

小肠炎耶尔森菌天然抑菌剂的

快速筛选

陈默^{1,3}, 胡长鹰², 王志伟^{1,3,*}, 吴希阳², 魏华琳²

(1.江南大学包装工程系, 江苏无锡 214122;

2.暨南大学食品系, 广东广州 510632;

3.暨南大学包装工程研究所, 广东珠海 519070)

摘要:在96孔板中培养后利用酶标仪测定了天然酚类物质香兰素、异丁香酚、丁香酚、麝香草酚、愈创木酚存在下小肠炎耶尔森菌的光密度(OD)值,并绘制了相应的OD-t生长曲线,该测定方法具有快速、高通量、准确的优点。受试菌生长曲线表明:一定浓度的天然酚类物质对受试菌种有不同程度的抑制作用,其大小顺序为:异丁香酚>麝香草酚>丁香酚>香兰素>愈创木酚,对受试菌的最低抑菌浓度分别为660、1180、1280、1380、2040mg/L。

关键词:小肠炎耶尔森菌,天然酚类物质,抗菌活性,生长曲线,快速筛选

Rapid screening of antimicrobial activity of natural phenolic compounds on *Yersinia*

CHEN Mo^{1,3}, HU Chang-ying², WANG Zhi-wei^{1,3,*}, WU Xi-yang², WEI Hua-lin²

(1.Department of Packaging Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

3.Packaging Engineering Institute, Zhuhai College, Jinan University, Zhuhai 519070, China)

Abstract: The Microplate Reader was used to detect the antimicrobial activity of vanilla, eugenol, isoeugenol, thymol and guaiacol against *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) in a sterile 96-well microtitre plate. The growth curves of tested bacteria indicated that extracts and natural products exhibits certain antimicrobial effect against *Y. enterocolitica*, with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 660, 1180, 1280, 1380, 2040mg/L, respectively. This method was proved to be economical, rapid and effective for detecting the efficiency of antimicrobial.

Key words: *Yersinia enterocolitica*; natural phenolic products; antimicrobial activity; growth curve; rapid screening

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0112-03

小肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*, *Y. enterocolitica*) 是近年来新发现的一种食源性病原菌, 美国人 Mclver 和 Pike^[1] 在 1934 年首先对该菌作了描述, 五年后 Schleifstein 和 Coleman^[2] 从肠炎病人身上初次分离到该致病菌, 1964 年丹麦微生物学家 Frederiksen^[3] 总结了前人研究成果, 将该菌命名为小肠炎耶尔森菌。该菌天然寄生于多种家禽、家畜及鼠、兔肠道中, 主要通过排泄物污染食物, 并能在冷藏温度下继续生长。肠炎耶尔森菌是腹泻较为常见的病因之一, 它除引起胃肠道症状外, 还能引起呼

吸系统、心血管系统、骨骼结缔组织疾患, 甚至引起败血症, 造成死亡, 20 世纪 80 年代以来受到国际社会的广泛关注, 很多国家都已将该菌列为进出口食品的常规检测项目。香荚兰、丁香花蕾、肉桂叶、桂皮、薄荷科等植物中存在一定量的香兰素、丁香酚、异丁香酚、麝香草酚和愈创木酚等天然酚类物质, 它们具有一定的香气, 常被添加到化妆品和食品中以增香。近年来陆续有人将该类物质用作抑菌剂和抗氧化剂^[4-7], 由于它们来源于植物, 具有安全可靠的优点, 是一类理想的天然抑菌剂。探讨 *Y. enterocolitica* 在含香兰素、丁香酚、异丁香酚、麝香草酚和愈创木酚时的生长规律, 可为 *Y. enterocolitica* 天然抑菌剂的筛选和应用提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小肠炎耶尔森菌 (*Y. enterocolitica* CMCC

收稿日期: 2009-03-03 * 通讯联系人

作者简介: 陈默(1977-), 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 食品安全, 食品与药品包装。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(07005952); 珠海市科技计划项目(PB20051013)。

52218) 由暨南大学食品系微生物实验室提供; 香兰素、丁香酚、异丁香酚、麝香草酚、愈创木酚 纯度 >98%, 购于广州大漠化工有限公司; 营养肉汤、营养琼脂 (B.R.) 购于广东环凯微生物科技有限公司。

