

山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的抑菌作用

何梦丽¹, 程婧祺¹, 王莉涵¹, 刘靖勋¹, 郭鸽^{1,2}, 杨鑫焱^{1,2}, 姜毓君^{1,2*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

(2. 国家市场监督管理总局重点实验室(婴儿配方食品), 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 为了探究山苍籽精油对分离自婴儿配方乳粉的野生株阪崎克罗诺杆菌的抑制作用, 采用连续二倍稀释法、平板计数法和生长曲线评价山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的抑菌活性, 通过检测 β -半乳糖苷酶活性、碱性磷酸酶活性、胞内 DNA 含量变化及细菌结构变化等指标探究其抑菌机制。结果表明, 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌具有较强的抑菌活性, 其对阪崎克罗诺杆菌的 MIC 为 $6.62\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。经 1 MIC 的山苍籽精油处理后阪崎克罗诺杆菌的生长明显受到抑制, 胞外碱性磷酸酶和胞内 β -半乳糖苷酶活性显著增加为对照组的 2 倍和 13.50 倍 ($P<0.05$); 与对照组相比, 菌体的细胞形态遭到破坏, 细胞内容物泄露, 核酸和蛋白质泄露量皆是对照组的 1.03 倍 ($P<0.05$), 胞内 DNA 含量降低至 $0.17\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, DAPI 荧光区域降低以及凝胶阻滞电泳条带亮度变暗, DNA 受损。综上所述, 山苍籽精油可作为阪崎克罗诺杆菌的高效抑菌剂, 通过破坏细胞膜和 DNA, 干扰菌体正常生理活性进而导致菌体死亡。该研究为开发山苍籽精油为新型抑菌剂提供了理论基础。

关键词: 山苍籽精油; 阪崎克罗诺杆菌; 抑菌; 细胞膜; DNA

文章编号: 1673-9078(2026)02-69-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1655

Antibacterial Effect of Essential oil from *Litsea cubeba* Against *Cronobacter sakazakii*

HE Mengli¹, CHENG Jingqi¹, WANG Lihan¹, LIU Jingxun¹, GUO Ling^{1,2}, YANG Xinyan^{1,2}, JIANG Yujun^{1,2*}

(1.College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2.Key Laboratory of Infant Formula Food, State Administration for Market Regulation, Harbin 150030, China)

Abstract: The antibacterial effect of *Litsea cubeba* oil on wild strains of *Cronobacter sakazakii* in infant formula milk powder is currently unknown. Thus, the continuous double dilution, plate counting, and growth curve methods were used to investigate the antibacterial mechanism by detecting the β -galactosidase activity, alkaline phosphatase activity, intracellular DNA content, and bacterial structure changes. The results showed a strong antibacterial effect for *L. cubeba* oil against *C. sakazakii*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of $6.62\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and significant inhibition in the growth of *C. sakazakii* after one treatment. The activity of extracellular alkaline phosphatase and intracellular β -galactosidase in *C. sakazakii* showed significant 2- and 13.50-fold increases as compared to the control ($P<0.05$), and the cell morphology of the bacteria was destroyed. The cell contents were leaked, with the leaked nucleic acid and protein reaching 1.03 times that observed in the control ($P<0.05$). The intracellular DNA content was reduced to $0.17\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the DAPI fluorescence area was decreased, the brightness of the gel block electrophoresis bands darkened, and the DNA was damaged. In summary, *L. cubeba* essential oil could be utilized as a highly effective bacteriostatic agent

引文格式:

何梦丽,程婧祺,王莉涵,等.山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的抑菌作用[J].现代食品科技,2026,42(2):69-76.

HE Mengli, CHENG Jingqi, WANG Lihan, et al. Antibacterial effect of essential oil from *Litsea cubeba* against *Cronobacter sakazakii* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(2): 69-76.

收稿日期: 2024-11-06 ; 修回日期: 2024-12-24 ; 接受日期: 2025-01-08

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目 (U21A20272)

作者简介: 何梦丽 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 583343019@qq.com

通讯作者: 姜毓君 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学技术, E-mail: yujun_jiang@163.com

for *C. sakazakii* due to its action in destroying both the cell membrane and the DNA and interfering with the normal physiological activity of the bacteria, resulting in death. This study is expected to provide a theoretical basis for the development of the essential oil of *L. cubeba* as a new antibacterial agent.

Key words: *Litsea cubeba* oil; *Cronobacter sakazakii*; antibacterial; cell membrane; DNA

克罗诺杆菌是一种重要的食源性致病菌，对高渗透压和干燥条件具有的抵抗力使它们能够在各种环境如家庭环境和食品生产设施中生存，从而导致人群偶发克罗诺杆菌感染^[1,2]。婴幼儿是克罗诺杆菌感染的高危人群，婴幼儿感染克罗诺杆菌与食用被其污染的婴儿配方乳粉（Powdered Infant Formula, PIF）有关^[3]，其中阪崎克罗诺杆菌被认为是与感染发生相关的主要物种^[4]。阪崎克罗诺杆菌的感染可引起婴幼儿患细菌性脑膜炎、坏死性小肠结肠炎和败血症等疾病，死亡率高达40%~80%^[5]。PIF污染阪崎克罗诺杆菌的主要途径在其加工环境，阪崎克罗诺杆菌是一种环境微生物^[1]，污染PIF的主要途径在其加工环境，且其可在PIF中存活约2年^[6]。迄今为止，全球已发现多起涉及PIF的阪崎克罗诺杆菌感染病例^[1]。虽然阪崎克罗诺杆菌感染只是零星爆发，但因感染后所带来的高死亡率，使其造成的危害不可忽视。目前传统的防控技术在应对当今阪崎克罗诺杆菌污染问题方面存在安全性不高、杀菌不彻底或腐蚀设备等弊端。因此，开发安全高效的新型抑菌剂，对减少加工环境中的阪崎克罗诺杆菌对食品的污染以及对婴儿造成的危害均具有重要意义。

