

超声联合香芹酚纳米乳灭活鼠伤寒沙门氏菌的作用机制及其在卷心菜中的应用

高畅, 朱佳慧, 谢莉莉, 孔雅静, 蔡笑林, 张春玲, 单忠国, 石超*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了寻求安全有效的鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*) 控制方法, 探究超声 (Ultrasound, US) 联合香芹酚纳米乳 (Carvacrol Nanoemulsions, CN) 对 *S. typhimurium* 的协同杀菌作用机制及其在卷心菜中的应用。该研究采用超声乳化法制备 CN, 探究了 US 和 CN 联合处理对 *S. typhimurium* 的杀菌作用以及对其菌体细胞形态、细胞内容物泄露程度、活性氧水平 (Reactive Oxygen Species, ROS)、N-苯基-1-萘胺摄入量 (N-phenyl-1-naphthylamine, NPN) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量、对卷心菜表面 *S. typhimurium* 的杀灭效果及对卷心菜色泽和硬度的影响。研究表明: US 和 CN 联合处理相比各自单独处理具有显著的协同杀菌作用, 杀菌协同值分别为 1.35 和 1.33; 联合处理破坏了 *S. typhimurium* 的细胞膜并增加其通透性、使细胞皱缩干瘪、并使得 ROS 水平和 MDA 含量分别显著提高至 1 866.99 和 1.25 nmol·mL⁻¹, 增加了氧化应激程度。此外, 该处理还可使卷心菜表面 *S. typhimurium* 的存活量显著降低 0.89~2.01 lg CFU/g, 且对卷心菜色泽和硬度无明显影响。本研究表明, US 和 CN 联合处理能够协同灭活 *S. typhimurium* 和提高生鲜农产品安全性, 为食品工业提供了一种安全高效并具备极大发展潜力的灭菌方法。

关键词: 鼠伤寒沙门氏菌; 超声波; 香芹酚纳米乳; 卷心菜; 协同杀菌作用

文章编号: 1673-9078(2026)7-284-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0500

Synergistic Inactivation of *Salmonella typhimurium* by Ultrasound Combined with Carvacrol Nanoemulsion in Cabbage

GAO Chang, ZHU Jiahui, XIE Lili, KONG Yajing, CAI Xiaolin, ZHANG Chunling, SHAN Zhongguo, SHI Chao*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To investigate safe and effective methods for *Salmonella typhimurium* control, the synergistic bactericidal mechanism of ultrasound (US) combined with carvacrol nanoemulsion (CN) against *S. typhimurium* was evaluated, along with its application in cabbage. CN was prepared using ultrasonic emulsification. The bactericidal effects, changes in bacterial cell morphology, intracellular content leakage, reactive oxygen species (ROS) levels, N-phenyl-1-naphthylamine (NPN) uptake, and malondialdehyde (MDA) content of *S. typhimurium* were evaluated following the treatment. Additionally, the efficacy of this treatment in eliminating *S. typhimurium* on cabbage surfaces and its impact on cabbage color and firmness were investigated.

引文格式:

高畅, 朱佳慧, 谢莉莉, 等. 超声联合香芹酚纳米乳灭活鼠伤寒沙门氏菌的作用机制及其在卷心菜中的应用[J]. 现代食品科技, 2026, 42(7): 284-294.

GAO Chang, ZHU Jiahui, XIE Lili, et al. Synergistic inactivation of *Salmonella typhimurium* by ultrasound combined with carvacrol nanoemulsion in cabbage [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 284-294.

收稿日期: 2025-04-10; 修回日期: 2025-05-31; 接受日期: 2025-06-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272445); 深圳市自然科学基金面上项目 (JCYJ20230807111500001); 深圳市自然科学基金面上项目 (JCYJ20240813151818024); 广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515012728)

作者简介: 高畅 (2004-), 女, 本科生, 研究方向: 食源性致病菌的控制, E-mail: 2022013761@nwfufu.edu.cn

通讯作者: 石超 (1989-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食源性致病菌的控制, E-mail: meilixinong@126.com

The results demonstrated marked synergistic bactericidal effects of the US+CN treatment against *S. typhimurium* compared with individual treatments, with bactericidal synergy values of 1.35 and 1.33, respectively. Bacterial cell membrane damage and increased permeability were also observed, along with cell shrinkage and collapse. ROS levels and MDA content increased significantly to 1 866.99 and 1.25 nmol·mL⁻¹, respectively, indicating intensified oxidative stress. Furthermore, the US+CN treatment reduced *S. typhimurium* viability on cabbage surfaces by 0.89~2.01 lg CFU/g, with no marked alterations in cabbage color or firmness. These findings demonstrate that the US+CN treatment synergistically inactivates *S. typhimurium* and enhances the safety of fresh agricultural products, thereby offering a safe, efficient, and highly promising sterilization method for the food industry.

Key words: *Salmonella typhimurium*; ultrasound; carvacrol nanoemulsion; cabbage; synergistic bactericidal effect

沙门氏菌是与食源性疾病相关的最常见的病原体之一。鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*) 作为沙门氏菌的三种主要血清型之一, 被证明能够污染多种食品, 特别是蔬菜类 (如卷心菜)。人们在食用污染沙门氏菌的食物时可能会导致呕吐、腹泻、发烧, 甚至死亡^[1]。据估计, 每年有 9 380 万人感染由沙门氏菌引起的人类肠道疾病, 15 万人死亡^[2]。

