

芳樟醇诱导肠炎沙门氏菌进入活的不可培养状态的研究

卢梓荧, 陈梓涵, 何欣忆, 符蓉, 周晓蓝, 张宏梅*
(广东工业大学生物医药学院 广州 510006)

摘要 芳樟醇可有效降低食品在生产过程中受致病菌污染而引起食源性疾病的概率。鲜有关关注由芳樟醇诱导活的不可培养状态(VBNC)细菌的抗性及其复苏研究。采用二倍稀释法测定芳樟醇对肠炎沙门氏菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.4% (V/V),通过 PMA_{xx}-qPCR 方法对比可培养菌体细胞与 VBNC 状态的肠炎沙门氏菌对热、柠檬酸、乙酸、乳酸、头孢曲松钠、左氧氟沙星以及过氧化氢的耐受能力差异。采用丙酮酸钠、过氧化氢酶及对数期沙门氏菌无菌上清对 VBNC 细菌进行复苏。结果表明,芳樟醇诱导的 VBNC 状态的肠炎沙门氏菌对热、酸、抗生素的耐受能力均弱于可培养状态细胞,而对过氧化氢的耐受能力显著高于可培养沙门氏菌。经过 72 h 处理,只有过氧化氢酶成功复苏约 $(5.51 \pm 0.08) \lg(\text{CFU}/\text{mL})$ 的肠炎沙门氏菌。通过测定可培养、VBNC 以及复苏菌株内活性氧差异,表明活性氧的积累在菌体 VBNC 状态形成中的重要作用。本研究为监控天然抑菌物质使用过程中 VBNC 细菌的形成及其可能产生的食品安全问题提供了研究思路和科学依据。

关键词 芳樟醇; 肠炎沙门氏菌; 活的不可培养状态; 抗性; 复苏

文章编号 1009-7848(2024)07-0079-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.008

沙门氏菌病是最常见的食源性人畜共患病之一,构成了全球性的重大公共卫生问题。肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)属于非伤寒沙门氏菌中重要的血清型之一^[1],非伤寒沙门氏菌感染的临床症状有恶心、呕吐、急性伴有腹痛的小肠结肠炎、血性或非血性腹泻等^[2]。据我国河南省和江苏省疾病预防控制中心统计,鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌是近年来感染沙门氏菌病例中主要的血清型^[3-4]。沙门氏菌的传播途径广泛,鸡肉、猪肉、牛奶、奶制品及新鲜蔬果等均常被沙门氏菌污染^[2,5],而在实际应用中,为了减少食品加工和保存过程中被沙门氏菌等食源性致病菌污染,食用芳香精油(如肉桂精油、柑橘精油等)常被添加在食品中,以达到增香、调味和防腐的目的。

芳樟醇(Linalool)是食品中常见的天然抑菌物质,学名为 3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇,广泛存在于多种植物,如芫荽、罗勒、柚及柑橘等挥发油中,对大肠杆菌、变形杆菌、葡萄球菌等有较好抑制作用^[6-9]。芳樟醇是我国《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014)中允许使用的食品用合成香料,因较高的食用安全性及

独特的香味而使其在食品中应用广泛。常见的食源性致病菌,如金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌等,已被发现在环境胁迫下,可以以活的不可培养(Viable but nonculturable state,VBNC)的状态存在^[10-12]。在该状态下,微生物失去在常规固体培养基上形成菌落的能力,仍然维持代谢活性,在一定的条件下,能在固体培养基上恢复生长,其存在有助于食源性致病菌逃避常规平板计数检测,从而导致食品安全风险^[13-14]。

近年来,关于芳樟醇的研究集中在其对不同致病菌的抑制效果以及相关抑菌机制方面,很少有文献从芳樟醇等天然抑菌物质诱导食源性致病菌进入 VBNC 状态及其可能引发的食品安全问题的角度进行深入研究。鉴于此,本文探究芳樟醇诱导 VBNC 状态下肠炎沙门氏菌对热、有机酸、抗生素以及过氧化氢的耐受能力变化,并对芳樟醇诱导 VBNC 沙门氏菌进行复苏,以期揭示 VBNC 状态下,肠炎沙门氏菌的形成、复苏及其抗性变化可能带来的食品安全问题。

1 材料与设备

1.1 菌株

肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)CICC 21482,中国工业微生物菌种保藏管理中心。

收稿日期: 2023-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972044)

第一作者: 卢梓荧,女,硕士生

通信作者: 张宏梅 E-mail: hmzhang@gdut.edu.cn

1.2 材料与试剂

芳樟醇标准品(纯度 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司;吐温 80,天津市大茂化学试剂厂;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;含 0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE),广东环凯微生物科技有限公司;氯化钠,天津市致远化学试剂有限公司;柠檬酸、乙酸、乳酸,上海晶纯生化科技股份有限公司;头孢曲松钠,北京普博欣生物科技有限公司;左氧氟沙星,上海麦克林生化科技有限公司;过氧化氢,天津市大茂化学试剂厂;活性氧(Reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒($H_2DCF-DA$), Biosharp 公司;柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、上、下游引物、TaqMan 探针,生工生物工程(上海)股份有限公司;丙酮酸钠、过氧化酶,上海晶纯生化科技股份有限公司;PMA_{xx}, Biotium 公司;AceQ[®]qPCR Probe Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 仪器与设备