植物精油又称为精油，是从各种植物材料中提取的芳香油，含有萜烯、醛、醇和其他化合物^[7]。由于其来源广泛、成分安全、高效抑菌等特性，近年来逐渐成为研究热点。其中山苍籽精油是以山苍籽的树皮、果实以及叶片为原料提取得到的精油，广泛应用于食品、化妆品、化学和制药行业^[8]。先前的研究发现，山苍籽精油具有抑菌、抗氧化、抗炎、抗过敏等特性^[9]。有研究报道山苍籽精油通过损伤质膜和导致细胞内ROS的过量抑制真菌活性^[8]。也有报道称，山苍籽精油对单增李斯特菌^[10]、大肠杆菌^[11]和金黄色葡萄球菌^[12]具有抑菌活性。然而，目前针对山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌抑制效果的研究仍然较少。此前，虽已有研究表明山苍籽精油的主成分柠檬醛具有抑菌作用^[13]，但柠檬醛是一种挥发性较强的化合物，存在一定的化学不稳定性^[14]，容易在储存过程中损失，从而影响其抑菌效果。相比之下，山苍籽精油作为复合物，具有更好的稳定性和持久性，在抗菌过程中存在多组分共同作用，具有良好的抑菌效果，同时还能降低细菌抗性的产生^[15]。因此，本试验拟选择通过测定山苍

籽精油对分离自PIF的野生株阪崎克罗诺杆菌的最低抑菌浓度（Minimum Inhibition Concentration, MIC）、最低杀菌浓度（Minimum Bactericidal Concentration, MBC）和生长情况以评价山苍籽精油的抑菌效果，并通过 β -半乳糖苷酶活性、碱性磷酸酶活性、胞内DNA含量变化及细菌结构变化等相关指标阐明其对阪崎克罗诺杆菌的抑菌机制，以期开发山苍籽精油抑制剂提供理论依据，进而为阪崎克罗诺杆菌的防控提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胰蛋白胨大豆肉汤培养基（TSB）、胰蛋白胨大豆琼脂培养基（TSA），购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司；山苍籽精油，购自上海麦克林生化有限公司；8-苯胺基-1-萘磺酸，购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；碱性磷酸酶试剂盒，购自苏州格锐思生物科技有限公司；邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷，购自上海源叶生物科技有限公司；DAPI溶液，购自北京索莱宝科技有限公司；细菌DNA提取试剂盒，购自天根生化科技（北京）有限公司。

1.2 试验菌株

阪崎克罗诺杆菌，由课题组前期从PIF中分离获得并经生理生化鉴定和分子生物学鉴定。

1.3 仪器与设备

SpectraMax i3x 多功能酶标仪，美谷分子仪器（上海）有限公司；DHP-9272 电热恒温培养箱，上海一恒科技有限公司；ZQPW-70 台式全温振荡培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；Bioscreen C 全自动生长曲线仪，Oy Growth Curves Ab Ltd；UV-2600 紫外分光光度计，岛津仪器（苏州）有限公司；SU8010 场发射扫描电子显微镜，日本日立公司；Deltavision OMX SR 超高分辨显微镜，美国GE公司。

1.4 方法

1.4.1 MIC和MBC测定

采用连续二倍稀释法测定山苍籽精油的MIC，并稍作修改^[16]。将山苍籽精油用TSB培养基进行二倍梯

度稀释,添加 $\varphi=1\%$ 的吐温 80 促进乳化,并采用 TSB 培养基调整阪崎克罗诺杆菌的菌液终浓度至 10^6 CFU/mL,在 96 孔板上加入不同浓度的山苍籽精油和菌液各 100 μ L,混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h。利用酶标仪测定 OD₆₀₀ 来评估细菌的生长,未显示 OD 增加的最低浓度为 MIC。

在 MIC 实验后,将 100 μ L 细菌悬液(经不同浓度山苍籽精油处理)接种在平板上,均匀涂布,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,没有细菌生长的最低浓度为 MBC^[16]。

1.4.2 时间生长曲线测定

按照 Guo 等^[17]报道的方法测定时间生长曲线,并稍作修改。利用 TSB 培养基稀释山苍籽精油至其终浓度为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹,同时调整阪崎克罗诺杆菌菌液终浓度至 10^6 CFU/mL,将调整后的菌液与浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油等体积混合,并取 200 μ L 加至蜂窝板中,利用全自动生长曲线仪测定 OD₆₀₀,每隔 2 h 测一次,连续测定 24 h,绘制菌的生长曲线。

1.4.3 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的抑菌机制

1.4.3.1 β -半乳糖苷酶活性测定

依据 Li 等^[18]报道的方法测定山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌细胞膜通透性的影响,并稍作修改。过夜培养的阪崎克罗诺杆菌菌液经等体积浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油处理 5 h 后,8 000 r·min⁻¹离心 5 min,无菌 PBS 洗涤 3 次并重悬,向 5 mL 的悬液中加入摩尔浓度为 0.75 mol·L⁻¹的邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, ONPG) 250 μ L 并置于暗处反应 5 min,用紫外分光光度仪在 420 nm 波长处检测不同样品加 ONPG 前后的紫外分光光度值。

1.4.3.2 碱性磷酸酶活性测定

使用碱性磷酸酶试剂盒测定碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AKP) 活性。向过夜培养的阪崎克罗诺杆菌菌悬液中等体积加入浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 5 h 后,8 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,利用 AKP 试剂盒测定 AKP 活性。