为了有效地预防和控制鼠伤寒沙门氏菌造成的污染, 食品工业中常采取物理和化学杀菌技术。传统物理和化学杀菌技术具有良好的杀菌效果, 但由于物理技术设备操作步骤繁琐和化学药品具有潜在的毒性, 因此在食品工业中具有一定的局限性^[3]。超声 (Ultrasound, US) 是一种非热加工技术, 被广泛应用于食品中微生物的灭活^[4], 目前已有多个研究报告了其灭活新鲜水果和蔬菜中微生物的有效性^[5]。研究报告, 超声产生的机械力和空化作用对细胞膜产生作用, 导致细胞膜的完整性被破坏、酶失活等, 最终导致细胞死亡^[6]。然而, 由于超声时间和频率的限制, 单独超声处理杀菌效果有限, 并且在长时间的高功率超声下, 食品的品质可能下降^[7]。目前, 超声与其他杀菌技术的联合使用可以增强杀菌效果和减少对食品的不利影响, 显示出一定的协同效应^[8]。

香芹酚 (2-甲基-5-异丙基苯酚, 2-methyl-5-isopropylphenol, 分子量为 150.22) 广泛存在于自然界的芳香植物中, 是牛至和百里香等植物精油的主要成分。香芹酚具有较好的杀菌效果, 目前已发现其对食品中的鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌等展现出抑杀作用^[9]。然而, 香芹酚的挥发性强、水溶性差和物理性质不稳定限制了其在食品中的应用^[10]。为了克服这些缺陷, 该研究将香芹酚包埋在合适的表面活性剂中制成纳米乳液。纳米封装可以增加植物精油与细菌细胞膜的接触面积和运输效率, 从而提高精油对细菌的生物利用度和生物活性^[11]。纳米乳剂可通过超声制备, 具有良好的水溶性和稳定

性, 且在物理稳定性和杀菌活性方面比同类产品更具优势, 因此更适合被添加到食品中^[12]。然而, 高浓度的植物精油纳米乳剂在处理食物时, 会对食物的风味造成一定的损害^[13]。因此, 鉴于超声和香芹酚纳米乳 (Carvacrol Nanoemulsions, CN) 单独处理鼠伤寒沙门氏菌的局限性, 本研究旨在探究超声与 CN 联合处理的组合对鼠伤寒沙门氏菌的杀菌作用。

本研究采用超声乳化法制备 CN, 得到具有最佳平均粒径和多分散性指数的 CN。进而, 研究超声联合 CN 对鼠伤寒沙门氏菌的杀菌作用和作用机理。此外, 评价了联合处理对卷心菜上鼠伤寒沙门氏菌的杀菌作用及对卷心菜色泽和硬度的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC); 卷心菜购自中国杨凌当地市场。

香芹酚 (C₁₀H₁₄O ≥98%, CAS 登记号: 499-75-2), 北京 J&K 科学公司; Tween 80 (CAS 注册号: 9005-65-6), 天津恒兴化学试剂制造有限公司; LB 琼脂和 LB 肉汤, 北京陆桥科技有限公司; ROS 检测试剂盒, 碧云天生物科技公司; MDA 检测试剂盒, 碧云天生物科技公司; N-苯基-1-萘胺 (NPN), 北京索莱宝科技有限公司。所有化学品和试剂均为分析级试剂。

1.2 主要仪器设备

Scientz-IIID 超声仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; ZEN3600 纳米激光粒度分析仪, 英国 Worcestershire 公司; S-4800 场发射扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; UV-2550 紫外分光光度计, 日本东京岛津公司; Spectra Max M2 多功能酶标仪, 美国 San Jose 公司; A1 共聚焦激光扫描显微镜, 日本东京尼康公司; CytoFLEX 流式细胞仪, 中国上海贝克曼公司;

ColorFlex® EZ 色度计 CS-820, 中国杭州彩谱科技有限公司; TA.XTPLUS/50 质构分析仪, 英国 Stable Micro System 有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化及培养

用接种环蘸取受试细菌的冻存液, 在 LB 培养基上以平板划线的方式接种, 将平板倒置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 24 h 获得清晰的单菌落。挑取单菌落接种于 20 mL 无菌 LB 肉汤中, 随后置于恒温振荡培养箱中 (37 °C, 130 r·min⁻¹) 培养 12 h 使细菌生长至稳定期, 然后用磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 值 7.2) 洗涤, 稀释至 4×10⁹ CFU/mL。

1.3.2 香芹酚纳米乳 (Carvacrol Nanoemulsions, CN) 的制备和特征化

CN 的制备方法参照 Guo 等^[14]的方法, 具体方法如下: 将不同体积的表面活性剂 Tween 80 与超纯水混合, 并磁性搅拌 10 min, 制备表面活性剂溶液。将香芹酚与表面活性剂溶液混合, 磁性搅拌 60 min 生成粗乳液后, 由超声仪在 455 W 的功率下处理 10 min, 脉冲时间为 2 s (开/关)。香芹酚的质量浓度为 10 mg·mL⁻¹。

将制备的乳液置于聚苯乙烯比色皿中, 使用纳米激光粒度分析仪测定 CN 的粒度 (Z-average) 和多分散指数 (Polymer Dispersity Index, PDI)。

1.3.3 杀菌处理

制备的细菌悬浮液分别采用超声、CN 和超声联合 CN 处理。制备好的细菌悬浮液分别用 69、115 和 161 W·cm⁻² 的超声处理 6、8 和 10 min。在单独使用 CN 处理时, 向细菌悬浮液中添加 CN, 使 CN 的最终质量浓度分别为 0.20 mg·mL⁻¹ 和 0.30 mg·mL⁻¹。在联合处理中, 在细菌悬浮液中加入 CN 并进行超声处理。未经处理的细菌作为对照组。对照组、超声 (161 W·cm⁻², 8 min) 处理组、CN (0.20 mg·mL⁻¹ 和 0.30 mg·mL⁻¹, 8 min) 处理组和超声联合 CN (161 W·cm⁻², 0.20 mg·mL⁻¹ 和 0.30 mg·mL⁻¹, 8 min) 处理组用于确定后续的杀菌机制。

协同值是根据超声和 CN 联合处理后的鼠伤寒沙门氏菌存活率计算得出的, 如下式所示。

$$SV = \frac{I_{US+CN}}{I_{US} + I_{CN} - I_{US} \times I_{CN}} \quad (1)$$

式中:

SV——超声和 CN 联合处理鼠伤寒沙门氏菌的协同值;

I_{US} ——超声处理后细胞存活率, %;

I_{CN} ——CN 处理后细胞存活率, %;

I_{US+CN} ——超声和 CN 联合处理后细胞存活率, %。

SV < 0.85 : 没有协同效应; 0.85 < SV < 1.15 : 弱协同效应; SV > 1.15 : 强协同效应。

1.3.4 场发射扫描电子显微镜 (Field Emission Scanning Electron Microscope, FESEM) 观察

根据 He 等^[15]的方法, 用 FESEM 观察鼠伤寒沙门氏菌细胞的形态变化。将样品离心 (5 000×g, 10 min, 4 °C) 后, 菌液沉淀用 PBS 冲洗两次。用 2.5% (V/V) 戊二醛固定, 4 °C 保存过夜。菌液离心 (5 000×g, 10 min, 4 °C) 后, 用分级乙醇 (30、50、70、80、90、100%, φ) 脱水 10 min, 然后将菌液滴加到 φ 6 玻璃载玻片上, 将其固定在真空喷金场发射扫描电子显微镜支架上, 用 FESEM 进行观察。

1.3.5 蛋白质和核酸泄露测定

细胞蛋白质和核酸泄露参照 Yang 等^[16]的方法, 并进行了一些修改。将分别经过未处理 (即对照组)、单独超声 (161 W·cm⁻²) 处理、单独 CN (0.20、0.30 mg·mL⁻¹) 处理和超声联合 CN (161 W·cm⁻², 0.20 mg·mL⁻¹ 和 0.30 mg·mL⁻¹) 处理的各处理组样品离心 (8 000×g, 10 min, 4 °C) 后分别收集上清液。上清液转入无菌管, 用于检测细胞内容物渗漏情况。用紫外分光光度计在波长 260 和 280 nm 处的吸光度值。

1.3.6 活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 水平测定

鼠伤寒杆菌的 ROS 水平采用 Díaz-Jeon 等^[17]的方法, 并略加修改。在处理过的样品中加入浓度为 5 μ M 的 DCFH-DA, 37 °C 黑暗孵育 10 min。离心 (12 000×g, 10 min, 4 °C) 并用 PBS 冲洗后, 使用多功能酶标仪在激发波长和发射波长分别为 488 和 525 nm 处实时测量。

1.3.7 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量测定

测定 MDA 含量参照 He 等^[15]的方法并稍作修改。根据脂质过氧化 MDA 检测试剂盒的使用要求, 使用多功能酶标仪测量上清液在 450、532 和 600 nm 处的吸光度值。

$$C = 5 \times [12.9 \times (A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) - 2.58 \times A_{450 \text{ nm}}] \quad (2)$$

式中:

C——MDA 含量, nmol·mL⁻¹;

$A_{532 \text{ nm}}$ ——上清液在 532 nm 处的吸光度;

$A_{600 \text{ nm}}$ ——上清液在 600 nm 处的吸光度;

$A_{450 \text{ nm}}$ ——上清液在 450 nm 处的吸光度。

1.3.8 N-苯基-1-萘胺摄入量 (N-phenyl-1-naphthylamine, NPN) 测定

测定细胞内 NPN 的摄入量根据 Hu 等^[18]的方法并略加修改。将处理过的样品用 PBS 冲洗两次并重悬, 然后以每孔 200 μL 注入 96 孔板, 每孔再注入 1.5 μL NPN ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。最后, 立即使用多功能酶标仪在 350 和 420 nm 的激发和发射波长下检测实时荧光。

1.3.9 共聚焦激光扫描显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 分析

采用 CLSM 观察细胞膜的完整性参照 Tian 等^[19]的方法并略加修改。将处理过的样品用 PBS 冲洗两次并重悬, 然后向细菌悬浮液中加入 2 $\times$ 染色液 (SYTO 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain, SYTO 9/Propidium Iodide, PI) 并在黑暗中培养 15 min。最后, 将 5 μL 细菌悬浮液滴在载玻片上, 在 CLSM 下观察。

1.3.10 流式细胞仪 (Flow Cytometry, FCM) 分析

用 FCM 观察鼠伤寒沙门氏菌细胞膜的完整性参照 Nieto-Velázquez 等^[20]的方法, 并做了一些修改。使用 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活力试剂盒, 检测细菌细胞膜的通透性。按照 1.3.1 方法处理结束后, 将细菌离心 ($10\,000\times g$, 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 重悬于 200 μL 0.85% (m/V) NaCl 溶液中。将 1 μL PI 染料与样品在黑暗中孵育 15 min。随后, 将 5 μL 细菌悬液转移到载玻片上, 在 FCM 下观察鼠伤寒沙门氏菌存活情况。

具体来说, 将处理过的悬浮液离心 ($10\,000\times g$, 2 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 并洗涤一次, 然后用 0.85% (m/V) NaCl 重悬。用 PI 染色液对样品进行染色, 然后在室温下暗处染色 15 min。随后使用 FCM 分析样品。

1.3.11 超声联合CN在卷心菜中的应用

1.3.11.1 卷心菜的接种与处理

卷心菜购自中国杨凌当地市场, 储存于 4 $^{\circ}\text{C}$, 购买 1 d 内使用。卷心菜的处理参考了 Yang 等^[16]的方法, 但略有改动。

将制备好的鼠伤寒沙门氏菌接种到清洗干净并切成 3 $\times$ 3 cm 的均匀卷心菜片上。每次接种 10 μL , 接种 10 次, 使初始细菌数量为 8.00 lg CFU/g, 并在室温下晾干 30 min。

样品包括未处理组 (对照)、超纯水 (Ultrapure Water, UW) 处理组、超声 ($207 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 处理组、CN (0.20 、 $0.30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理组和超声联合 CN ($207 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、 $0.20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理组, 处理时间均为 10 min。

