

丁香酚对水产品中普罗威登斯菌的抑制作用

Inhibitory effect of eugenol on *Providencia vermicola* in aquatic products

图尔荪阿依·图尔贡^{1,2} 王帆² 付龙龙³

TURSUNAY · Turgun^{1,2} WANG Fan² FU Long-long³

努尔古丽·热合曼¹ 刘小莉²

NURGUL · Rahman¹ LIU Xiao-li²

(1. 新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 3. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

(1. School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing, Jiangsu 210014, China; 3. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210017, China)

摘要:以从自然腐败变质的香辣蟹中分离鉴定的一株普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*)为对象,研究丁香酚对其抑菌作用及其机理。结果表明,丁香酚对普罗威登斯菌的最小抑菌浓度为0.25 mg/mL,与对照组相比,最小抑菌浓度剂量的丁香酚处理条件下,普罗威登斯菌菌体严重变形,出现大量的褶皱,胞内物质流出,胞外可溶性蛋白含量提高,苹果酸脱氢酶(MDH)和琥珀酸脱氢酶(SDH)酶活分别降低了33.01%,19.81%。表明丁香酚可以通过破坏普罗威登斯菌细胞壁,改变细胞膜通透性,引起细菌胞内物质泄露,以及细菌正常新陈代谢失调等作用,从而抑制普罗威登斯菌正常生长繁殖,发挥抑菌活性。

关键词:丁香酚;普罗威登斯菌;抑菌活性;水产保鲜

Abstract: The inhibitory activity of eugenol was evaluated on *Providencia vermicola*, which is a strain isolated from spoiled spicy crab product. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.25 mg/mL. Compared with the control group, the cells of *P. vermicola* treated with MIC eugenol were severely deformed, and wrinkles appeared. The cell wall of *P. vermicola* treated with eugenol was destroyed, leading

to the leakage of intracellular substances and higher extracellular soluble protein content. The enzyme activities of malic acid dehydrogenase (MDH) and succinate dehydrogenase (SDH) were reduced by 33.01% and 19.81%, respectively. The normal metabolic system of bacteria is dysfunctional, and thus inhibit the growth and reproduction of *P. vermicola*.

Keywords: eugenol; *Providencia vermicola*; antibacterial activity; aquatic product preservation

普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*)是一类能够导致食品腐败变质的革兰氏阴性腐败菌,属于肠道杆菌科,为条件致病菌,广泛存在于土壤、水体、食品中,不仅影响食品质量安全,还会引起人体腹泻、肠道内微感染、尿道感染等^[1-2]。何鹏晖等^[3]发现普罗威登斯菌在腐败发酵蔬菜中具有产酸特性。施荷等^[4]研究表明,冷却鹿肉贮藏初期会产生普罗威登斯菌,且在贮藏中期活力逐渐增强,是冷却鹿肉贮藏末期的优势菌属。黄佳奇^[5]研究表明,不同包装条件下小黄鱼表面优势腐败菌差异较大,普罗威登斯菌是空气包装小黄鱼的优势腐败菌之一。课题组^[6]从自然腐败的香辣蟹样品中分离鉴定出一株普罗威登斯菌,且食品工业中常用的化学防腐剂如苯甲酸钠、山梨酸钾等,以及生物保鲜剂乳酸链球菌素(Nisin)对该菌没有抑制作用。

丁香酚(Eugenol)是一种热稳定性好、毒性较低、不易残留的天然香料。作为丁香精油的主要成分,丁香酚对导致食品腐败的多种细菌和真菌具有较强抑制作用^[7-8],如金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、福氏痢疾杆菌、鼠伤寒沙门菌、大肠埃希菌、李斯特菌、沙克乳酸杆

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目(编号: CX[19]2031);江苏省现代渔业产业技术体系(编号: JFRS-01);江苏省重点研发项目(现代农业)(编号: BE2019303)