1.4.3.3 扫描电子显微镜观察

依据 Guo 等^[17]报道的方法测定山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌细胞膜结构的影响,并稍作修改。向过夜培养的阪崎克罗诺杆菌菌悬液中等体积加入浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、

3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 5 h 后,6 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清,菌体用无菌 PBS 洗涤 3 次后,加入适量的戊二醛,4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定过夜。用 PBS 冲洗三次除去戊二醛,样品用 $\varphi=50\%$ 、70%、90% 和 100% 的乙醇梯度脱水后,冷冻干燥 4 h,并固定喷金,粘样,使用扫描电子显微镜观察细胞的形态结构。

1.4.3.4 大分子内容物泄露测定

大分子物质泄露的测定依据 Guo 等^[17]报道的方法开展,并稍作修改。向过夜培养的阪崎克罗诺杆菌菌悬液中等体积加入浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 5 h 后,8 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,通过 0.22 μ m 微孔过滤器过滤,使用紫外分光光度计测量 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 用于确定细胞中核酸和蛋白质的泄露。

1.4.3.5 胞内DNA含量测定

依据 Lin 等^[19]报道的方法测定山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌胞内 DNA 含量的影响,并稍作修改。向过夜培养的阪崎克罗诺杆菌菌液等体积加入浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 5 h 后,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌体 DNA。取 2 μ L 样品滴加到超微量分光光度计测量不同样品中 DNA 含量变化。

1.4.3.6 DAPI荧光染色

依据 Lin 等^[19]报道的方法测定山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 变化的影响,并稍作修改。过夜培养的阪崎克罗诺杆菌菌液经等体积浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油处理 5 h 后,8 000 r·min⁻¹离心 5 min,无菌 PBS 洗涤 3 次,将菌体重悬在等体积的 DAPI (质量浓度为 10 μ g·mL⁻¹) 溶液中,暗处反应 30 min,8 000 r·min⁻¹离心 5 min 弃上清,菌体用无菌 PBS 洗涤 3 次并重悬。分别取 7 μ L 不同的样品滴加到载玻片上,盖上盖玻片,并利用指甲油封片过夜,置于超高分辨显微镜中进行观察。

1.4.3.7 凝胶阻滞分析

按照 1.4.3.5 提取 DNA 的方法,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取阪崎克罗诺杆菌菌体 DNA。向基因组 DNA 中等体积加入浓度分别为 2、1、1/2、0 MIC 即质量浓度分别为 13.24、6.62、3.31、0 μ g·mL⁻¹的山苍籽精油,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,取 5 μ L 的 DNA 加入 2 μ L 的 6×Loading Buffer 混匀,上样,进行 1 wt.% 的琼脂糖凝胶电泳,利用凝胶成像系统观察拍照。

1.4.4 统计分析

所有的实验至少重复三次，使用 SPSS 27 软件对实验数据进行分析（方差分析），并使用 Origin 2018 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的MIC和MBC

MIC 和 MBC 是评价抑菌剂抑菌性能的重要指标。不同浓度山苍籽精油下阪崎克罗诺杆菌的 OD 值变化如图 1 所示，随着山苍籽精油稀释液浓度的增大，OD 值逐渐减少，当质量浓度超过 6.62 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，OD 值为 0，即山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的 MIC 为 6.62 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。不同质量浓度山苍籽精油作用下阪崎克罗诺杆菌生长情况如表 1 所示，当山苍籽精油质量浓度最低达到 13.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，没有细菌生长。因此，13.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的 MBC。综上结果表明，山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌具有良好的抑菌效果。

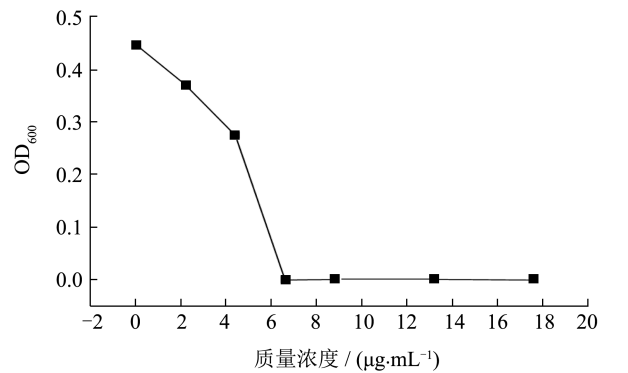


图 1 山苍籽精油作用下阪崎克罗诺杆菌菌液的 OD 值变化图
Fig.1 OD value change of *Cronobacter sakazakii* bacterial solution under the action of *Litsea cubeba* oil

表 1 山苍籽精油作用下阪崎克罗诺杆菌生长情况
Table 1 Growth of *Cronobacter sakazakii* under the influence of *Litsea cubeba* oil

菌种	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
阪崎克 罗诺杆菌	52.96	26.48	13.24	6.62	3.31	0
	-	-	-	+	+	+

注：“+”代表有菌生长，“-”代表无菌生长。

2.2 时间生长曲线分析

图 2 显示了山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌生长的影响。当山苍籽精油质量浓度为 0 MIC 时，对照组中的阪崎克罗诺杆菌在 2.5 h 后进入对数生长期，培养至 15 h 后即进入稳定期，生长趋缓。当山苍籽精油质量浓度 1/2

MIC 时，阪崎克罗诺杆菌延缓进入对数期，且在整个生长周期内菌体的生长相对对照组受到一定的抑制。当山苍籽精油质量浓度增加至 1、2 MIC 时，OD 值几乎无变化，在整个周期内未见阪崎克罗诺杆菌生长增殖，说明山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌具有很好的抑制效果。