电子分析天平,日本岛津公司;实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-rad 公司;全波长酶标仪,德国 BERTHOLD 公司;PMA 蓝光猝灭仪, OPE 生物科技有限公司;高压蒸汽灭菌锅、台式高速冷冻离心机,湖南湘仪仪器设备有限公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;旋涡混匀器,北京开源国创科技有限公司;超净工作台,苏净安泰空气技术有限公司;HHS 型电热恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.4 方法

1.4.1 菌种活化及菌悬液制备 将 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下储存的肠炎沙门氏菌 CICC 21482 菌种以 1:100 接种量接种到 TSB-YE 培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 180 r/min 摇育 24 h。随后 $4\text{ }^\circ\text{C}$, $8\ 000\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 用质量分数 0.85% 的无菌生理盐水洗涤 2 次并重悬。采用麦氏比浊法, 添加生理盐水调整菌液浓度至 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL, 备用。

1.4.2 最小抑菌浓度测定及 VBNC 细菌获得 按照体积分数 10% 的芳樟醇, 6% 的吐温 80 与 TSB 混合配制总体积为 10 mL 的芳樟醇母液, 芳樟醇母液终体积分数为 10%, 采用二倍稀释法^[15], 首梯

度试管中体积分数为 3.2%, 开始配制芳樟醇稀释液, 芳樟醇体积分数依次为 3.2%, 1.6%, 0.8%, 0.4%, 0.2%, 每管总体积为 2 mL 的稀释体系中吸出 100 μL 稀释液, 之后每管稀释液中补充 100 μL 上述菌悬液。放置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 180 r/min 摇床中培养 24 h 后, 观察抑菌情况。以不接菌的 TSB 培养基为空白对照, 以肉眼看不到试管内浑浊且在 TSB-YE 固体培养基上涂布, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后, 菌落少于 5 个为最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。肠炎沙门氏菌经 MIC 处理 24 h 后, 测定其活菌数, VBNC 菌浓度为活菌数和平板上可培养数的相差值。试验独立重复 3 次, 每个稀释梯度进行 3 个技术重复。

1.4.3 活菌数定量 PMA_{xx} 能通过细胞膜通透性有效区分活死细菌, PMA_{xx} 孵育后联用荧光定量 PCR 能有效检测菌液中的活菌数, 进行活菌定量^[16-17]。取在 TSB-YE 培养基中摇育($37\text{ }^\circ\text{C}$, 180 r/min) 20 h 后的肠炎沙门氏菌菌液, 采用平板计数法测定原始菌浓度, 生理盐水清洗并重悬后提取肠炎沙门氏菌基因组 DNA, DNA 进行 10 倍稀释, 通过 qPCR 测定对应的 Ct 值, 建立可培养菌落浓度与 Ct 值之间的线性关系。本研究中活菌定量标准曲线为 $Ct\text{ 值} = -3.416\lg C_0(\text{菌落浓度}) + 45.798$, $R^2 = 0.9976$ 。

1.4.3.1 PMA_{xx} 处理 取 500 μL MIC 菌液于 $8\ 000\times g$ 常温离心 10 min, 迅速弃上清, 用 500 μL 生理盐水重悬, 加入 5 μL 浓度为 2 mmol/L 的 PMA_{xx} 工作液, 常温避光孵育 10 min, 蓝光猝灭仪处理 15 min。

1.4.3.2 DNA 提取及 qPCR 方法测定活菌量 经 PMA_{xx} 处理的菌液于 $9\ 000\times g$ 常温离心 5 min, 弃上清后按柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书步骤, 完成 DNA 提取。提取的 DNA 样品置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 储存。目标基因为 *invA*, 上游引物序列为 5'-ACAGTGCTCGTTTACGACC-3'; 下游引物序列为 5'-ACTGGTACTGATCGATAAT-3'; FAM-CTCTTTCTGCTGGCATTATCGATCAGTACCA-TA-MRA。qPCR 反应进行以下程序: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 循环: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 循环共 39 次, 收集荧光。循环结束后 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 保持 5 min。溶解曲线分析: $65\sim 95\text{ }^\circ\text{C}$, 每 5 s 升高 $0.5\text{ }^\circ\text{C}$ 。按照下

列成分配制 qPCR 反应混合液, 反应混合液添加量见表 1。

表 1 qPCR 反应体系使用量
Table 1 Reaction system of qPCR

试剂	使用量/ μL
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
TaqMan 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.2
DNA	2.0
ddH ₂ O	7.0
2 \times AceQ [®] qPCR Probe Master Mix	10.0

1.4.4 耐热性试验 以稳定期肠炎沙门氏菌为对照组, 芳樟醇诱导的 VBNC 肠炎沙门氏菌为试验组, 进行耐热性试验, 测定对照和试验组处理前、后的活菌数。温度条件: 65 $^{\circ}\text{C}$ 及 75 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 15 min, 热处理后样品冰水浴至常温, 进行活菌定量, 操作步骤如 1.4.3 节所述。