作者简介:图尔荪阿依·图尔贡,女,新疆师范大学在读硕士研究生。

通信作者:刘小莉(1981—),女,江苏省农业科学院农产品加工研究所研究员,博士。E-mail: liuxljaas@hotmail.com

收稿日期:2020-04-23

菌、大肠杆菌、沙门氏菌等细菌以及根霉菌、链格孢菌、灰霉菌等,因而常被用于食品的防腐保鲜^[9-11]。试验拟以前期从香辣蟹样品优势腐败菌中分离的普罗威登斯菌作为指示菌,研究并探讨丁香酚对普罗威登斯菌的抑制效果及抑菌机理,为后续丁香酚应用于水产保鲜提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普罗威登斯菌:从自然腐败的香辣蟹样品中分离鉴定,菌株编号 XLX5,16S rDNA 序列结果提交至 GenBank 核酸数据库得到 Accession number 为 KC456588,保藏于江苏省农业科学院农产品加工研究所食品生物工程研究室;

丁香精油:丁香酚含量 85%,批号 2017030102,用乙醇溶解并配成有效浓度为 1 mg/mL 母液,江西金源天然香料有限公司;

乳酸链球菌素(Nisin)、山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖、苹果酸脱氢酶(MDH)酶活测定试剂盒、琥珀酸脱氢酶(SDH)酶活测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白浓度测定试剂盒:南京建成生物试剂有限公司;

BCA 蛋白浓度测定试剂盒:南京天为生物科技有限公司;

营养肉汤培养基:北京奥博星生物有限责任公司。

1.2 仪器与设备

酶标仪:Epoch 型,美国 Biotech 公司;

扫描电子显微镜:MERLIN 型,德国 ZEISS 公司;

日立透射电镜:HT7700 型,日本 Hitachi 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 普罗威登斯菌悬浮液的制备 将 *P. vermicola* 接种于无菌营养肉汤培养基中,37 °C,150 r/min 下活化培养 24 h,用新鲜无菌营养肉汤培养基调整菌悬液细菌浓度为 1×10^7 CFU/mL,备用。

1.3.2 体外抑菌试验 采用平板孔扩散法初步测定抗菌活性。按 1%接种量将活化好的 *P. vermicola* 菌悬液接种至无菌营养肉汤固体培养基中,倒平板。待培养基冷凝后,用直径为 7 mm 的打孔器于平板上均匀打出 3 个孔,分别吸取 50 μ L 1 mg/mL 丁香酚、Nisin、山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖注入孔中,37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈大小,重复 3 次取平均值^[12]。

1.3.3 丁香酚最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)测定 根据文献^[13]确定丁香酚最小抑菌浓度(MIC)。将丁香酚用无菌营养肉汤液体培养基稀释至终浓度分别为 1.000,0.500,0.250,0.125,0.063,0.031 mg/mL,备用。向 96 孔板中分别加入 100 μ L 不同浓度的丁香酚稀释液,再加入 100 μ L 菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 的 *P. vermicola* 菌悬液。分别设置阴性对照(100 μ L 菌悬浮

液+100 μ L 营养肉汤)和空白对照(200 μ L 营养肉汤),37 °C 培养 24 h。以阴性对照中 *P. vermicola* 生长呈浑浊和空白对照透明为前提,其他孔内培养物浑浊情况判断最小抑菌浓度。从 96 孔板中取样液浑浊度明显减少的丁香酚溶液,涂布接种至无菌的固体营养肉汤平板中,37 °C 培养 24 h,未见菌落生长的为最低杀菌浓度(MBC),重复 3 次。

1.3.4 丁香酚对菌体的处理 取 96 微孔板,每孔加入 100 μ L 菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液及 100 μ L 丁香酚溶液,丁香酚溶液终浓度分别为 1 MIC、2 MIC。分别设置阴性对照(100 μ L 菌悬液+100 μ L 营养肉汤)和空白对照(200 μ L 营养肉汤),于 37 °C、150 r/min 摇床培养 24 h。

1.3.5 丁香酚对菌体生长曲线的影响 取 96 微孔板,每孔加入 100 μ L 菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液及 100 μ L 丁香酚,丁香酚终浓度分别为 1 MIC、2 MIC。分别设置阴性对照(100 μ L 菌悬液+100 μ L 营养肉汤)和空白对照(200 μ L 营养肉汤),置于 37 °C 培养箱静止培养。每 2 h 用酶标仪测定 620 nm 处 OD 值,重复 3 次取平均值。

1.3.6 丁香酚对普罗威登斯菌形态的影响

(1) 样品前处理:将 1.3.4 中培养物于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。以磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L, pH 7.0)洗涤菌体 3 次。所得菌体置于 4 °C、2.5%戊二醛中过夜固定。固定好的细菌用 pH 7.0 磷酸缓冲液漂洗 3 次,每次静置 10 min,除去戊二醛。