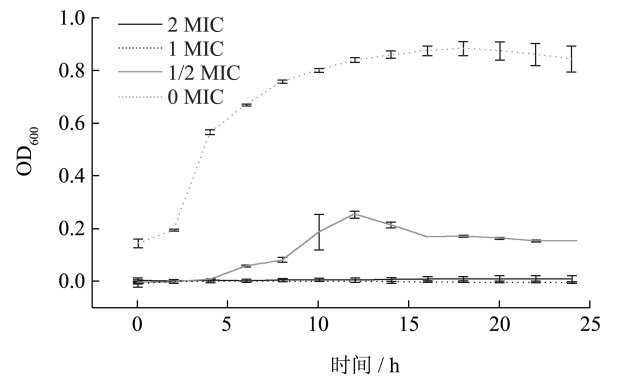


图 2 山苍籽精油作用下阪崎克罗诺杆菌的时间生长曲线图
Fig.2 Time growth curve of *Cronobacter sakazakii* under the action of *Litsea cubeba* oil

2.3 β -半乳糖苷酶活性测定

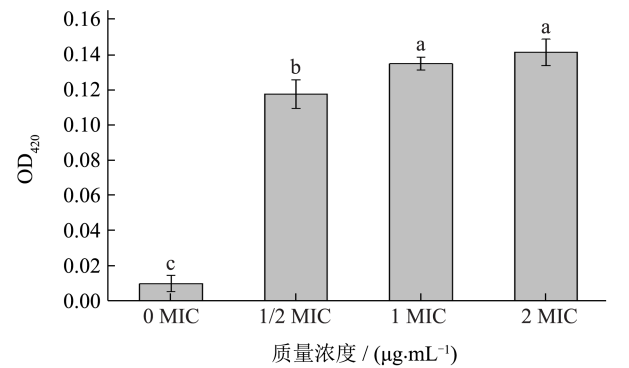


图 3 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的 β -半乳糖苷酶活性的影响
Fig.3 Effects of *Litsea cubeba* oil on β -galactosidase activity of *Cronobacter sakazakii*

注：不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。图 4、6、7 同。

ONPG 是一种乳糖类似物，能够被 β -半乳糖苷酶水解成半乳糖和 O-硝基酚（O-nitrophenol, ONPE），后者在 420 nm 紫外波长处有吸收峰。一般情况下，ONPG 以很慢的速度透过细胞膜，但当细胞膜的通透性提高时，ONPG 会大量的穿透细胞膜，增大了其在 420 nm 处紫外强度^[20]。不同浓度山苍籽精油处理后的菌液 β -半乳糖苷酶活性随浓度的变化趋势如图 3 所示。与对照组（0 MIC）相比，浓度为 1/2、1、2 MIC 的山苍籽精油处理后，OD₄₂₀ 显著增加（ $P<0.05$ ），分别为对照组的 11.77、13.50、14.13 倍，表明阪崎克罗诺杆菌细胞膜的通透性受到了山苍籽精油的影响，且随着

山苍籽精油浓度的增加，细胞膜通透性逐渐增大，对细胞的破坏效果越明显。此前也有研究结果表明，植物精油处理可破坏菌体细胞膜，改变细胞膜通透性^[21]，如 Li 等^[18]在研究罗勒精油（Basil Essential Oil, BEO）对单增李斯特菌细胞膜屏障和呼吸代谢的干扰机制时，发现 1/2 MIC 浓度的 BEO 处理即可改变单增李斯特菌细胞膜通透性，且菌体细胞膜通透性随着 BEO 浓度的增加而增大。周瑾等^[22]研究发现 2 MIC 的黄连提取物处理后严重损伤了金黄色葡萄球菌细胞膜，导致其通透性显著增大（ $P<0.01$ ）。

2.4 碱性磷酸酶活性测定

广泛存在于生物体内的 AKP 与多种物质的代谢有密切的关系，它是一种与膜结合的蛋白质，在完整的细胞外是检测不到 AKP 活性的，但当菌体结构遭到破坏后，就可以检测到其活性，因此测定 AKP 活性是判断细胞膜完整性的重要指标之一。不同浓度的山苍籽精油处理后对阪崎克罗诺杆菌的 AKP 活性影响由图 4 结果可知，山苍籽精油浓度为 1/2、1、2 MIC 的处理组 AKP 活力分别为 0.06、0.10、0.19 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，均大于对照组（0 MIC）的 0.05 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，即随着山苍籽精油浓度的增大，处理组的 AKP 酶活分别增大至对照组的 1.20、2、3.80 倍。由此推测山苍籽精油破坏了细胞膜完整性，导致 AKP 发生泄漏，从而引起细胞外 AKP 酶活性增加。Li 等^[23]研究发现浓度 1 MIC 的山苍籽精油的处理对副溶血性弧菌的细胞壁、细胞膜造成了严重破坏，导致 AKP 泄漏到细胞外环境中，引起了胞外 AKP 活性增加，且 AKP 活性随着山苍籽精油的浓度和处理时间的增加而增加。Lan 等^[24]研究发现浓度为 1 MIC 和 2 MIC 的牛至精油处理后破坏了腐败希瓦氏菌细胞膜的完整性，引起 AKP 的释放，导致腐败希瓦氏菌细胞外环境的 AKP 活性显著增加（ $P<0.05$ ）。