1.4.5 耐酸性试验 测定酸处理前可培养和 VBNC 肠炎沙门氏菌活菌数, 酸处理的条件为柠檬酸 (CA)、乙酸 (AA) 和乳酸 (LA) 分别在 pH 3.5 和 pH 4.5 条件下, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 离心 24 h, 生理盐水清洗并重悬, 进行活菌定量。

1.4.6 耐抗生素试验 测定抗生素处理前可培养和 VBNC 肠炎沙门氏菌活菌数, 20 倍 MIC 浓度头孢曲松钠 (CEF) 和左氧氟沙星 (LCF) 处理 24 h 后 8 000 \times g 离心 10 min, 生理盐水清洗并重悬, 进行活菌定量。两种抗生素 MIC 浓度于正式试验前采用二倍稀释法提前测定。

1.4.7 耐过氧化氢试验 以稳定期可培养肠炎沙门氏菌为对照组, 芳樟醇诱导的 VBNC 肠炎沙门氏菌为试验组, 添加体积分数 3% 的 H₂O₂ 溶液重悬菌体, 避光孵育 24 h 后 8 000 \times g 离心 10 min, 生理盐水清洗并重悬, 进行活菌定量。

1.4.8 复苏及胞内 ROS 水平测定 采用沙门氏菌上清 (Cell free supernatant, CFS), 丙酮酸钠 (终浓度为 100 mmol/L), 过氧化氢酶 (终浓度为 1 000 U/mL), 对芳樟醇诱导的 VBNC 状态细菌进行复苏。收集培养 12 h 的沙门氏菌菌液于 9 000 \times g 离心 10 min, 收集上清液, 并用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 无菌过滤器除菌^[18]。过滤后的对数期无菌沙门氏菌上清和生理盐水按 1:100 比例配制沙门氏菌上清稀释

液, 备用。丙酮酸钠溶液以及过氧化氢酶溶液均使用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 的无菌过滤器除菌, 备用。芳樟醇 MIC 处理 24 h 的 VBNC 肠炎沙门氏菌经 9 000 \times g 离心 5 min, 弃上清, 收集, 生理盐水清洗 2 次后, 分别用丙酮酸钠, 过氧化氢酶, 对数期肠炎沙门氏菌无菌上清稀释液和生理盐水重悬菌体, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养振荡器孵育 72 h。自复苏 0~72 h, 每 24 h 从每组的 3 个重复中各取 100 μL 菌液, 涂布于 TSB-YE 固体培养基, 后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细菌培养箱中培养 24 h, 进行平板计数。以生理盐水处理作为阴性对照, 检验在上述复苏介质中孵育 72 h 内 VBNC 肠炎沙门氏菌在固体培养基上形成菌落的数量差异。

依据参考文献[19], 测定 0 h 肠炎沙门氏菌内 ROS 水平和复苏 72 h 后肠炎沙门氏菌胞内 ROS 水平。复苏菌液在 10 000 \times g 离心 5 min, 弃上清, 使用终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂DCFDA 荧光探针重悬菌体, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 恒温摇床中避光孵育 30 min。重复离心操作, 弃上清, 生理盐水清洗并重悬菌体, 吸取 100 μL 到 96 孔板中, 并于 488 nm 发射波长以及 525 nm 激发波长测定荧光强度, 采用 BERTHOLD TRISTAR 2 全波长酶标仪进行测定。