1.3.11.2 卷心菜表面鼠伤寒沙门氏菌数量的测定

每次处理后, 将卷心菜切片放入装有 10 mL PBS 的无菌匀浆袋中匀浆 2 min。将一系列稀释的匀浆涂布在 LB 琼脂上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h。

1.3.11.3 卷心菜的色泽和硬度分析

参照 Coskun 等^[21]的方法, 使用 ColorFlex[®] EZ 色度计测定样品的颜色变化。在每个样品表面的三个位置记录 L^* 、 a^* 和 b^* 色值, 分别代表亮度、红度和黄度。每种处理取三个样品的九个读数。根据公式计算出色差 (ΔE):

$$\Delta E = [(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2]^{1/2} \quad (3)$$

式中:

ΔE ——色差;

L^* ——亮度;

a^* ——红度;

b^* ——黄度。

用质地分析仪测量卷心菜切片的硬度。使用的 P/2 探头直径为 2 mm, 测量前速度为 $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, 穿透速度为 $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, 测量后速度为 $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。在每种处理条件下, 随机选择五片卷心菜进行测量。最大峰值力用硬度测量, 结果用千克 (kg) 表示。

1.3.12 统计分析

每个试验重复三次 ($n=3$)。数据采用 SPSS 26.0 版 (SPSS 26.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 用平均值 $\pm$ 标准差 (SD) 表示。组间差异采用 Tukey 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 香芹酚纳米乳的表征

Z-average 和 PDI 是评价乳化技术的关键技术。通常, 较小的 PDI (<0.3) 表示水性体系中颗粒粒度的分布均匀, 而具有较大 PDI (>0.7) 的乳液在液滴直径分布较宽的情况下表现出较差的稳定性^[22]。在该研究中, 超声乳化法制备的乳液的平均粒径范围为 149.40~362.20, PDI 范围为 0.27~0.44 (表 1)。其中, 体积比为 1:1.25 的 CN 粒径最小, 为 149.40 nm, 并且 PDI 为 0.27, 小于 0.3, 表明了纳米乳液的粒径分布更集中, 均匀性好。Robledo 等^[23]研究表明, 超声处理 10 min 可以将百里香酚纳米乳液的平均粒径从 319.70 nm 降低到 132.40 nm, 将 PDI 从 0.48 nm 降低到 0.26 nm。

2.2 超声联合CN对鼠伤寒沙门氏菌的杀菌作用

超声和 CN 单独使用或联合使用处理鼠伤寒沙门

氏菌 6、8 和 10 min 的杀菌效果如表 2 所示。单独用 0.20、0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理 6~10 min 使得鼠伤寒沙门氏菌数量减少了 0.07~0.18 lg CFU/mL。单独使用 69、115 和 161 W·cm⁻² 超声处理 6~10 min 使得鼠伤寒沙门氏菌数量减少了 0.16~0.52 lg CFU/mL，细菌减少数量随着处理时间的延长而增加。与超声和 CN 的单一处理相比，超声联合 CN 处理组鼠伤寒沙门氏菌细菌数量显著降低 ($P<0.05$)，表明联合处理杀菌效果大于单独处理杀菌效果。超声和 CN 的 SV 值分别为 1.35 和 1.33，大于 1.15，表明有强烈的协同杀菌作用。在 Yang 等^[24]的一项研究中，单独使用超声 (115~253 W·cm⁻²) 处理 2~8 min 可以导致鼠伤寒沙门氏菌减少 0.41~1.81 lg CFU/mL。同样，研究发现，与单独使用两种处理相比，超声与柠檬酚纳米乳的共同处理显著减少了鼠伤寒沙门氏菌的数量。在该研究中，超声联合 CN 处理使得鼠伤寒沙门氏菌的数量减少了 0.60~8.64 lg CFU/mL，与超声和 CN 的单一处理相比，超声联合 CN 处理组鼠伤寒沙门氏菌细菌数量显著降低 ($P<0.05$)。超声和 CN 的联合使用不仅可以降低制备 CN 的浓度和其所需的超声功率、减少能耗，还可以达到快速杀菌的目的，为其在食品工业中的应用提供了可能。

表 1 在不同的Tween 80和香芹酚体积比下制备的CN的平均粒径 (Z-average) 和多分散性指数 (PDI)

Table 1 The average particle size (Z-average) and polydispersity index (PDI) of CN prepared at different Tween 80 and carvacrol volume ratios			
项目	体积比 (Tween 80: 香芹酚)		
	1:0.5	1:1.25	1:2
Z-average/nm	362.20 ± 0.30 ^A	149.40 ± 0.30 ^B	241.20 ± 0.30 ^C
PDI	0.44 ± 0.01 ^A	0.27 ± 0.01 ^B	0.38 ± 0.01 ^C

注：结果用平均值 ± 标准差表示。不同的大写字母表示同一行中任何平均值具有统计学显著差异 ($P<0.05$)。

2.3 鼠伤寒沙门氏菌的形态变化

采用场发射扫描电子显微镜观察不同处理组的鼠伤寒沙门氏菌细胞形态。对照组细胞呈典型的杆状结构，表面完整、光滑、致密 (图 1a)。0.20、0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理与对照组的细胞形态相比无明显差异，少数细胞出现轻微收缩 (图 1b、1c)。相比对照组，单独超声处理引起的细胞形态改变更严重 (图 1d)。与单独超声和 CN 处理相比，超声联合 0.20 mg·mL⁻¹ CN 处理的细胞出现严重的收缩，部分细胞失去了杆状结构 (图 1e)。超声联合 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理的细胞塌陷程度最大，细胞完全萎缩，杆状结构丢失 (图 1f)。