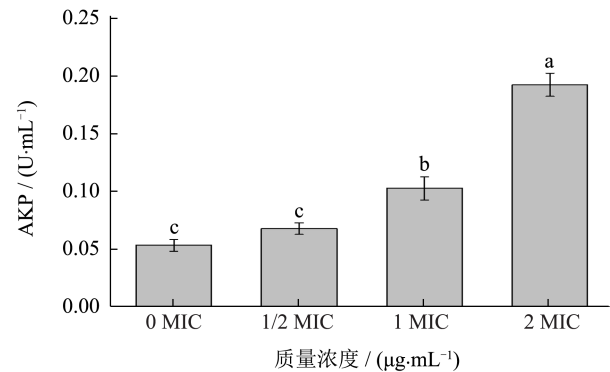


图 4 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌的 AKP 活性的影响
Fig.4 Effects of *Litsea cubeba* oil on AKP activity of *Cronobacter sakazakii*

2.5 菌体微观形态分析

通过扫描电镜观察阪崎克罗诺杆菌经山苍籽精油处理后细胞膜结构变化，结果如 5 所示。未经山苍籽精油处理的空白对照组（图 5a）中，正常生长的阪崎克罗诺杆菌呈杆状，菌体较饱满、形状规则，具有完整的细胞膜结构。经山苍籽精油处理 5 h 后，阪崎克罗诺杆菌的细胞形态发生了明显改变。1/2 MIC 山苍籽精油处理后大部分菌体表面不再光滑，出现沟痕和萎缩。当 1、2 MIC 的山苍籽精油处理后菌体细胞膜损伤数量增加，几乎所有的细胞膜都出现破裂。这会导致细胞内容物发生泄露，对细胞造成不可逆损伤，也将造成阪崎克罗诺杆菌的非正常生长甚至死亡^[25]。Chang 等^[26]发现菊花芽粗提液处理后可导致阪崎克罗诺杆菌细胞发生变形、塌陷，对细胞造成严重损伤。Yuan 等^[27]通过扫描电镜观察发现 1 MIC 和 2 MIC 的当归精油处理后荧光假单胞菌细胞膜出现收缩、破裂和形态改变，细胞膜严重损伤，导致细菌死亡。Chen 等^[28]发现 1/2 MIC 山苍籽精油处理后导致痤疮丙酸杆菌细胞膜出现略微凹陷和起皱，1 MIC 和 2 MIC 山苍籽精油处理后，细胞膜凹陷和褶皱明显，细胞膜损伤严重。

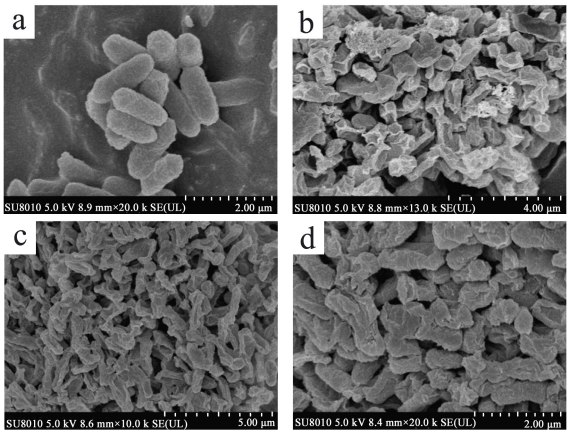


图 5 不同浓度的山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌细胞膜结构的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of *Litsea cubeba* oil on cell membrane structure of *Cronobacter sakazakii*

注：图 a、b、c、d 依次为浓度为 0、1/2、1、2 MIC 的山苍籽精油处理组。

2.6 大分子内容物泄露测定

完整的细胞膜能够提供细菌正常生长所需的相对稳定的内环境，当细菌细胞膜遭到破坏时，会使菌体胞内物质泄露，造成菌体死亡^[29]。图 6 显示了山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌细胞内核酸和蛋白质泄露的影响。当山苍籽精油处理后，随着山苍籽精油浓度的增加，

处理组的 OD_{260} 和 OD_{280} 处的吸光度值显著高于对照组 (0 MIC) ($P < 0.05$), 其中 1/2、1、2 MIC 处理组的核酸泄露量分别为对照组 (0 MIC) 的 1.02、1.03、1.05 倍, 蛋白质泄露量分别为对照组 (0 MIC) 的 1.01、1.03、1.05 倍, 表明山苍籽精油导致细菌细胞内核酸和蛋白质泄露到胞外, 且随着浓度的增大, 核酸和蛋白质的泄露越多。结合上述扫描电子显微镜的结果, 推测山苍籽精油破坏了阪崎克罗诺杆菌的细胞膜, 导致细胞内大分子物质泄露。Chang 等^[26]研究发现, 1/2 MIC 浓度的菊花芽粗提液即可造成阪崎克罗诺杆菌细胞膜破损, 导致胞内核酸和蛋白质泄露, 且泄露到胞外的核酸和蛋白质的含量分别随着菊花芽粗提液处理时间和浓度的增加而增大。Guo 等^[30]研究发现 1 MIC 和 2 MIC 浓度的连翘精油处理破坏了金黄色葡萄球菌细胞膜, 导致细胞悬液中的核酸和蛋白质浓度增加。