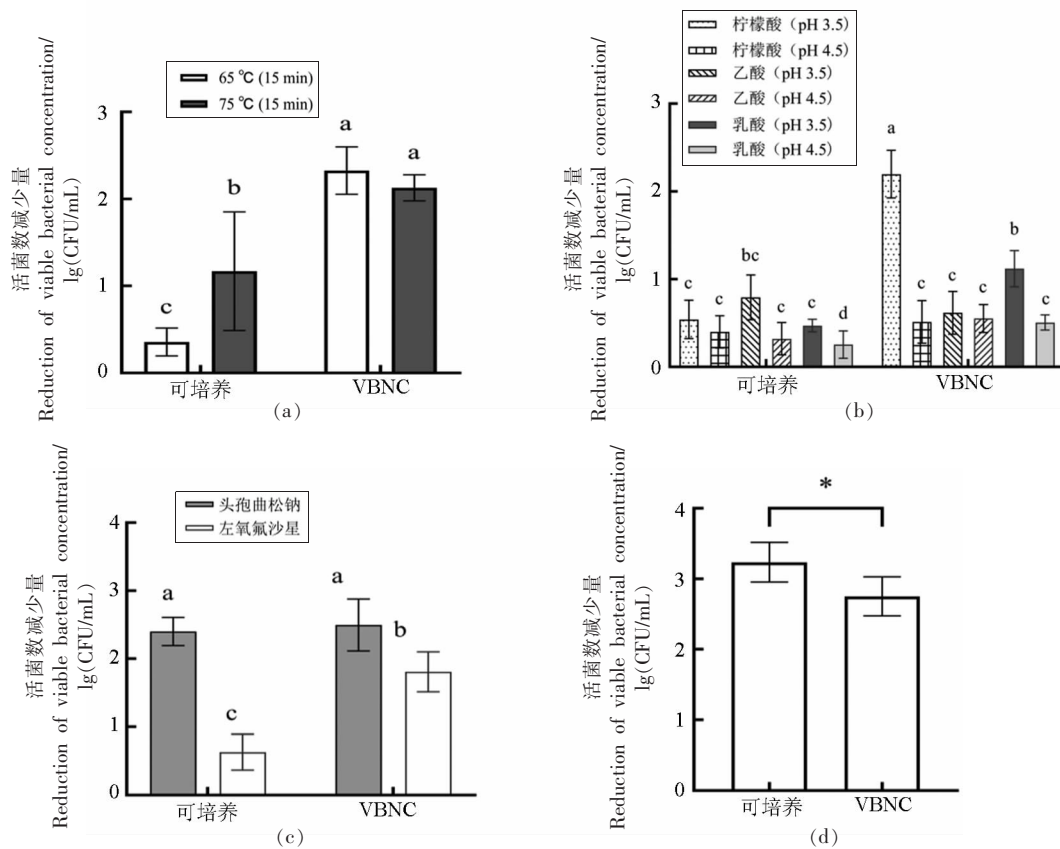
1.5 数据处理

所有试验重复 3 次, 结果以“平均值 \pm 标准差”表示。采用 SPSS 21.0 统计软件对试验数据进行方差分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 VBNC 肠炎沙门氏菌对热、酸、抗生素和过氧化氢耐受能力差异

国外已有研究学者利用传统菌落计数法研究了沙门氏菌对芳樟醇产生同源抗性和交叉抗性^[20]。本研究则针对沙门氏菌在芳樟醇胁迫下进入 VBNC 状态, 该状态的菌体和可培养菌体之间交叉抗性差异进行分析。两种状态的菌体经过热处理后, 芳樟醇诱导的 VBNC 肠炎沙门氏菌活菌数减少量显著高于可培养肠炎沙门氏菌 (图 1a)。经 65 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 min 后, 可培养肠炎沙门氏菌活菌数减少量为 $(0.36 \pm 0.14) \lg(\text{CFU/mL})$, 而 VBNC 的



注:采用配对 t 检验和单因素方差分析数据间是否有显著性差异。图 a~c 采用不同小写字母表示数据间是否存在显著差异, $P < 0.05$; 图 d 采用星号表示显著差异程度 (*, $P < 0.05$)。

图 1 可培养与 VBNC 肠炎沙门氏菌对热 (a)、有机酸 (b)、头孢曲松钠和左氧氟沙星 (c)、过氧化氢 (d) 的耐受能力差异

Fig.1 Variation of tolerances between culturable and VBNC *Salmonella enteritidis* under heat (a), acid (b), ceftriaxone sodium and levofloxacin (c), hydrogen peroxide (d) treatment

活菌数减少量是 $(2.33 \pm 0.24) \lg(\text{CFU/mL})$, 两者存在统计学差异 ($P < 0.05$)。在 75°C 处理 15 min 后, VBNC 肠炎沙门氏菌的活菌数减少量为 $(2.13 \pm 0.13) \lg(\text{CFU/mL})$, 同样显著高于可培养肠炎沙门氏菌的活菌数减少量为 $(1.17 \pm 0.59) \lg(\text{CFU/mL})$, $P < 0.05$ 。这意味着, 本研究中, 芳樟醇诱导的 VBNC 状态下肠炎沙门氏菌对热耐受能力显著低于可培养肠炎沙门氏菌。以往的结果表明, 芳樟醇可以穿孔革兰氏阴性菌的细菌膜, 导致膜的渗透性增加和细胞内的一些重要分子 (如蛋白和核酸分子) 的泄漏^[21]。李远颂等^[8]研究也表明, 芳樟醇可破坏莓实假单胞菌细胞膜的完整性。另有连凤^[22]的研究表明经过 70°C 热处理后, 沙门氏菌会导致细胞质膜与外膜受损。由此说明芳樟醇和热的作用靶点

都可能发生在菌体的细胞膜上, 可以推断 VBNC 状态的菌株对热耐受能力降低或与芳樟醇对细胞膜的破坏程度有关。

从图 1b 可见, VBNC 肠炎沙门氏菌在 pH 值为 3.5 的柠檬酸环境中活菌数减少量为 $(2.20 \pm 0.24) \lg(\text{CFU/mL})$, 显著高于可培养肠炎沙门氏菌 $(0.54 \pm 0.19) \lg(\text{CFU/mL})$, $P < 0.05$ 。这意味着芳樟醇诱导的 VBNC 肠炎沙门对柠檬酸 (pH 3.5) 的耐受能力显著降低, 相同的差异在 pH 4.5 的柠檬酸胁迫中并没有出现。在 pH 3.5 的乙酸胁迫下, 可培养与 VBNC 肠炎沙门氏菌减少量分别为 (0.80 ± 0.22) , $(0.62 \pm 0.21) \lg(\text{CFU/mL})$ 。pH 4.5 的乙酸胁迫下, 可培养与 VBNC 肠炎沙门氏菌减少量分别为 (0.32 ± 0.16) , $(0.55 \pm 0.14) \lg(\text{CFU/mL})$, 结果表明