Li 等^[25]研究表明，超声导致大肠杆菌的细胞膜模糊和粗糙。这表明超声作用于细菌的细胞膜，并且能够凭借其空化效应在细胞膜形成微孔，从而改变细胞膜通透性。

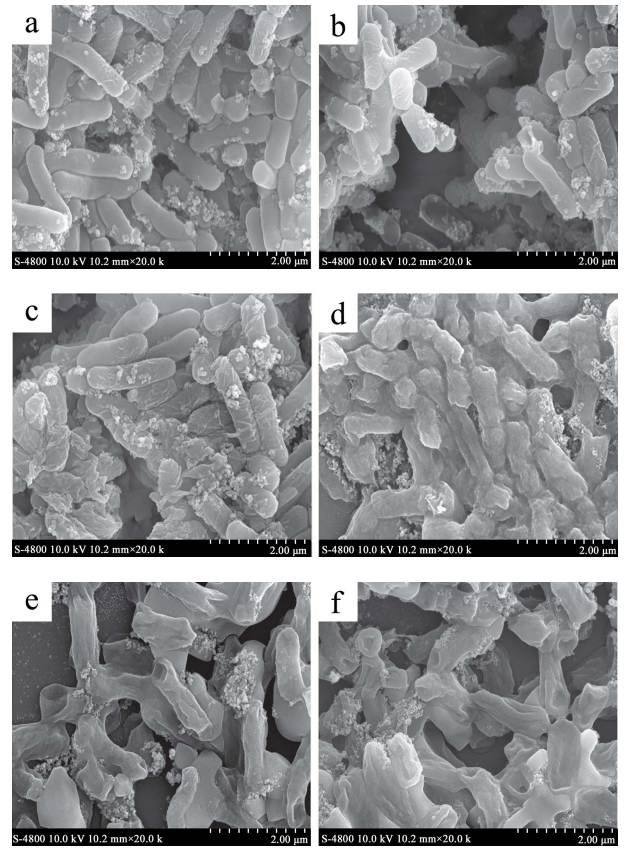


图 1 不同处理后鼠伤寒沙门氏菌的 FESEM 图像
Fig.1 FESEM images of *Salmonella typhimurium* after different treatments

注：(a) 对照 (未处理)；(b) 0.20 mg·mL⁻¹ CN；(c) 0.30 mg·mL⁻¹ CN；(d) US (161 W·cm⁻²)；(e) US+0.20 mg·mL⁻¹ CN；(f) US+0.30 mg·mL⁻¹ CN。放大倍数=20 000×，条形标记=2.00 μm。

2.4 细胞内容物泄漏

样品在 OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 处的吸光度检测可以反映细胞膜通透性的变化。如图 2，与对照组相比，单独超声和 CN 处理的 OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 显著增加 ($P<0.05$)。超声联合 CN 处理后鼠伤寒沙门氏菌的核酸和蛋白质泄漏程度显著 ($P<0.05$) 高于超声和 CN 单独处理后鼠伤寒沙门氏菌的核酸和蛋白质泄漏程度。Guo 等^[14]研究表明，经 TEON 联合超声处理的样品的核酸的释放量显著高于单独超声和 TEON 处理的样品，这与本研究的结论相似。在本研究中，超声联合 CN 处理增强了对鼠伤寒沙门氏菌细胞膜通透性的破坏，这将促进 CN 进入细胞并导致细胞内容物进一步泄漏。

表 2 用超声、CN和超声联合CN处理后鼠伤寒沙门氏菌的细菌降低数量 (lg CFU/mL)

Table 2 Reduction of *Salmonella typhimurium* populations after treatment with US, CN and US+CN (lg CFU/mL)

时间/ min	US/(W·cm ⁻²)				CN/(mg·mL ⁻¹)				US/(W·cm ⁻²)+CN			
	69	115	161		0.20	0.30	69	115	161	69	115	161
6	0.16 ± 0.04 ^{Bde}	0.22 ± 0.10 ^{Bd}	0.25 ± 0.11 ^{Bd}		0.07 ± 0.07 ^{Bf}	0.08 ± 0.06 ^{Bef}	0.60 ± 0.05 ^{Bc}	0.61 ± 0.10 ^{Cc}	0.62 ± 0.05 ^{Cc}	0.64 ± 0.04 ^{Cbc}	0.72 ± 0.06 ^{Cab}	0.81 ± 0.08 ^{Ca}
8	0.17 ± 0.09 ^{ABgh}	0.28 ± 0.09 ^{ABg}	0.42 ± 0.09 ^{Af}		0.08 ± 0.08 ^{ABh}	0.10 ± 0.06 ^{Bh}	0.67 ± 0.05 ^{Bc}	0.98 ± 0.06 ^{Bd}	3.60 ± 0.12 ^{Bb}	1.63 ± 0.06 ^{Bc}	3.65 ± 0.06 ^{Bb}	5.75 ± 0.01 ^{Ba}
10	0.31 ± 0.14 ^{Ag^h}	0.34 ± 0.05 ^{AG}	0.52 ± 0.15 ^{Af}		0.16 ± 0.07 ^{Ah}	0.18 ± 0.10 ^{AGh}	1.76 ± 0.08 ^{Ac}	4.00 ± 0.04 ^{Ac}	8.64 ± 0.00 ^{Aa}	2.70 ± 0.04 ^{Ad}	5.56 ± 0.07 ^{Ab}	8.64 ± 0.00 ^{Aa}

注: 结果用平均值 ± 标准差表示。不同的大写字母或小写字母表示同一行或同一列中任何平均值具有统计学显著差异 (P<0.05)。

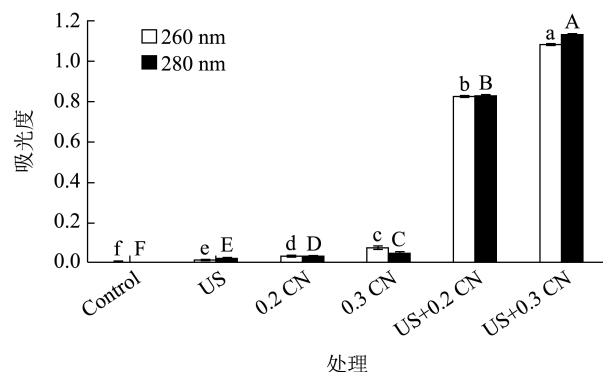


图2 不同处理下鼠伤寒沙门氏菌细胞的核酸和蛋白质泄漏

Fig.2 Nucleic acid and protein leakage of *Salmonella typhimurium* cells under different treatments