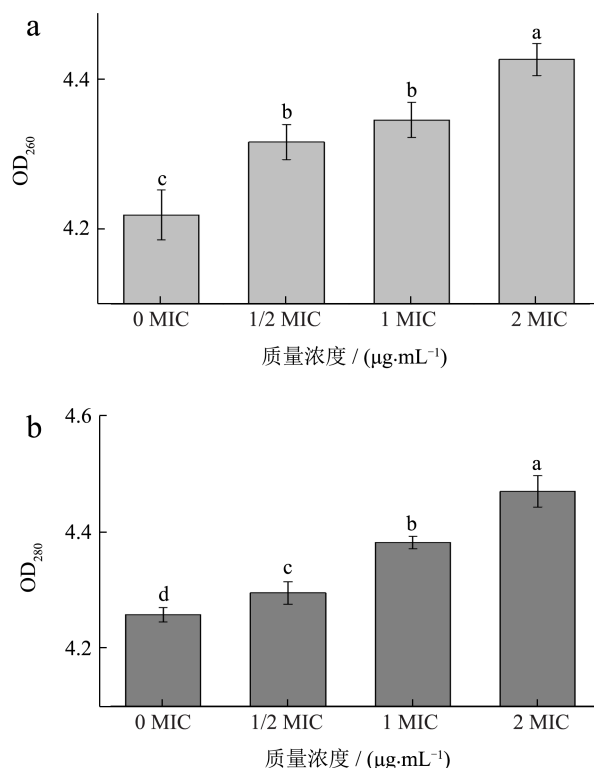


图6 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌大分子内容物泄露的影响
Fig.6 Effect of *Litsea cubeba* oil on macromolecular content leakage from *Cronobacter sakazakii*

注: (a) 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌胞内核酸泄露的影响; (b) 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌胞内蛋白质泄露的影响。

2.7 胞内DNA含量分析

胞内 DNA 不仅是遗传信息载体, 而且对细菌的增殖和分化具有重要的作用。当 DNA 受到损伤或破坏, 会严重干扰细菌的正常生理过程, 从而对细菌的生长、繁殖造成影响。经山苍籽精油处理后阪崎克罗诺杆菌

胞内 DNA 含量变化如图 7 所示。山苍籽精油可显著降低阪崎克罗诺杆菌胞内 DNA 含量 ($P < 0.05$), 随着山苍籽精油作用的质量浓度从 0 MIC 增加到 2 MIC, 阪崎克罗诺杆菌的 DNA 质量浓度从 $6.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下降到 $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。这可能是由于细胞膜结构的破坏造成外泄或者胞内 DNA 本身遭到破坏, 使其含量降低, 进而影响了菌体正常生长和繁殖能力。吴澄宇等^[31]研究发现韭花精油的主成分处理引起单增李斯特菌 DNA 质量浓度下降, 严重阻碍了与 DNA 有关的生理活动, 最终导致菌体死亡。张承慧^[32]研究发现 1 MIC 的丁香精油处理使单增李斯特菌的 DNA 含量降低了 51.30%, 并推测可能是由丁香精油会阻碍核酸合成或丁香精油破坏了细胞膜使得 DNA 泄露所致。

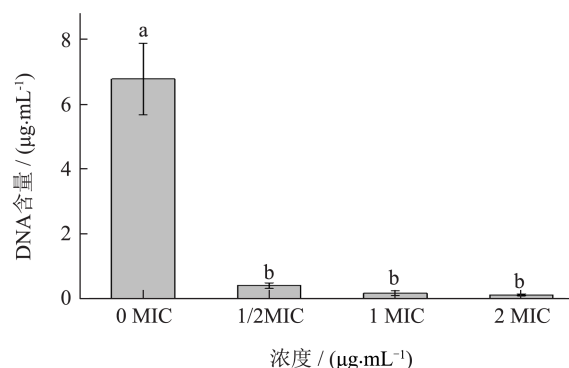


图7 山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌胞内 DNA 含量的影响
Fig.7 Effects of *Litsea cubeba* oil on intracellular DNA content of *Cronobacter sakazakii*

2.8 DAPI荧光染色

DAPI 是一种荧光染料, 可以穿透活细胞与胞内 DNA 结合发出蓝色荧光, 常用于检测胞内 DNA 的变化。不同浓度的山苍籽精油作用阪崎克罗诺杆菌后的 DAPI 荧光图片如图 8 所示。0 MIC 处理组的 DAPI 荧光区域最大, 经 1/2 MIC 山苍籽精油处理后阪崎克罗诺杆菌的荧光区域呈现明显下降, 且随着精油浓度的增加至 1、2 MIC 时, 荧光区域下降更明显。该结果可能是与胞内 DNA 含量降低有关, 也可能是因为山苍籽精油与阪崎克罗诺杆菌的 DNA 发生了特异性结合, 导致 DAPI 与 DNA 的结合位点减少, 进而降低了 DNA 的 DAPI 荧光区域。Cui 等^[33]在利用 DAPI 荧光染色研究丁香精油对单增李斯特菌 DNA 的影响时, 发现用 1 MIC 的丁香精油处理的单增李斯特菌细胞荧光强度显著低于对照组, 并推测可能是丁香精油会阻碍单增李斯特菌核酸的合成, 使丁香精油处理组的核酸含量明显低于对照组。Chang 等^[34]在研究鱼腥草提取物对阪崎克罗诺杆菌的抗菌机制时, 利用 DAPI 荧光染色检测胞内 DNA 变化, 发现鱼腥草提取物处理

后显著降低了 DNA 的 DAPI 荧光强度，并表明鱼腥草提取物处理导致菌体胞内 DNA 含量降低。也有研究学者推测 DNA 的 DAPI 荧光强度降低可能是由于抑菌剂的活性物质与菌体的 DNA 发生了某种特异结合，使得 DAPI 与 DNA 的结合位点减少，从而降低了 DNA 的 DAPI 荧光强度^[35]。