两者对乙酸的耐受能力没有体现显著差异 ($P > 0.05$)。而在乳酸耐受能力试验中,在 pH 3.5 乳酸胁迫中,可培养与 VBNC 肠炎沙门氏菌减少量分别为 (0.47 ± 0.06) , (1.12 ± 0.18) lg(CFU/mL),存在统计学差异 ($P < 0.05$)。在 pH 4.5 的乳酸胁迫下,两者活菌数减少量分别为 (0.26 ± 0.14) , (0.51 ± 0.08) lg(CFU/mL),同样存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

已有研究表明^[23-24],相同 pH 值下,有机酸的杀菌能力与解离程度成反比,即未解离的有机酸越多,对细菌的杀害能力越大。在相同温度下,由于乙酸解离常数大于乳酸和柠檬酸,所以乙酸杀菌能力应大于乳酸和柠檬酸。然而,在本研究中,经过芳樟醇胁迫诱导进入 VBNC 状态下的肠炎沙门氏菌,对柠檬酸及乳酸的敏感性增强,而对乙酸的敏感性无明显差异。同样的,Leyer 等^[25]研究经过盐酸胁迫处理后的沙门氏菌,对随后乳酸处理的敏感度大于乙酸。另外,Greenacre 等^[26]研究也表明,沙门氏菌在经过盐和乳酸或乙酸双重胁迫下,乙酸能保护沙门氏菌免受高渗胁迫影响,降低高渗胁迫对沙门氏菌的杀灭作用,而乳酸不能。这些研究结果说明芳樟醇诱导的 VBNC 沙门氏菌对不同有机酸的耐受差异,不仅仅与有机酸的解离常数和结构相关,也与菌体所受到的胁迫条件有关。

在前期测定了头孢曲松钠以及左氧氟沙星对肠炎沙门氏菌 MIC 基础上,经 20 倍 MIC 头孢曲松钠和左氧氟沙星处理 24 h 后,可培养与 VBNC 细菌在处理后的活菌数减少量见图 1c。结果表明,可培养与 VBNC 肠炎沙门氏菌在头孢曲松钠处理后,活菌数减少量分别为 (2.40 ± 0.18) , (2.50 ± 0.33) lg(CFU/mL),减少量不存在统计学差异。而经左氧氟沙星处理后,可培养与 VBNC 肠炎沙门氏菌活菌数减少量分别为 (0.63 ± 0.23) , (1.81 ± 0.25) lg(CFU/mL),存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

本文选择体积分数 3% 的过氧化氢暗处理 24 h 作为胁迫条件。如图 1d 所示,可培养沙门氏菌在过氧化氢胁迫后活菌数减少量为 (3.24 ± 0.25) lg(CFU/mL),而 VBNC 肠炎沙门氏菌活菌数减少量为 (2.75 ± 0.24) lg(CFU/mL),显著低于可培养状态 ($P < 0.05$)。结果表明,VBNC 肠炎沙门氏菌对体积分数 3% 的过氧化氢耐受能力强于可培养肠炎沙门氏菌。此结论与 Liao 等^[10]及 Su 等^[27]研究结果一

致,Liao 等^[10]发现 VBNC 状态金黄色葡萄球菌对 100 mmol/L 过氧化氢的耐受能力增强,同时其抗氧化相关基因(*dps*, *trxA*, *katA*)与可培养状态相比上调。Su 等^[27]则推断抗氧化调节基因 *oxyR* 表达上调可能是由于 VBNC 细菌对过氧化氢耐受增强。陈雪琴等^[28]测定了肉桂精油处理后沙门氏菌胞内超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)活力变化趋势,结果表明,两者活力在肉桂精油处理后呈现显著上升趋势。因此,推断由芳樟醇诱导的 VBNC 状态肠炎沙门氏菌对过氧化氢耐受能力增强可能与胞内抗氧化酶活力增强有关。

2.2 VBNC 肠炎沙门氏菌复苏及 ROS 水平

采用过氧化氢酶、丙酮酸钠以及对数期无菌上清,通过清除胞内活性氧水平探究 VBNC 肠炎沙门氏菌的复苏情况。过氧化氢酶被认为对 ROS 清除起到重要作用,丙酮酸钠被证实是有效的自由基清除剂并能延缓细菌进入 VBNC 状态^[29]。而 Ayrapetyan 等^[18]则认为群体感应信号分子通过激活转录因子 RpoS 的表达,从而进一步激活 *katG* 等抗氧化应激相关基因表达,最终实现胞内 ROS 清除以及复苏。如图 2 所示,1 000 U/mL 的过氧化氢酶成功复苏 VBNC 肠炎沙门氏菌,过氧化氢酶处理 48 h 后,VBNC 肠炎沙门氏菌开始在 TSB-YE 固体培养基上恢复形成菌落的能力,为 (1.87 ± 0.19) lg(CFU/mL),而过氧化氢酶处理 72 h 后,约 (5.51 ± 0.08) lg(CFU/mL)的肠炎沙门氏菌能在平板上生长,该结果与 Hamabata 等^[30]以及邓阳

