,以BHI肉汤培养基校正菌液浓度至 1×10^7 CFU/ml,4℃冰箱保存备用。以二甲基亚砜作溶剂将麝香草酚配置成浓度为10 000 μg/ml的母液。

1.3 单增李斯特菌对麝香草酚的敏感性测定

采用微量肉汤稀释法^[9]测定麝香草酚对单增李斯特菌的最小抑制浓度和最小致死浓度。在96孔板上将浓度为10 000.00 μg/ml的麝香草酚用BHI肉汤培养基进行2倍梯度稀释,使药液的浓度范围为19.53~2 500.00 μg/ml,菌液浓度为 1×10^7 CFU/ml,37℃培养24 h。根据微生物的生长情况,按药液浓度从低到高,第一个出现不浑浊的,即为麝香草酚对该菌的最小抑制浓度(MIC)。在无浑浊的微孔中接种50 μl培养液涂布于BHI琼脂培养基上,37℃培养24 h,按药液浓度从低到高,第一个完全无细菌生长的,即为麝香草酚对该菌的最小致死

浓度(MBC)。

1.4 麝香草酚对单增李斯特菌形态学的影响

参照 Bajpai 等的方法^[10]采用扫描电镜观察药剂处理后单增李斯特菌形态的变化,初始浓度为 1×10^7 CFU/ml的对数期单增李斯特菌,加入终浓度分别为MIC和MBC的麝香草酚,以不含麝香草酚的菌液为对照,37℃、120 r/min处理6 h。菌悬液用磷酸缓冲液(0.1 mol/ml, pH 7.4)洗涤3次,离心收集菌体并加入2.5%戊二醛,4℃过夜固定。固定后的菌体采用梯度浓度(30.0%、50.0%、70.0%、90.0%、100.0%)乙醇溶液脱水,叔丁醇置换乙醇后镀膜,置于扫描电镜下观察并拍照。

1.5 麝香草酚对单增李斯特菌细胞通透性的影响

参照 Zhang 等的方法^[11]通过测定麝香草酚处理单增李斯特菌后其胞外碱性磷酸酶、葡萄糖以及核酸含量的变化,判断麝香草酚对病原菌细胞通透性的影响。对数期单增李斯特菌于4℃条件下3 500 r/min离心10 min收集菌体,用灭菌磷酸缓冲液(0.1 mol/ml, pH 7.4)洗涤3次并调整初始浓度为 1×10^7 CFU/ml,加入终浓度分别为MIC和MBC的麝香草酚,以不含麝香草酚的菌液为对照,置于37℃下,120 r/min培养。分别于0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h取样,3 500 r/min离心10 min,取上清液测定胞外葡萄糖、碱性磷酸酶和核酸的含量变化。碱性磷酸酶和葡萄糖的含量分别采用南京建成生物工程研究所提供的A059-1和F006试剂盒进行测定,核酸含量采用紫外分光光度计于260 nm测定吸光度值。

1.6 麝香草酚对单增李斯特菌细胞蛋白的影响

参照 Zhang 等方法^[11],对数期单增李斯特菌于4℃条件下3 500 r/min离心10 min收集菌体,用灭菌磷酸缓冲液(0.1 mol/ml, pH 7.4)洗涤3次并调整初始浓度为 1×10^7 CFU/ml,加入终浓度分别为MIC和MBC的麝香草酚,以不含麝香草酚的菌液为对照,37℃、120 r/min培养。取培养6 h菌悬液洗涤离心收集菌体,经细胞破碎仪(400 W、10 min)破碎后采用SDS-PAGE电泳测定蛋白质含量的变化。分离胶与浓缩胶浓度分别为12%和4%,采用稳压电泳,起始电压为60 V,样品进入分离胶后电压转变为120 V,使用考马斯亮蓝R-250染色过夜。通过蛋白质标准品的条带相对位置确定相对分子质量,对比得到蛋白质样品的相对分子质量及其损失蛋白的相对分子质量范围。