YSQ.SGH.280 型手提式压力蒸汽灭菌锅 上海华线医用核子仪器有限公司; SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司; MK3 酶标仪 热电(上海)有限公司; Spectrumlab22pc 型可见分光光度计 上海棱光技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 称取 18.00g 营养肉汤 (NB-牛肉膏:蛋白胨:氯化钠 = 3:10:5)、45g 营养琼脂 (NA-牛肉膏:蛋白胨:氯化钠:琼脂 = 3:10:5:15), 分别于 1000mL 蒸馏水中, 加热充分溶解, 分装后置于压力蒸汽灭菌锅内, 121℃ 灭菌 20min。无菌条件下, 将斜面保藏的菌种在培养箱中连续转接两次。取活化后的新鲜菌液离心, 弃去营养肉汤, 加入适量的生理盐水, 并依次做 10 倍梯度稀释, 取浓度为 10^8 cfu/mL 的菌悬液备用。

1.2.2 抑菌剂对受试菌的抑菌圈实验 将 100μL 浓度为 10^8 cfu/mL 的 *Y. enterocolitica* 菌悬液于 100mL NB 培养液中, 取 100μL 该菌悬液涂布于营养琼脂平板上, 将用抗菌剂含量为 1500、2000、2500、3000mg/L 溶液浸泡过的滤纸片分区域贴于 NA 平板上, 26℃ 下培养 24h, 观察菌落生长情况。

1.2.3 抑菌剂存在下 *Y. enterocolitica* 菌生长曲线的测定 同 1.2.1 方法配制受试菌浓度为 10^5 cfu/mL 丁香酚-NB 菌悬液, 从中各取 250μL 于 96 孔板上, 用酶标仪在 $\lambda = 630\text{nm}$ 下测定其 OD 值。测定后将酶标板置于 26℃ 培养箱中摇床培养, 每隔一段时间 (1~2h) 测定并记录菌悬液的 OD 值, 直至细菌生长达到稳定期^[8-10]。用同样方法测定系列浓度香兰素-NB 菌悬液、异丁香酚-NB 菌悬液、麝香草酚-NB 菌悬液和愈创木酚-NB 菌悬液的 OD₆₃₀ 随培养时间变化情况, 并绘制 OD₆₃₀-t 生长曲线。

1.2.4 抑菌剂最低抑菌浓度的确定 将 26℃ 培养 24h 后的菌液, 进行 10 倍梯度稀释, 未加抗菌剂的培养液分别稀释 5~7 次, 加抗菌剂的培养液稀释 2~4 次; 然后取 100μL 稀释液涂布于 NA 平板上, 26℃ 培养 24~48h, 计数并计算抑菌率^[11-12], 公式如下:

$$R(\%) = (B - C) / B \times 100\%$$

式中: R 为抗菌率(%); B 为空白对照的平均菌浓度 (cfu/mL); C 为不同抗菌剂含量的平均菌浓度 (cfu/mL)。

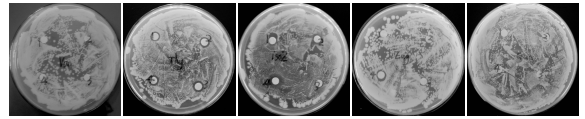
2 结果与讨论

2.1 抑菌圈的测定

实验首先采用抑菌圈初步考察了香兰素、丁香酚、异丁香酚、麝香草酚和愈创木酚对小肠肠炎耶尔森菌的抑制效果。

图 1a~图 1e 中, 数字 1~4 分别代表用浓度为 1500、2000、2500、3000mg/L 抑菌剂溶液浸泡过的滤纸片编号, 从图 1 可以看出, 香兰素、丁香酚、异丁香