(2) 扫描电镜观察:将 1.3.6(1)样品依次置于 30%,50%,70%,80%,90%,100%的乙醇中脱水置换,每次 15 min。脱水后临界点干燥,将干燥的菌体固定至金属台上,用离子溅射仪对喷金、镀膜,采用扫描电子显微镜进行观察。

(3) 透射电镜观察:将 1.3.6(1)样品置于 1%四氧化锇中固定 3 h;除去固定剂的样品分别经体积分数为 50%,70%,80%,90%,100%的乙醇脱水,每次 15 min,继续用 100%丙酮溶液脱水 3 次,用 Epon812 固定剂进行包埋,超薄切片,经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,采用透射电子显微镜进行观察和图像采集。

1.3.7 丁香酚对普罗威登斯菌内容物泄露的影响 取 96 微孔板,每孔加入 100 μ L 菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液及 100 μ L 丁香酚溶液,丁香酚溶液终浓度分别为 0.5 MIC、1.0 MIC、2.0 MIC。分别设置阴性对照(100 μ L 菌悬液+100 μ L 营养肉汤)和空白对照(200 μ L 营养肉汤),于 37 °C、150 r/min 摇床培养 24 h。将丁香酚处理组和空白对照组培养物于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min。取上清分别测定 260,280 nm 处 OD 值。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定上清液中可溶性蛋白含量。

1.3.8 菌体内苹果酸脱氢酶(MDH)酶活和琥珀酸脱氢酶(SDH)酶活变化 将收集的对数期 *P. vermicola* 用 0.75% 生理盐水洗涤重悬为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液,添加丁香酚使其终浓度为 1 MIC,未添加丁香酚作为空白对照,于 37 °C、150 r/min 振荡培养 24 h。取菌悬液 10 000 r/min 低温离心 10 min,收集菌体,并用 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液洗涤 3 次,每组试验平行 3 次。加入与菌体等体积的 2 mg/mL 的溶菌酶溶液,搅拌均匀,37 °C 水浴 15 min 后,迅速冰浴,加入等体积的 0.1 mol/L SDS Tris-HCl(pH 9.0)缓冲液,10 000 r/min 低温离心 15 min,取上清液备用。按试剂盒说明书方法进行 MDH、SDH 酶活检测。

1.4 数据分析

采用 SPSS 软件整理数据并进行方差分析和差异显著性检验($P < 0.05$),采用 OriginPro 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 体外抑菌试验

抑菌试验结果显示,丁香酚处理组透明抑菌圈可达 (21.6 ± 0.3) mm,抑菌作用显著。壳聚糖处理组可延缓 *P. vermicola* 生长,但不能完全抑制,表现为平板上出现模糊的抑菌圈;Nisin、山梨酸钾、苯甲酸钠处理组均没有出现透明抑菌圈,说明三者对 *P. vermicola* 没有抑菌活性。当丁香酚浓度 > 0.25 mg/mL 时,*P. vermicola* 处理组孔内培养物比阴性对照组清澈,由此确定最低抑菌浓度为 0.25 mg/mL;当丁香酚浓度为 0.5 mg/mL 时,平板上没有菌落生长,故最低杀菌浓度为 0.5 mg/mL。

2.2 生长曲线

由图 1 可知,对照组的 OD 值在 8 h 内显著升高,进入对数生长期($P < 0.05$)。与对照组(CK)相比,0.5, 1.0 MIC 丁香酚处理组分别于 20, 18 h 后进入对数生长期且菌体生长速度明显延迟于对照组,而 2.0 MIC 组的 OD 值几乎没有增加。这表明丁香酚可以抑制 *P. vermicola* 的生长并延迟细菌对数期的生长时间。

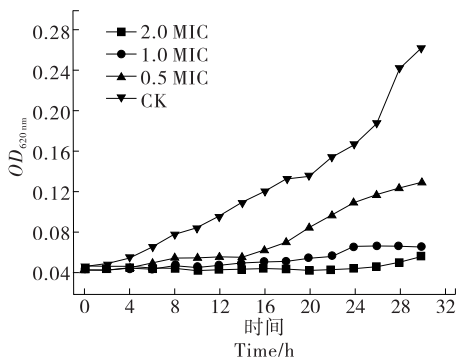


图 1 丁香酚对普罗威登斯菌生长曲线影响
Figure 1 Effect of eugenol on the growth curve of *P. vermicola*