1.7 单增李斯特菌细胞死亡的测定

参照 Yan 等的方法^[12]采用碘化丙啶(PI)染色结合倒置荧光显微镜鉴定菌体细胞的死亡情况。对数期单增李斯特菌于 4 ℃ 条件下 3 500 r/min 离心 10 min 收集菌体,用灭菌磷酸缓冲液(0.1 mol/ml, pH 7.4)洗涤 3 次并调整初始浓度为 1×10^7 CFU/ml,加入终浓度分别为 MIC 和 MBC 的麝香草酚,以不含麝香草酚的菌液为对照,37 ℃、120 r/min 处理 6 h。菌悬液样品加入 PI 荧光探针(终浓度 2.0 μg/ml)室温避光装载 30 min,取 10 μl 菌液制片于倒置荧光显微镜下观察并拍照(激发波长 535 nm,发射波长 615 nm)。

1.8 数据处理与分析

所有试验均进行 3 次重复,数据表示为平均值±标准差。应用 SPSS 17.0 软件对试验结果进行显著性和相关性分析,采用 Origin 8.5 软件作图。

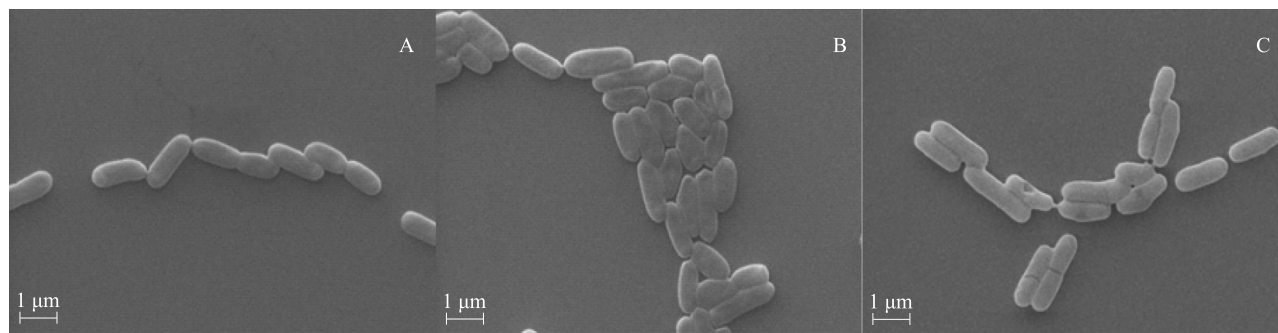
2 结果与分析

2.1 单增李斯特菌对麝香草酚的敏感性测定

采用微量肉汤稀释法测定麝香草酚对单增李斯特菌的最小抑制浓度和最小致死浓度。药液的浓度范围为 19.53~2 500.00 μg/ml 时,麝香草酚对单增李斯特菌表现出了抑制活性,对单增李斯特菌的最小抑制浓度(MIC)为 156.25 μg/ml,最小致死浓度(MBC)为 312.50 μg/ml。

2.2 麝香草酚对单增李斯特菌形态学的影响

麝香草酚对单增李斯特菌形态学的影响如图 1 显示,正常单增李斯特菌菌体饱满,表面光滑,细胞之间的界限清晰。经过 MIC 的麝香草酚处理 6 h 后,单增李斯特菌细胞表面出现褶皱,有膜损伤的迹象,细胞之间的界限变得模糊。经过 MBC 的麝香草酚处理 6 h 后,单增李斯特菌细胞表面出现凹陷和穿孔,部分细胞发生断裂。



A: 正常单增李斯特菌; B: 经 MIC 麝香草酚处理 6 h 的单增李斯特菌; C: 经 MBC 麝香草酚处理 6 h 的单增李斯特菌。

图 1 麝香草酚对单增李斯特菌形态学的影响

Fig.1 Effect of thymol on the morphological character of *Listeria monocytogenes*

2.3 麝香草酚对单增李斯特菌细胞通透性的影响

麝香草酚对单增李斯特菌胞外碱性磷酸酶、葡萄糖和核酸含量的影响分别如图 2、图 3 和图 4。碱性磷酸酶(AKP)是存在于细菌细胞壁与细胞膜间的 1 种酶,正常情况下在胞外不能检测到其活性,但当细胞遭到破坏后,AKP 会随着细胞通透性的增加而泄漏到细胞外,导致菌悬液中酶活性升高。核酸含有嘌呤、嘧啶碱基,这些结构中的共轭双键在紫外光区 260 nm 附近有最大吸收峰,因此可通过测定菌悬液 260 nm 处的紫外吸收强度来确定细胞内核酸物质的泄漏情况。通过测定细胞外碱性磷酸酶、葡萄糖和核酸的含量变化来判断药剂对病原菌细胞通透