酚、麝香草酚和愈创木酚直接接触 *Y. enterocolitica* 菌苔培养后, 在含有低浓度抑菌剂的滤纸片周围长满菌, 随着滤纸片中抗菌剂含量的增大, 滤纸片周围的菌量逐渐减少, 其中出现明显抑菌圈的是丁香酚、异丁香酚、麝香草酚滤纸片。通过贴滤纸片实验可判定各天然酚类抑菌剂对 *Y. enterocolitica* 具有不同程度的抑菌作用, 丁香酚、异丁香酚、麝香草酚强于香兰素和愈创木酚。



a. 香兰素 b. 麝香草酚 c. 异丁香酚 d. 丁香酚 e. 愈创木酚

图 1 香兰素、丁香酚、异丁香酚、麝香草酚

和愈创木酚对受试菌的抑菌圈

2.2 不同浓度抑菌剂对受试菌生长曲线的影响

Y. enterocolitica 菌直接在 96 孔板中培养, 同一板上可同时放置 96 个样本, 所以该法具有准确、快速和高通量的优点。由受试菌生长曲线(图 2)可看出, 实验选用的天然酚类抗菌剂对小肠肠炎耶尔森菌都有一定的抑制作用, 稳定期的 OD₆₃₀ 值与空白对照相比逐渐降低, 而且酚类物质浓度越大, 抑制作用越明显。同时也可看出, 香兰素、丁香酚、异丁香酚、麝香草酚和愈创木酚之间抑菌效果存在差异。其中香兰素和愈创木酚随浓度增大, 延滞期未见明显变化, 而耶尔森菌的延滞期在一定浓度麝香草酚、异丁香酚和丁香酚中明显变长(大约 20h), 延滞期后含低浓度抑菌剂的耶尔森菌仍会以较快的速度增长, 其原因可能是小浓度的麝香草酚、异丁香酚和丁香酚会被细菌慢慢消耗掉, 从而造成细菌的重新生长。

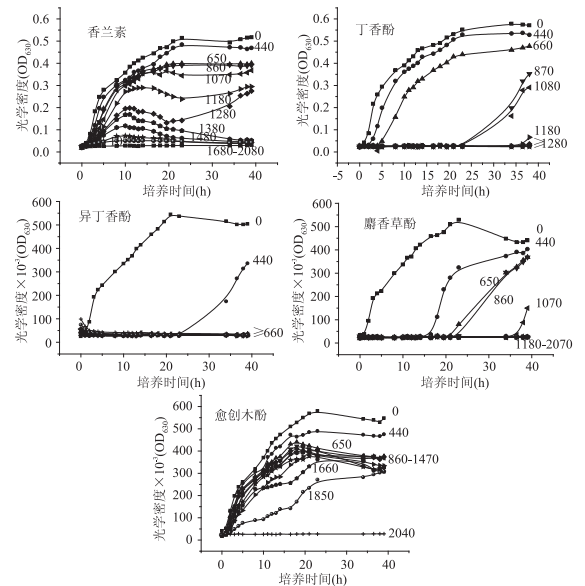


图 2 不同浓度 (mg/L) 酚类抑菌剂对小肠肠炎耶尔森菌生长曲线的影响

2.3 最低抑菌浓度

为考察 OD-t 生长曲线反应细菌生长情况的准确性, 实验对培养 24h 后抑菌剂-NB 菌悬液进行平板计数或者稀释后平板计数, 发现 24h 后各菌悬液 (下转第 223 页)

论值 2.48% 相比,其相对误差约为 1.6%,可见采用响应面分析法得到的微波辅助提取工艺条件准确可靠,具有实用价值。

3 结论

以滇桂艾纳香多糖提取率为量化指标,在单因素实验的基础上探索了用响应面法确定微波辅助提取滇桂艾纳香多糖的最佳提取工艺参数的可行性。确定最佳工艺条件为:提取时间 11.0min,温度 75.0℃,水料比 37:1,在此工艺条件下,滇桂艾纳香多糖提取率为 2.44%。

参考文献

[1] 中国植物志编委会.中国植物志(75卷)[M].北京:科学出版社,1979:13.
 [2] 孙香灵.妇血康冲剂用于药物流产后阴道流血116例体会[J].现代中西医综合杂志,2004,13(3):365.

[3] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准[M].第二册.1996:274-278.
 [4] 徐怀德.天然产物提取工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2006:51-52.
 [5] 龚盛照,杨卓如.微波辅助提取黄芪多糖的工艺研究[J].华南理工大学学报:自然科学版,2004,32(8):93-96.
 [6] 张维杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994:13-16.
 [7] 郭卫东,张晓文.硫酸-苯酚法测定枸杞胶囊中多糖的含量[J].内蒙古中医药,2003(6):39.
 [8] 李亚娜,林永成,余志刚.响应面分析法优化羊菜多糖的提取工艺[J].华南理工大学学报:自然科学版,2004,32(11):28.
 [9] 孟春玲,王建中,王丰俊,等.响应面法优化超声波辅助提取沙棘籽油的工艺研究[J].北京林业大学学报,2008,30(5):118-122.