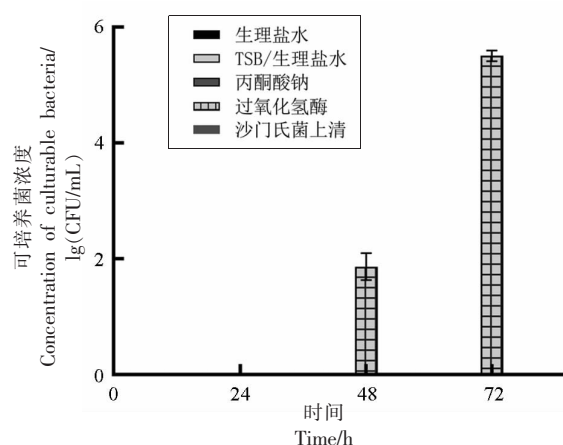


图 2 芳樟醇诱导的 VBNC 肠炎沙门氏菌复苏结果
Fig.2 Resuscitation of VBNC *Salmonella enteritidis* induced by linalool

等^[31]研究结果一致。Hamabata 等^[30]研究发现,经过过氧化氢酶处理后 VBNC 状态白喉杆菌部分转变为可培养状态。邓阳等^[31]采用 1 000 U/mL 过氧化氢酶也成功复苏 VBNC 状态啤酒易感乳杆菌。而本文中对数期无菌上清和丙酮酸钠无法复苏 VBNC 肠炎沙门氏菌,与前人的研究结果不完全一致。郑玉玺等^[32]采用 20 mmol/L 丙酮酸钠及热激的方法成功复苏次氯酸钠诱导的 VBNC 肠炎沙门氏菌。通过添加创伤弧菌亲代的无菌上清,Ayrapetyan 等^[18]成功复苏了低温海水中 VBNC 创伤弧菌。A-fari 等^[33]研究则表明,VBNC 大肠杆菌 O157:H7 能在丙酮酸钠处理后复苏,而单核增生李斯特菌不能。由此可见,VBNC 细菌复苏与否或与细菌种类相关。此外,也有学者表示 VBNC 细菌复苏的分子机制可能不是一个简单的逆转过程^[34-35],关于 VBNC 细菌的复苏机理仍需要更深入研究。

为进一步探究过氧化氢酶对芳樟醇诱导沙门氏菌进入 VBNC 后复苏的机制,测定了可培养、VBNC 以及复苏后肠炎沙门氏菌胞内的 ROS 水平。如表 2 所示,VBNC 状态下肠炎沙门氏菌胞内荧光强度显著高于可培养和复苏肠炎沙门氏菌 ($P<0.05$),由此验证了 VBNC 状态下细胞内存在 ROS 累积。陈雪琴等^[28]研究表明经肉桂精油处理的沙门氏菌细胞膜脂代谢产物 MDA 含量增加,也侧面证实了芳香精油处理后细胞内 ROS 水平升高的可能性。

过氧化氢酶成功复苏的肠炎沙门氏菌胞内荧光强度与可培养细菌无显著差异,说明复苏过程中胞内 ROS 被过氧化氢酶有效清除,并使肠炎沙门氏菌恢复在固体培养基上的菌落形成能力,可见细菌内 ROS 的累积对 VBNC 状态诱导起着重要作用,这与 Liao 等^[29]研究结论一致。

表 2 可培养、VBNC 和复苏肠炎沙门氏菌之间的 ROS 水平差异

Table 2 Variation of ROS levels among culturable, VBNC and resuscitated *S. enteritidis*

状态	可培养	VBNC	复苏(沙门 CFS)	复苏(丙酮酸钠)	复苏(过氧化氢酶)
荧光强度	3 393 ± 196 ^a	33 233 ± 1 010 ^a	3 996 ± 233 ^b	3 183 ± 143 ^c	3 195 ± 191 ^c

注:不同肩标小写字母表示各组数据在单因素方差分析中存在显著差异, $P<0.05$ 。

3 结论

结果表明,MIC 浓度下芳樟醇处理可诱导肠炎沙门氏菌进入 VBNC 状态。与可培养状态相比,VBNC 状态下肠炎沙门氏菌对热、酸、抗生素耐受能力降低,对过氧化氢耐受能力增强。复苏结果表明,过氧化氢酶能有效恢复 VBNC 肠炎沙门氏菌在固体培养基上的生长,通过降低细胞内 ROS 的毒害作用或有助于 VBNC 细菌恢复可培养能力。目前对于 VBNC 细菌研究主要集中在胁迫条件诱导,复苏及毒力研究,对抗性相关研究较少。今后可通过组学技术和分子生物学技术等研究手段对 VBNC 诱导机制进行深入研究,提升对致病菌及其的食品安全问题监控的有效性。

参 考 文 献

[1] LAMAS A, MIRANDA J M, REGAL P, et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies of

Salmonella enterica[J]. Microbiological Research, 2018, 206: 60-73.