注: US, 161 W·cm⁻²; 0.2 CN, 0.20 mg·mL⁻¹ CN; 0.3 CN, 0.30 mg·mL⁻¹ CN。图 3~5 同。

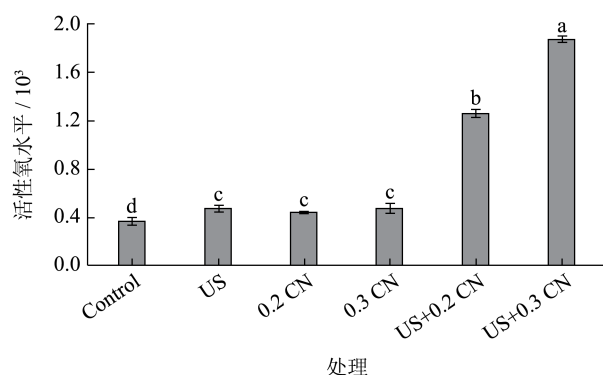


图3 不同处理下鼠伤寒沙门氏菌的细胞内 ROS 水平

Fig.3 Intracellular ROS levels of *Salmonella typhimurium* under different treatments

2.5 ROS水平

ROS 诱导的脂质过氧化在细胞死亡中起关键作用, 高浓度的 ROS 作用于细胞膜并诱导细胞死亡。如图 3 所示, 与对照组相比, 超声和 CN 单独处理的鼠伤寒沙门氏菌细胞内 ROS 水平略有升高。超声和 CN 联合处理后细胞内的 ROS 水平高于单独超声和 CN 处理下细胞内的 ROS 水平, 且超声联合 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理的细胞内 ROS 水平显著 ($P < 0.05$) 高于超声联合 0.20 mg·mL⁻¹ CN 处理下细胞内 ROS 水平, 为 1 866.99。在 Li 等^[25]的研究中, 高强度超声处理显著 ($P < 0.05$) 增加了大肠杆菌 O157:H7 细胞中的 ROS 水平。同时, 大量的 ROS 降低了质子动力学相关基因的表达, 导致生物分子氧化以及细胞膜应激损伤^[27]。因此, 超声联合 CN 的处理能够明显增加细胞内 ROS 水平, 导致其氧化损伤, 最终死亡。

2.6 MDA含量的变化

MDA 是脂质过氧化的常见产物, 也是氧化损伤的敏感诊断指标^[28]。如图 4 所示, 对照组几乎不产生 MDA。与对照组相比, 单独超声处理和单独 CN 处理后鼠伤寒沙门氏菌细胞外 MDA 含量显著 ($P < 0.05$) 升高, 分别为 0.19、0.28 和 0.29 nmol·mL⁻¹。超声和 CN 联合处理下鼠伤寒沙门氏菌的细胞外 MDA 含量显著 ($P < 0.05$) 高于超声和 CN 单独处理下的细胞外 MDA 含量, 且超声联合 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理组的细胞外 MDA 含量提升更多, 为 1.26 nmol·mL⁻¹。Yang 等^[24]的研究表明超声联合柠檬酚纳米乳处理引起鼠伤寒沙门氏菌胞外 MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$)。本研究中, 超声联合 CN 处理产生的 MDA 水平明显高于超声和 CN 单独处理 (图 4)。结合 ROS 检测结果, 表明超声联合 CN 处理进一步导致脂质过氧化和细胞死亡。

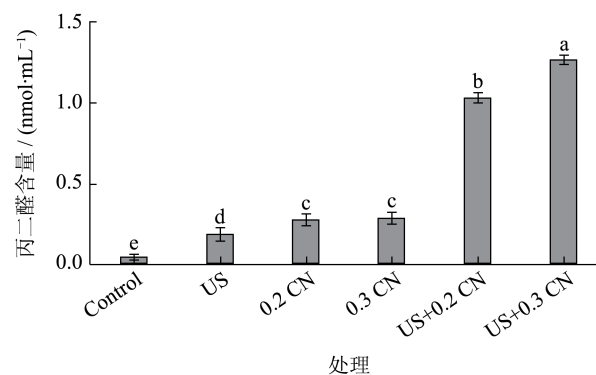


图4 不同处理下鼠伤寒沙门氏菌的细胞外 MDA 含量

Fig.4 Extracellular MDA content in *Salmonella typhimurium* under different treatments

2.7 NPN摄入量的变化

NPN 作为一种疏水性的荧光探针, 不能穿透完整的膜, 而在外膜受损的情况下 NPN 就会掺入甘油磷脂环境中, 导致 NPN 荧光增加^[29]。如图 5 所示, 超声联合 0.20 和 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理下的荧光强度显著 ($P < 0.05$) 高于超声和 CN 单独处理, 荧光强度分别增加到 21 299.50 和 25 823.00。He 等^[15]发现提高超声功率和延长超声时间可显著增强大肠杆菌对 NPN 的摄取, 此外之前的研究表明, 通过分析一些膜脂质稳态相关蛋白在处理后的表达差异, 表明超声诱导的这些膜通透性相关蛋白质的过量产生是导致脂质稳态降低的原因。本研究中, 超声联合 CN 可能破坏了细胞膜的脂质稳态并增加了细胞膜的通透性, 从而与单独使用超声和 CN 处理相比, 显著增加了鼠伤寒沙门氏菌对 NPN 的摄取。