性的影响,结果表明,经麝香草酚分别处理 1 h、2 h 和 3 h 后,单增李斯特菌胞外的碱性磷酸酶、葡萄糖和核酸含量显著高于对照($P < 0.05$),且随着处理时间的延长和处理药剂浓度的增加,其含量逐渐升高。说明麝香草酚处理使得单增李斯特菌细胞的通透性增加,进而导致细胞内的物质流失到细胞外,首先是细胞壁与细胞膜间的碱性磷酸酶渗出,其次是细胞内分子量较小的葡萄糖,最后是分子量较大的核酸。

2.4 麝香草酚对单增李斯特菌细胞蛋白的影响

麝香草酚对单增李斯特菌细胞蛋白的影响如图 5 显示,对分子量在 15 000~170 000 的单增李斯特菌细胞蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果表明,对

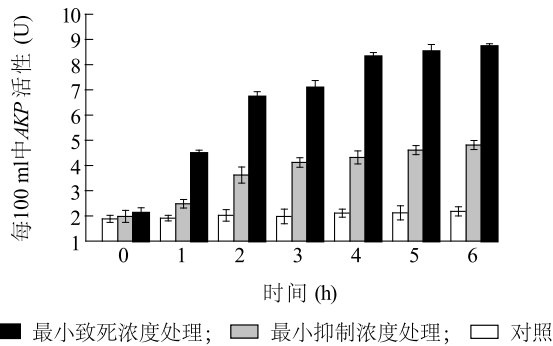


图2 麝香草酚对单增李斯特菌胞外碱性磷酸酶含量的影响

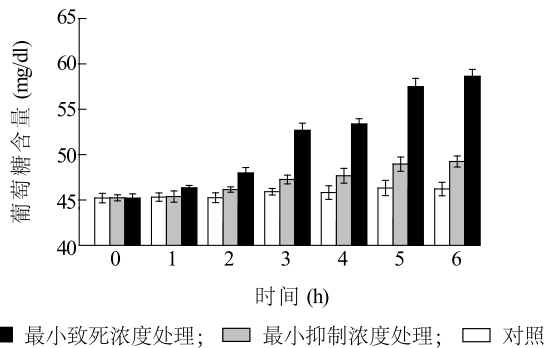
Fig.2 Effect of thymol on the extracellular activity of alkaline phosphatase of *L. monocytogenes*

图3 麝香草酚对单增李斯特菌胞外葡萄糖含量的影响

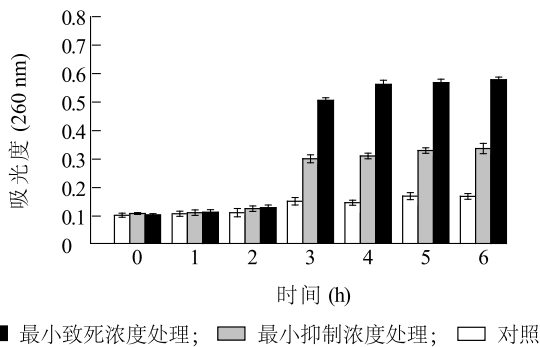
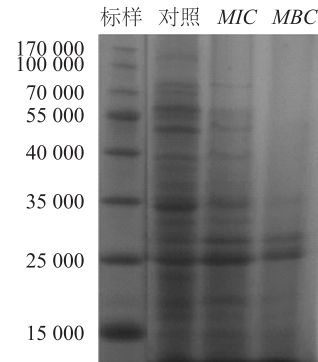
Fig.3 Effect of thymol on the extracellular concentration of glucose of *L. monocytogenes*

图4 麝香草酚对单增李斯特菌胞外核酸含量的影响

Fig.4 Effect of thymol on the extracellular quantity of DNA of *L. monocytogenes*