[2] ANDINO A, HANNING I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars [J]. The Scientific World Journal, 2015, 2015: 520179.

[3] 马恺,周翌婧,郑东宇,等. 2015-2020 年江苏省食源性主动监测沙门氏菌情况分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2022, 33(6): 33-37.

MA K, ZHOU Y J, ZHENG D Y, et al. Analysis of *Salmonella* in active surveillance of foodborne diseases in Jiangsu Province from 2015 to 2020[J]. Public Health and Preventive Medicine, 2022, 33(6): 33-37.

[4] 肖巍,李想,罗君. 2018-2020 年河南省开封市儿童食源性沙门氏菌感染监测分析[J]. 河南预防医学杂志, 2022, 33(5): 397-400.

XIAO W, LI X, LUO J. Surveillance and analysis of foodborne *Salmonella* infection in children in Kaifeng City, Henan Province from 2018 to 2020[J].

- Henan Journal of Preventive Medicine, 2022, 33(5): 397-400.
- [5] GURTLE J B, HARLEE N A, SMELSER A M, et al. *Salmonella enterica* contamination of market fresh tomatoes: A review[J]. J Food Prot, 2018, 81(7): 1193-1213.
- [6] 陈尚研, 赵玲华, 徐小军. 天然芳樟醇资源及其开发利用[J]. 林业科技开发, 2013, 27(2): 13-17.
CHEN S Y, ZHAO L H, XU X J. Natural linalool resources and their exploitation and utilization[J]. Forestry Science and Technology Development, 2013, 27(2): 13-17.
- [7] 段雪娟, 张潼, 曾洁滢, 等. 植物精油的熏蒸抗菌活性及其机理研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 135-145.
DUAN X J, ZHANG T, ZENG J Y, et al. Study on fumigation antibacterial activity of plant essential oil and its mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 135-145.
- [8] 李远颂, 何荣荣, 蔡佳欣, 等. 芳樟醇对莓实单胞菌的抑菌活性及机制[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(4): 55-63.
LI Y S, He R R, CAI J X, et al. Bacteriostatic activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas berri*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(4): 55-63.
- [9] LIU X, CAI J X, CHEN H M, et al. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microb Pathog, 2020, 141: 103980.
- [10] LIAO X Y, HU W C, LIU D H, et al. Stress resistance and pathogenicity of nonthermal-plasma-induced viable-but-nonculturable *Staphylococcus aureus* through energy suppression, oxidative stress defense, and immune-escape mechanisms[J]. Appl Environ Microbiol, 2021, 87(2): e02380-20.
- [11] SALIVE A F V, PRUDENCIO C V, BAGLINIERE F, et al. Comparison of stress conditions to induce viable but non-cultivable state in *Salmonella* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(3): 1269-1277.
- [12] ZHANG J F, WANG L, SHI L, et al. Survival strategy of *Cronobacter sakazakii* against ampicillin pressure: Induction of the viable but nonculturable state[J]. Int J Food Microbiol, 2020, 334: 108819.
- [13] LI L, MENDIS N, TRIGUI H, et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens[J]. Front Microbiol, 2014, 5: 258.
- [14] RAMAMURTHY T, GHOSH A, PAZHANI G P, et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria[J]. Frontiers in Public Health, 2014, 2: 103.
- [15] 崔永明, 余龙江, 敖明章, 等. 甘草总黄酮的提取技术及其抑菌活性研究[J]. 中药材, 2006(8): 838-841.
CUI Y M, YU L J, AO M Z, et al. Study on extraction technology and antibacterial activity of total flavonoids from *Glycyrrhiza liquorice*[J]. Chinese Traditional Medicine, 2006(8): 838-841.
- [16] 段亮杰, 沙雨婷, 罗意, 等. 叠氮溴化丙锭-荧光定量PCR法实时快速检测5种乳杆菌活菌数方法的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4317-4327.
DUAN L J, SHA Y T, LUO Y, et al. Establishment and application of a fluorescence quantitative PCR method for real-time and rapid detection of five *Lactobacillus* viable counts[J]. Chinese Journal of Microbiology, 2020, 47(12): 4317-4327.
- [17] 肖莉莉, 张昭寰, 姜阳, 等. 叠氮溴化丙锭(PMA)在食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6): 187-194.
XIAO L L, ZHANG Z H, LOU Y, et al. Application of propyl azide bromide (PMA) in the detection of foodborne pathogens[J]. Acta Food Sinica, 2016, 16(6): 187-194.
- [18] AYRAPETYAN M, WILLIAMS T C, OLIVER J D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(8): 2478-2483.
- [19] KALYANARAMAN B, DARLEY-USMAR V, DAVIES K J, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(1): 1-6.
- [20] KALILY E, HOLLANDER A, KORIN B, et al. Adaptation of *Salmonella enterica* serovar senftenberg to linalool and its association with antibiotic resistance and environmental persistence[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(10): e03398-16.
- [21] KALILY E, HOLLANDER A, KORIN B, et al. Mechanisms of resistance to linalool in *Salmonella*