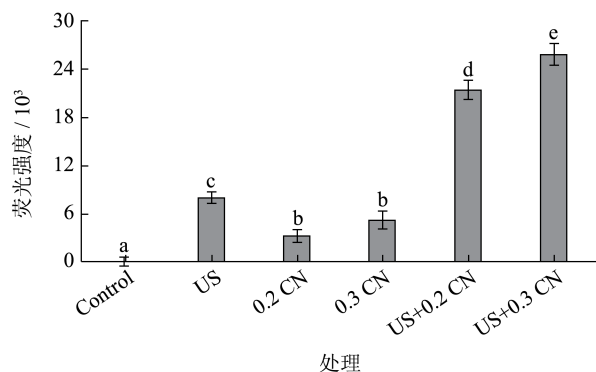


图5 不同处理后鼠伤寒沙门氏菌的NPN摄入量

Fig. 5 NPN uptake capacity of *Salmonella typhimurium* after different treatments

2.8 细胞膜的完整性

通常情况下, SYTO 9 对细菌细胞的完整膜或者受损膜进行染色, 而 PI 仅对膜受损的细胞进行染色。如图 6 所示, 对照组中几乎只表现出绿色荧光 (图 6a₁), 细胞膜完整的细胞占比为 97.43% (图 6a₂)。超声和单独使用 CN 处理, 荧光分布几乎不变 (图 6b₁、6c₁、6d₁)。超声和 CN 联合处理组的红色荧光明显增加 (图 6e₁、6f₁), 细胞膜损伤细胞的占比分别增加到 25.82% 和 68.21% (图 6e₂、6f₂)。在本研究中, 与单独的超声和 CN 处理相比, 超声联合 CN 处理组鼠伤寒沙门氏菌显示出更高比例的红色荧光, 这表明超声联合 CN 处理对细菌细胞膜完整性的破坏更强。在之前的研究中, 超声联合百里香精油纳米乳将几乎所有大肠杆菌染成红色^[14]。结合 FESEM 的结果分析, 这可能是超声空化导致细胞膜产生空隙, 而机械效应导致 CN 进一步接触细胞膜并进入细胞内部, 进一步破坏细胞膜的完整性, 导致细胞质丢失、细胞收缩甚至死亡。

2.9 超声联合CN对卷心菜表面鼠伤寒沙门氏菌存活量、卷心菜颜色和硬度的影响

2.9.1 超声联合CN对卷心菜表面鼠伤寒沙门氏菌杀菌效果的影响

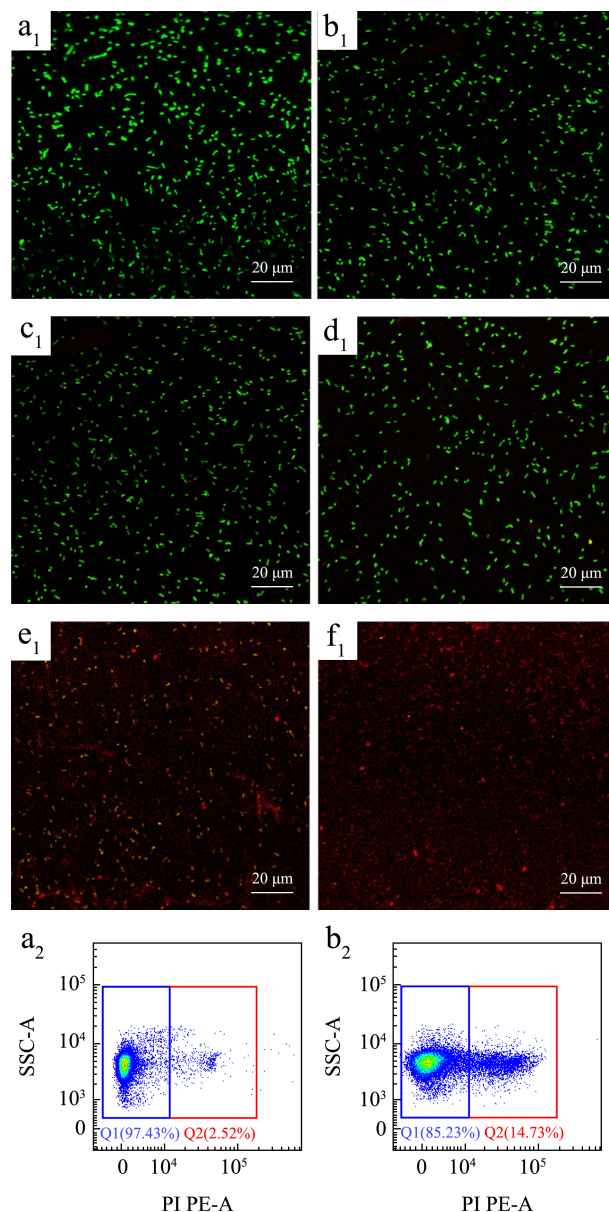
超声联合 CN 对卷心菜表面鼠伤寒沙门氏菌杀菌效果如图 7 所示, 在单独 UW、超声和 CN 处理以及超声联合 CN 处理后, 卷心菜表面的鼠伤寒沙门氏菌存活量从最初的 7.22 lg CFU/g 降低了 0.26~0.73 lg CFU/g, 单独超声处理后卷心菜表面的鼠伤寒沙门氏菌存活量下降最多, 为 0.73 lg CFU/g。与单独使用超声和 CN 处理相比, 超声联合 CN 处理导致鼠伤寒沙门氏菌的存活

量显著 ($P < 0.05$) 减少, 减少量为 0.89~2.01 lg CFU/g, 且超声联合 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理后卷心菜表面的鼠伤寒沙门氏菌存活量下降最多, 为 2.01 lg CFU/g。