2.3 丁香酚对普罗威登斯菌形态的影响

2.3.1 扫描电镜 由图 2 可知,与对照组相比,丁香酚处理 *P. vermicola* 菌体表面发现皱纹、菌体不饱满、缺乏充盈感,少量细胞出现损坏,菌体表面粗糙、不光滑,菌体周边呈现明显的内容物泄漏。

2.3.2 透射电镜图 由图 3 可知,未经丁香酚处理的 *P. vermicola* 细胞饱满,有完整的细胞结构,细胞大小均一且形状规则,细胞壁、细胞膜和核区层次分明且清晰可见,细胞质、内容物分布均匀且充实致密,细胞核紧实并且均匀分布于细胞中间。而经丁香酚处理后,菌体细胞开始出现皱褶,细胞质出现不集中,细胞壁分解不明显,细胞壁和细胞膜变薄,边界不清晰,质壁之间出现小的间断,有小的空白区,细胞质含量减少并且分布不均,核区分布逐渐分散,聚拢并且边聚,出现小的空洞。

2.4 内容物泄漏

细胞壁和细胞膜具有保护细菌的作用,是细菌正常生长的基本保障。细菌壁膜系统一旦遭到破坏,会造成分布于细菌内部的许多重要生物大分子如:核酸、蛋白质、糖类等的流出,影响细菌合成代谢功能。通过测定渗漏至细胞外相关生物大分子含量变化,可以反映细菌壁膜系统的完整性^[14]。嘌呤环和嘧啶环中均含有共轭双键,核酸在 260 nm 处对紫外线有最大吸收值;氨基酸中含有共轭双键的色氨酸、酪氨酸的最大吸收峰在紫外线 280 nm 处,因此 $OD_{260\text{ nm}}$ 、 $OD_{280\text{ nm}}$ 值可反映菌体内核酸和蛋白质物质泄漏情况。

由图 4 可知,与对照组相比,经不同浓度丁香酚处理 18 h 后,普罗威登斯菌培养物上清液 $OD_{260\text{ nm}}$ 、 $OD_{280\text{ nm}}$ 值

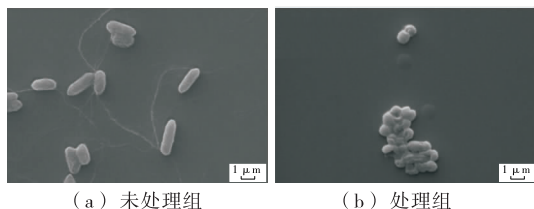


图 2 普罗威登斯菌扫描电镜图

Figure 2 Scanned electron micrograph of *P. vermicola*

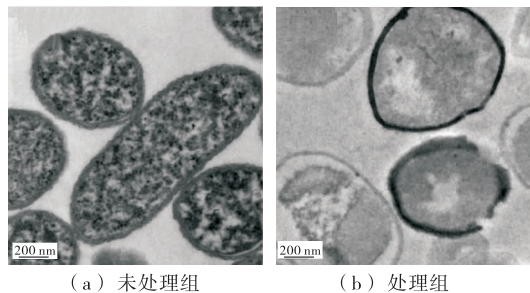


图 3 普罗威登斯菌透射电镜图

Figure 3 Transmission electron micrograph of *P. vermicola*

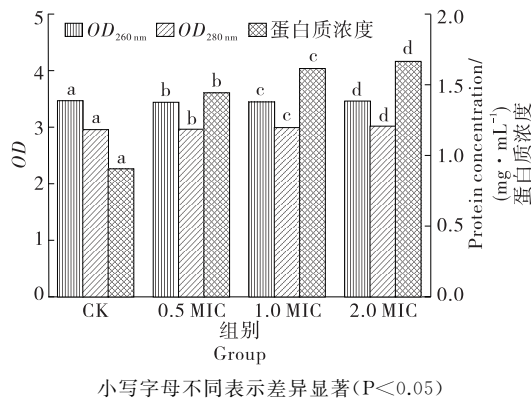


图 4 丁香酚引起普罗威登斯菌内容物泄漏

Figure 4 Leakage of the intracellular substances of *P. vermicola* caused by eugenol