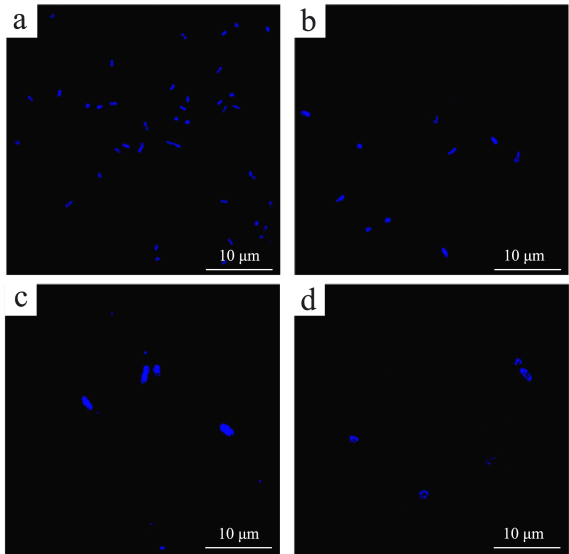


图 8 山苍籽精油作用阪崎克罗诺杆菌后的 DAPI 荧光变化

Fig.8 Changes of DAPI fluorescence after treatment of *Cronobacter sakazakii* with *Litsea cubeba* oil

注：图 a、b、c、d 依次为浓度为 0、1/2、1、2 MIC 的山苍籽精油处理组。

2.9 凝胶阻滞分析

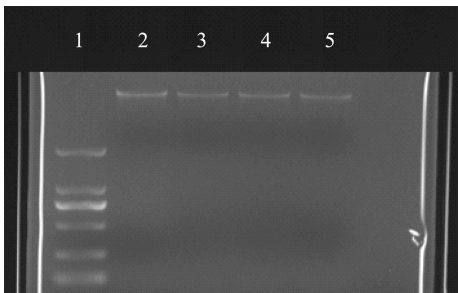


图 9 凝胶阻滞分析山苍籽精油与阪崎克罗诺杆菌 DNA 的相互作用

Fig.9 Gel retarder analysis of interaction between *Litsea cubeba* oil and DNA of *Cronobacter sakazakii*

注：泳道 1、2、3、4、5 依次为 Marker 以及浓度为 0、1/2、1、2 MIC 的山苍籽精油处理组。

采用 DNA 凝胶电泳实验探究山苍籽精油与阪崎克罗诺杆菌 DNA 之间的相互作用，结果如图 9 所示。对照组（0 MIC）阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 的凝胶电泳图呈现明亮且清晰的条带，1/2、1、2 MIC 的山苍籽精油处理组的 DNA 条带亮度相对变暗，表明山

苍籽精油能够与阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 相互作用。此前，也有研究人员采用凝胶阻滞实验观察抑菌剂与细菌基因组 DNA 的结合情况，如王瑞明等^[36]在研究 10-HDA 对枯草芽孢杆菌的抑菌机理时，通过凝胶阻滞实验发现 10-HAD 能够与细菌基因组 DNA 结合，进而阻滞 DNA 的复制，进一步使 DNA 的合成量减少，进而达到抑菌的效果。黄燕飞^[37]利用凝胶阻滞试验发现黄连水提物能够与痢疾杆菌的基因组 DNA 发生紧密结合，并证实了痢疾杆菌 DNA 是抑菌药物黄连水提物其中的一个作用靶点。

3 结论

本研究对山苍籽精油的抑菌活性并对其抑菌机制进行了初步探索。结果表明，山苍籽精油对阪崎克罗诺杆菌具有良好的抑制作用，对其 MIC、MBC 分别为 6.62、13.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，且本研究以随机分离的野生菌株为研究对象可以更真实的反应山苍籽精油在自然环境中的抑菌效果。山苍籽精油的抑菌机制可能是破坏了阪崎克罗诺杆菌细胞膜的完整性、通透性以及细胞结构，进而影响细胞膜正常的功能和生理活性，导致菌体死亡。另一方面通过影响菌体胞内 DNA 进而发挥其抑菌作用，具体可分为以下两点：（1）山苍籽精油破坏阪崎克罗诺杆菌细胞结构，引起胞内核酸的外泄，从而降低内部 DNA 含量；（2）与 DNA 发生结合，并可能通过干扰 DNA 的正常代谢，导致代谢合成过程紊乱，从而达到抑菌目的。目前对山苍籽精油的抑菌机制研究还不够深入，考虑到山苍籽精油中柠檬醛的相对含量约占 60%~80%，是其主要抑菌成分，所以未来可从其主要抑菌成分柠檬醛入手并结合转录组学技术进一步深化对其抑菌机制的认识，以便为未来开发新型抑菌剂提供更精确的理论支持。

参考文献

[1] LANG E, RHEE M S, GONÇALVES M P et al. Desiccation strategies of *Cronobacter sakazakii* to survive in low moisture foods and environment [J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 143: 104241.

[2] KIM H R, KIM B C. Development of multi-reactive aptamers for *Cronobacter* spp. using the sequential partitioning method to detect them in powdered infant formula [J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1249: 340935.

[3] HAYMAN M M, EDELSON-MAMMEL S G, CARTER P J, et al. Prevalence of *Cronobacter* spp. and *Salmonella* in milk powder manufacturing facilities in the United States [J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(10): 1685-1692.