- Senftenberg and their role in survival on basil[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3673–3688.
- [22] 连风. 脱脂奶粉中沙门氏菌的存活规律及射频杀菌效果的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- LIAN F. Study on the survival rule of *Salmonella* in skim milk powder and the effect of radiofrequency sterilization[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [23] 李琳琼, 洪静, 张爱静, 等. 酸胁迫处理对鼠伤寒沙门氏菌抗酸性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(1): 33–40.
- LI L Q, HONG J, ZHANG A J, et al. Effects of acid stress on acid resistance, cell membrane and membrane protein of *Salmonella typhimurium*[J]. *Food Science*, 2021, 42(1): 33–40.
- [24] WU R A, YUK H G, LIU D, et al. Recent advances in understanding the effect of acid–adaptation on the cross–protection to food–related stress of common foodborne pathogens[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(26): 7336–7353.
- [25] LEYER G J, JOHNSON E A. Acid adaptation sensitizes *Salmonella typhimurium* to hypochlorous acid[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(2): 461–467.
- [26] GREENACRE E J, BROCKLEHURST T F. The acetic acid tolerance response induces cross–protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*[J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 112(1): 62–65.
- [27] SU C P, JANE W N, WONG H C. Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state[J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 160(3): 360–366.
- [28] 陈雪琴, 赵圆圆, 张珍, 等. 肉桂精油的化学成分分析及其对沙门氏菌细胞膜损伤机制的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(14): 24–32.
- CHEN X Q, ZHAO Y Y, ZHANG Z, et al. Analysis of chemical constituents of cinnamon essential oil and study on the mechanism of cell membrane damage of *Salmonella*[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(14): 24–32.
- [29] LIAO H M, ZHANG R R, ZHONG K, et al. Induction of a viable but non–culturable state in *Salmonella typhimurium* is correlated with free radicals generated by thermosonication[J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 286: 90–97.
- [30] HAMABATA T, SENOH M, IWAKI M, et al. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Corynebacterium diphtheriae* [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 927.
- [31] 邓阳, 刘君彦, 房慧婧, 等. VBNC状态啤酒易感乳杆菌的诱导及复苏[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(4): 154–159.
- DENG Y, LIU J Y, FANG H J, et al. Induction and recovery of *Lactobacillus* susceptible to beer by VBNC[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 154–159.
- [32] 郑玉玺, 黄利华, 贾强, 等. 次氯酸钠诱导肠炎沙门氏菌活的非可培养状态形成及复苏过程研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(14): 5546–5552.
- ZHENG Y X, HUANG L H, JIA Q, et al. Study on non–culturable state formation and resuscitation process of *Salmonella enteritidis* induced by sodium hypochlorite[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2021, 12(14): 5546–5552.
- [33] AFARI G K, HUNG Y C. Detection and verification of the viable but nonculturable (VBNC) state of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* using flow cytometry and standard plating[J]. *J Food Sci*, 2018, 83(7): 1913–1920.
- [34] DONG K, PAN H X, YANG D, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non–culturable state microorganisms[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(1): 149–183.
- [35] 邸聪聪, 胡平, 胡章立, 等. 细菌活的非可培养(VBNC)状态及其机理研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(6): 8.
- DI C C, HU P, HU Z L, et al. Research progress on non–culturable state of bacterial viability (VBNC) and its mechanism[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2014, 20(6): 8.

Research on Induction of *Salmonella enteritidis* into Viable But Nonculturable State by Linalool

Lu Ziyang, Chen Zihan, He Xinyi, Fu Rong, Zhou Xiaolan, Zhang Hongmei*

(School of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract Linalool can effectively reduce the probability of foodborne diseases caused by pathogen contamination. However, few studies have focused on the resistance and resuscitation of viable but nonculturable (VBNC) state induced by the typical essential oil, linalool. The minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool against *Salmonella enteritidis* was determined by twofold dilution test (0.4%) and differences of resistances between culturable and VBNC *S. enteritidis* against heat, citric acid, acetic acid and lactic acid, ceftriaxone sodium, levofloxacin and hydrogen peroxide was compared by PMAxx-qPCR method. VBNC bacteria was resuscitated for 72 h incubation of sodium pyruvate, catalase and logarithmic *Salmonella* cell-free supernatant dilution. The results showed that resistances of VBNC *S. enteritidis* to heat, acid and antibiotics were weaker than those of the culturable, but resistance to hydrogen peroxide was significantly higher than that of the culturable. After 72 h treatment, only catalase successfully revived VBNC *S. enteritidis* with concentration of $(5.51 \pm 0.08) \lg(\text{CFU/mL})$. Reactive oxygen species (ROS) levels among culturable, VBNC and resuscitated *S. enteritidis* were measured, from which the role of ROS accumulation of the formation of VBNC state was demonstrated. This study may provide ideas and scientific basis for the effective supervision of VBNC state under the application of natural antibacterial substances.

Keywords linalool; *Salmonella enteritidis*; viable but nonculturable state (VBNC); resistance; resuscitation