以及可溶性蛋白含量均不同程度增加,2.0 MIC 丁香酚处理后 OD 值以及蛋白含量显著增加 ($P<0.05$),说明丁香酚能够作用于 *P. vermicola* 的壁膜系统,导致细菌壁膜系统遭到损伤,造成细胞内大分子物质外流。

2.5 苹果酸脱氢酶 (MDH) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH) 酶活变化

由表 1 可知,与对照组相比,*P. vermicola* 丁香酚处理组 MDH 和 SDH 酶活均显著下降,其作用机理可能是丁香酚影响 MDH 和 SDH 的分子结构,使其发生变化,改变构象,降低酶活性^[15]。由此可推断,丁香酚通过降低 MDH 和 SDH 酶活力,破坏细胞的能量代谢途径,抑制 *P. vermicola* 生长。

表 1 丁香酚对普罗威登斯菌 MDH 和 SDH 酶活的影响[†]

Table 1 Effect of eugenol on MDH activity and SDH activity of *P. vermicola* U/mL

组别	SDH 酶活力	MDH 酶活力
对照组	3.420 6±0.024 ^a	9.902 2±0.430 ^a
处理组	1.129 3±0.837 ^b	1.961 6±1.165 ^b

[†] 小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。

3 结论

以一株分离自水产品中的普罗威登斯菌为研究对象,研究丁香酚对其的抑菌效果。结果表明,丁香酚对普罗威登斯菌有一定的抑制作用,且抑制效果具有剂量依赖性,最低抑制浓度为 0.25 mg/mL。丁香酚促使普罗威登斯菌菌体严重变形,破坏菌体的完整性,使胞内物质泄漏,胞外可溶性蛋白含量提高,引起细胞内部渗透压不稳定,进而影响细菌胞内生理生化反应,以及胞内维持细胞正常生长代谢相关的酶类,如苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶酶活的降低,从而表现出抑菌特性。丁香酚对水产

品中普罗威登斯菌抑菌效果显著,其抑菌机理与影响细菌细胞壁、细胞膜的通透性和完整性,干扰细菌生理代谢活动有关。后期可开展丁香酚在香辣蟹产品中应用相关研究。

参考文献

[1] 石磊,梁思思,岛绫香,等. 食源性普罗威登斯菌的分离鉴定和耐药性研究[J]. 现代食品科技, 2014(6): 24-29.

[2] 周玲,罗晓,钟安朴,等. 司徒氏普罗威登斯氏菌致肛周脓肿及败血症一例报告[J]. 遵义医学院学报, 2011, 34(6): 654-655.

[3] 何鹏晖,钱杨,王猛,等. 腐败发酵蔬菜中产膜细菌的分离鉴定及其生长特性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 99-104.

[4] 施荷,胡铁军,秦凤贤,等. 真空包装冷却鹿肉贮藏过程中的菌相变化[J]. 肉类研究, 2015, 29(4): 15-19.

[5] 黄佳奇. 小黄鱼优势腐败菌的分离鉴定及其与品质的相关性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 12-19.

[6] 图尔荪阿依·图尔贡,葛达娥,潘建林,等. 香辣蟹中特征性腐败菌的分离鉴定以及香料的抑制作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 107-112.

[7] 张杰,张双全. 抗真菌肽对真菌作用机制研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005(1): 13-17.

[8] TIPPAYATUM P, CHONHENCHOB V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria[J]. Kasetsart J (Nat Sci), 2007, 41: 319-323.

[9] 刘万臣. 丁香精油抗菌性、抗氧化活性及其对果蔬贮藏效果的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008: 26-35.

[10] MICHIELS J, MISSOTTEN J, FREMAUT D, et al. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora[J]. Live-stock Science, 2007, 109(1/2/3): 157-160.

[11] 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): 189-194.

[12] KONG Bao-hua, WANG Jin-zhi, XIONG You-ling. Anti-microbial activity of several herb and spice extracts in culture medium and in vacuum-packaged pork[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(3): 641-647.

[13] 王莹莹,付小宝,于聪,等. 6 味中草药及配伍方剂提取物对 3 株大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 饲料博览, 2013(4): 49-51.

[14] 朱亚珠,林森森. 复合保鲜剂对腐生葡萄球菌的抑菌活性及其作用机理[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 158-162.

[15] 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, 36(8): 136-139.