[4] ZHENG Z, XIE Y, MA S, et al. Effect of 405-nm light-emitting diode on environmental tolerance of *Cronobacter sakazakii* in

- powdered infant formula [J]. Food Research International, 2021, 144: 110343.
- [5] SONBOL H, JOSEPH S, MCAULEY C M, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories [J]. International Dairy Journal, 2013, 30(1): 1-7.
- [6] WANG Y, LING N, JIAO R, et al. Transcriptomic analysis reveals novel desiccation tolerance mechanism of *Cronobacter* based on type VI secretion system inhibition [J]. Food Research International, 2023, 172: 113143.
- [7] ZHU W, LI J, TAN J, et al. Inhibition of *Shewanella putrefaciens* biofilm by laurel essential oil and its potential mechanisms [J]. Food Control, 2025, 167: 110776.
- [8] YU L, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Antifungal activity and mechanism of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon essential oil against the waxberry spoilage fungi *Penicillium oxalicum* and its potential application [J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 411: 110512.
- [9] KONG D G, ZHAO Y, LI G H, et al. The genus *Litsea* in traditional Chinese medicine: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164: 256-264.
- [10] SAIKIA A K, CHETIA D, D'ARRIGO M, et al. Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India-chemical composition and antimicrobial activity [J]. Journal of Essential Oil Research, 2013, 25(4): 330-338.
- [11] NGUYEN H V, MEILE J C, LEBRUN M, et al. *Litsea cubeba* leaf essential oil from Vietnam: chemical diversity and its impacts on antibacterial activity [J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 66(3): 207-214.
- [12] GOGOI R, LOYING R, SARMA N, et al. A comparative study on antioxidant, anti-inflammatory, genotoxicity, anti-microbial activities and chemical composition of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers from North-east India [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 125: 131-139.
- [13] 陈薇,刘惠芳,马驰宇,等.香茅醇和柠檬醛对茶炭疽病菌丝结构和酶活性的影响[J].贵州农业科学,2024,52(9):90-99.
- [14] 胡之恒.柠檬醛纳米乳液对腐败希瓦氏菌的抑制作用及其对金鲳鱼保鲜的应用研究[D].杭州:浙江大学,2023.
- [15] 张品.山苍子精油@聚天冬氨酸/壳聚糖纳米粒子对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用及其应用研究[D].镇江:江苏大学,2023.
- [16] MENG Y, LOU L, SHAO Z, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of whey protein- ϵ -polylysine complexes against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 11(15): 2311.
- [17] GUO J, LI W, WAN S, et al. Antibacterial activity of *Amomum tsaoko* essential oil and its interaction with *Staphylococcus aureus* [J]. LWT, 2024, 191: 115700.
- [18] LI C, ZHANG C, CHEN X, et al. The interference mechanism of basil essential oil on the cell membrane barrier and respiratory metabolism of *Listeria monocytogenes* [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 855905.
- [19] LIN L, WANG X L, HE R H, et al. Action mechanism of pulsed magnetic field against *E.coli O157:H7* and its application in vegetable juice [J]. Food Control, 2019, 95: 150-156.
- [20] LIU P, XIE J X, LIU J H, et al. A novel thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* with excellent hydrolysis ability for lactose in whey [J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(11): 9740-9748.
- [21] 郭俸钰,陈文学,陈海明,等.芳樟醇对大肠杆菌的抑菌作用机制[J].现代食品科技,2020,36(4):113-118.
- [22] 周瑾,梁海运,孙佳慧,等.黄连提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及作用机理[J].中国农业科技导报,2024,1-10.
- [23] LI A, SHI C, QIAN S, et al. Evaluation of antibiotic combination of *Litsea cubeba* essential oil on *Vibrio parahaemolyticus* inhibition mechanism and anti-biofilm ability [J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 168: 105574.
- [24] LAN W, ZHAO X, CHEN M, XIE J. Antimicrobial activity and mechanism of oregano essential oil against *Shewanella putrefaciens* [J]. Journal of Food Safety, 2022, 42(1): e12952.
- [25] 刘琳,吴保庆,郭晓银,等.石榴皮水提物对猪源多重耐药大肠杆菌的抑菌作用研究[J].中国畜牧兽医,2023,50(1):328-340.
- [26] CHANG Y, XING M, HU X, et al. Antibacterial activity of *Chrysanthemum buds* crude extract against *Cronobacter sakazakii* and its application as a natural disinfectant [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11.
- [27] YUAN A, HE Y, MA Y, et al. Antibacterial activity of angelica essential oil, its mechanism against *Pseudomonas fluorescens*, and its application in the preservation of chilled fresh beef [J]. Food Bioscience, 2024, 60: 104273.
- [28] CHEN J, ZHANG J, ZHU L, et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Litsea cubeba* against *Cutibacterium acnes* and the investigations of its potential mechanism by gas chromatography-mass spectrometry metabolomics [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 823845.
- [29] 曹文轩,郑琦,岳玲,等.几种天然植物精油的抑菌活性及协同增效研究[J].食品与生物技术学报,2024,43(5):101-109.
- [30] GUO N, GAI Q Y, JIAO J, et al. Antibacterial activity of *Fructus forsythia* essential oil and the application of eo-loaded nanoparticles to food-borne pathogens [J]. Foods, 2016, 5(4): 73.
- [31] 吴澄宇,李迎秋.韭花精油主成分对单增李斯特氏菌的抑菌活性和抑菌机理 [J].轻工学报,2024,39(2):36-42.
- [32] 张承慧.丁香精油对单核细胞增生李斯特菌及其生物膜的抑制研究[D].镇江:江苏大学,2020.
- [33] CUI H, ZHANG C, LI C, et al. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2018, 94: 140-146.
- [34] CHANG Y, XIA S, FEI P, et al. *Houttuynia cordata* thunb. crude extract inactivates *Cronobacter sakazakii*: antibacterial components, antibacterial mechanism, and application as a natural disinfectant [J]. Food Control, 2023, 145: 109467.
- [35] 朱玉林.罗勒精油对李斯特菌的抗菌机制及其纳米纤维在猪肉中的应用研究[D].镇江:江苏大学,2021.
- [36] 王瑞明,李俊霖,杨晓慧,等.10-HDA对枯草芽孢杆菌的抑菌机理研究[J].现代食品科技,2013,29(8):1862-1866.
- [37] 黄燕飞.黄连水提物对痢疾杆菌的抑菌机制研究[D].合肥:安徽农业大学,2016.