照的单增李斯特菌蛋白电泳条带清晰,经 MIC 麝香草酚处理 6 h 后,单增李斯特菌的电泳条带明显变浅,随着处理药剂浓度的增大,部分条带逐渐消失。说明麝香草酚处理使得单增李斯特菌胞内蛋白表达

量降低,也反映出由于细胞膜通透性增大导致细胞内蛋白质流失到细胞外,这与碱性磷酸酶、葡萄糖和核酸的结果一致。



MIC:最小抑制浓度处理;MBC:最小致死浓度处理。

图5 麝香草酚对单增李斯特菌细胞蛋白的影响

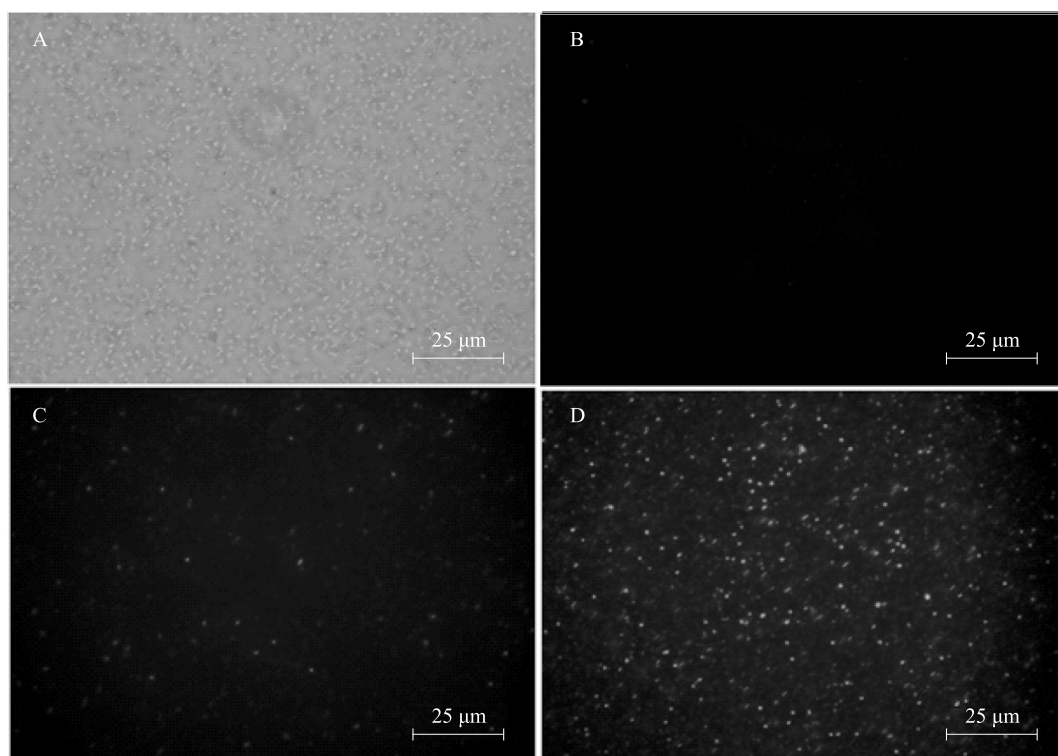
Fig.5 Effect of thymol on the SDS-PAGE patterns of intracellular soluble proteins of *L. monocytogenes*

2.5 麝香草酚对单增李斯特菌细胞的致死作用

单增李斯特菌 PI 染色结果如图 6 显示。PI 能够进入死亡细胞破损的细胞膜并结合核酸发出红色荧光,却不能通过活细胞膜,因此 PI 染色程度可以反映细胞膜的破损程度和细胞死亡程度^[13-14]。对照的单增李斯特菌在倒置荧光显微镜下没有检测到荧光,麝香草酚处理 6 h 后,单增李斯特菌细胞内部出现了红色荧光染色,且随着药剂浓度增大,荧光亮度增强。这表明麝香草酚处理的确造成了单增李斯特菌细胞膜的破损,并最终导致菌体细胞死亡。