(上接第 113 页)

表 1 24h 后受试菌无明显增长的各天然酚类物质的抑菌率

抑菌剂	空白对照	香兰素	异丁香酚	丁香酚	麝香草酚	愈创木酚
抑菌剂浓度(mg/L)	0	1380	660	1280	1180	2040
起始菌量(cfu/mL)	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
培养 24h 后菌量(cfu/mL)	1.17 × 10 ¹⁰	3.6 × 10 ³	86	371	460	7.5 × 10 ⁴
抑菌率(%)	0	99	99	99	99	99

中的活菌数目与实验测得 OD 值的变化规律相一致。虽然起始菌量相同,但含不同浓度同种抑菌剂的菌悬液中菌量随抑菌剂浓度的增大而降低。等浓度的不同抑菌剂-菌悬液中的菌量也是不同的,愈创木酚中菌量最大,其次是香兰素、丁香酚和麝香草酚,异丁香酚菌量最少。菌悬液 OD 值无变化时,所选酚类物质对受试菌的抑菌率均能达到 99% (见表 1)。由实验 OD-t 生长曲线和活菌计数最终确定异丁香酚、麝香草酚、丁香酚、香兰素、愈创木酚对受试菌的最低抑菌浓度分别是 660、1180、1280、1380、2040mg/L。当酚类物质浓度高于其 MIC 时,小肠肠炎耶尔森菌均未见明显生长。

3 结论

3.1 酶标仪法测生长曲线既能很快地筛选出对某微生物有较好抑制作用的抑菌剂,又能直观地测得各抑菌剂的最低抑菌浓度。

3.2 天然酚类物质对小肠肠炎耶尔森菌普遍具有抑制作用,表现为异丁香酚 > 麝香草酚 > 丁香酚 > 香兰素 > 愈创木酚,其最低抑菌浓度分别是 660、1180、1280、1380、2040mg/L。而且异丁香酚、麝香草酚和丁香酚中受试菌的延滞期显著长于香兰素和愈创木酚。

参考文献

[1] McIver M A, Pike R M. Chronic glanders-like infection of face caused by an organism resembling *Flavobacterium pseudomallei* [J]. Whitmore Clinical miscellany, 1934, 1: 16-21.
 [2] Schleifstein J, Coleman M B. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Past. pseudotuberculosis* and pathogenic for man [J]. NY State J M, 1939, 39: 1749-1753.
 [3] Frederiksen W. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*

-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*) // Proceedings of the 14th Scandinavian Congress on Pathology and Microbiology [C]. Oslo, Norway, 1964: 103-104.
 [4] Seydim A C, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils [J]. Food Research International, 2006, 39: 639-644.
 [5] 刘程. 食品添加剂实用大全 [M]. 北京: 工业大学出版社, 2001: 683-684.
 [6] Chang C W, Chang W L, Chang S T, et al. Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila* [J]. Water Research, 2008, 42: 278-286.
 [7] Kotzekidou P, Giannakidis P, Boulamatsis A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate [J]. LWT, 2008, 41: 119-127.
 [8] Li Y, Frank P, Bentley W E. Conditioned medium from *Listeria innocua* stimulates emergence from a resting state: not a response to *E. coli* quorum sensing autoinducer AI-2 [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22: 387-393.
 [9] Neora Pick, Scott Cameron, Dorit Arad, et al. Screening of Compounds Toxicity against Human Monocytic cell line-THP-1 by Flow Cytometry [J]. Biol Proced Online, 2004, 6: 220-225.
 [10] Delvigne F, Destain J, Thonart P. Toward a Stochastic Formulation of Microbial Growth in Relation to Bioreactor Performances; Case Study of an *E. coli* Fed-Batch Process [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22: 1114-1124.
 [11] 张智维, 周庆礼. 香兰素对细菌抑制作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 23-25.
 [12] GB/T4789.2-2003. 食品微生物学检验: 菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.