3 讨论

本研究初步探索了麝香草酚对单增李斯特菌的抑制作用。采用微量肉汤稀释法测定麝香草酚对单增李斯特菌的最小抑制浓度和最小致死浓度分别为 156.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 312.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。通过扫描电镜观察麝香草酚对单增李斯特菌形态学的影响,发现经过麝香草酚处理 6 h 后,单增李斯特菌细胞出现凹陷和穿孔。进一步研究了麝香草酚对单增李斯特菌细胞通透性的影响,麝香草酚分别处理 1 h、2 h 和 3 h 后,单增李斯特菌胞外的碱性磷酸酶、葡萄糖和核酸含量显著高于对照。对单增李斯特菌细胞蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果表明,麝香草酚处理 6 h 后单增李斯特菌胞内蛋白含量降低。以上结果反映



A, B: 光学显微镜和荧光显微镜下正常单增李斯特菌; C: 经 MIC 麝香草酚处理 6 h 的单增李斯特菌; D: 经 MBC 麝香草酚处理 6 h 的单增李斯特菌。

图 6 单增李斯特菌细胞死亡 PI 染色

Fig.6 Cell viability of *L. monocytogenes* by PI stain

出麝香草酚处理使得单增李斯特菌细胞通透性增加,导致细胞内的物质流失到细胞外。单增李斯特菌 PI 染色结果显示,麝香草酚处理 6 h 后的单增李斯特菌细胞内部出现了红色荧光染色,说明麝香草酚处理造成了单增李斯特菌细胞膜的破损,并最终导致菌体细胞死亡。

综上所述,麝香草酚可对单增李斯特菌造成穿孔式膜损伤,使得单增李斯特菌细胞通透性增加,细胞不能维持正常的渗透压,细胞内的物质流失到细胞外,失去生长繁殖所需的葡萄糖、蛋白质和遗传物质,导致细菌无法正常生长而死亡,这可能是由化合物的亲脂活性使细菌细胞膜上脂类物质受到破坏导致的^[15]。麝香草酚抑制单增李斯特菌的作用机制还有待继续研究和探讨。

参考文献:

[1] HAIN T, CHATTERJEE S S, GHAI R, et al. Pathogenomics of *Listeria* spp [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(7): 541-557.

[2] FARBER J M, PETERKIN P I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen [J]. Microbiological Reviews, 1991, 55(3): 476-511.

[3] 张 帅, 齐颖颖, 张红星, 等. 快速检测生鲜肉中的三种食源性致病菌 [J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 939-945.

[4] FENG Y F, WU S Y, VARMA J K, et al. Systematic review of human listeriosis in China, 1964-2010 [J]. Tropical Medicine & International Health, 2013, 18(10): 1248-1256.

[5] BUCHANAN R L, GORRIS L G M, HAYMAN M M, et al. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments [J]. Food Control, 2017, 75: 1-13.

[6] BENSMIRA M, JIANG B, NSABIMANA C, et al. Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance to frying temperatures [J]. Food Research International, 2007, 40(3): 341-346.

[7] BURT S A, VAN DER ZEE R, KOETS A P, et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4484-4490.

[8] 王 帆, 杨静东, 王春梅, 等. 复配植物源杀菌剂的开发研究 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(2): 87-89.

- [9] COSENTINO S, TUBEROSO C I G, PISANO B, et al. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils[J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 29: 130-135.
- [10] BAJPAI V K, SHARMA A, BAEK K H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens [J]. Food Control, 2013, 32(2): 582-590.
- [11] ZHANG X H, WANG Z, YIN B, et al. A complex of trypsin and chymotrypsin effectively inhibited growth of pathogenic bacteria inducing cow mastitis and showed synergistic antibacterial activity with antibiotics[J]. Livestock Science, 2016, 188: 25-36.
- [12] YAN F L, DANG Q F, LIU C S, et al. 3,6-*O*-[*N*-(2-Aminoethyl)-acetamide-yl]-chitosan exerts antibacterial activity by a membrane damage mechanism [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 149: 102-111.
- [13] MANSILLA A Y, ALBERTENGO L, RODRIGUEZ M S, et al. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15): 6957-6966.
- [14] NOVO D J, PERLMUTTER N G, HUNT R H, et al. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(4): 827-834.
- [15] SEGVIC KLARIĆ M, KOSALEC I, MASTELIĆ J, et al. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44: 36-42.

(责任编辑:王 妮)