2.9.2 超声联合CN对卷心菜颜色和硬度的影响

经超声和 CN 处理的鼠伤寒沙门氏菌对卷心菜颜色和硬度的影响如表 3 所示。对照组的 L^* 为 73.42, a^* 为 -4.53, b^* 为 17.62, ΔE 为 1.66, 经超声联合 0.20 和 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理后卷心菜 L^* 、 a^* 、 b^* 和总色差 (ΔE) 均无显著变化 ($P > 0.05$)。

对照组的硬度为 1.10 kg, 经超声联合 0.20 和 0.30 mg·mL⁻¹ CN 处理后卷心菜硬度分别为 1.06、1.07 kg。与对照组相比, 处理组的硬度无显著变化 ($P > 0.05$)。



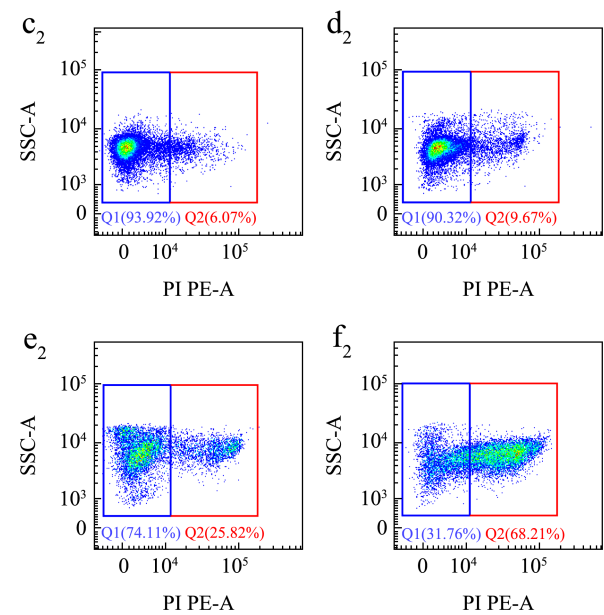


图 6 不同处理后鼠伤寒沙门氏菌的 CLSM 和 FCM 图像

Fig.6 FCM and CLSM images of *Salmonella typhimurium* after different treatments

注：下标 1 为 CLSM，下标 2 为 FCM。a 为对照（未处理）；b 为 US（ $161\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ），c 为 $0.20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN，d 为 $0.30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN，e 为 $\text{US}+0.20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN，f 为 $\text{US}+0.30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN。CLSM，放大倍率 $400\times$ ，条形标记 $20\text{ }\mu\text{m}$ 。FCM，Q1：细胞膜完整的细胞；Q2：细胞膜损伤的细胞。

在该研究中，与单独的超声和 CN 处理相比，超声联合 CN 处理对于去除卷心菜表面的细菌更有效（图 7），并且对其颜色和硬度没有显著影响。类似的研究表明，与两种单独的处理相比，超声联合山苍子精油纳米乳也显著去除了樱桃番茄中的细菌，而对其质量没有显著影响^[30]。综上所述，超声联合 CN 有潜力作为一种去除蔬菜表面食源性病原体和保持蔬菜品质的清洁方法。

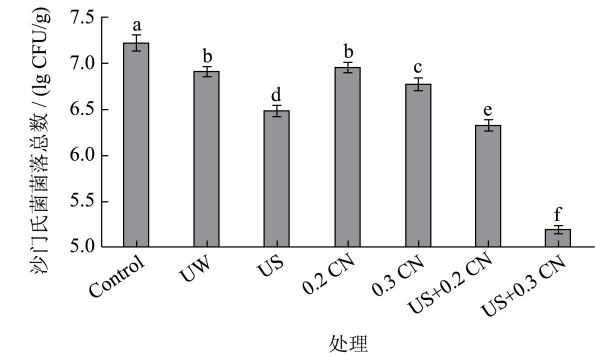


图 7 不同处理下卷心菜接种鼠伤寒沙门氏菌的存活量

Fig. 7 Survival amount of *Salmonella typhimurium* inoculated on cabbages under different treatments

注：US， $207\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ；0.2 CN， $0.20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN；0.3 CN， $0.30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN。

处理方式	色度参数				硬度 /kg
	L^*	a^*	b^*	ΔE	
Control	73.42 ± 0.26^a	-4.53 ± 0.28^a	17.62 ± 0.20^a	1.66 ± 0.28^a	1.10 ± 0.13^a
UW	73.51 ± 0.20^a	-4.66 ± 0.10^a	17.34 ± 0.15^a	1.38 ± 0.02^a	1.15 ± 0.12^a
$0.20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN	73.41 ± 0.10^a	-4.45 ± 0.30^a	17.40 ± 0.31^a	1.48 ± 0.26^a	1.09 ± 0.09^a
$0.30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN	73.45 ± 0.35^a	-4.75 ± 0.12^a	17.25 ± 0.34^a	1.38 ± 0.21^a	0.99 ± 0.13^a
$207\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ US	73.57 ± 0.36^a	-4.64 ± 0.11^a	17.41 ± 0.28^a	1.44 ± 0.10^a	1.05 ± 0.13^a
$\text{US}+0.20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN	73.47 ± 0.18^a	-4.74 ± 0.32^a	17.54 ± 0.25^a	1.60 ± 0.26^a	1.06 ± 0.13^a
$\text{US}+0.30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN	73.49 ± 0.32^a	-4.46 ± 0.17^a	17.33 ± 0.36^a	1.41 ± 0.19^a	1.07 ± 0.13^a

注：结果用平均值 ± 标准差表示。不同的小写字母表示同一列中任何平均值具有统计学显著差异（ $P<0.05$ ）。

3 结论

该研究超声处理制备的表面活性剂（Tween 80）与香芹酚体积比为 1:1.25 的 CN 平均粒径为 149.40 nm ，PDI 为 0.27，液滴分布集中，均匀性好。超声联合 CN 处理对鼠伤寒沙门氏菌具有显著的协同杀菌作用，杀菌协同值分别为 1.35 和 1.33。其中的机制可能包括：超声空化在细胞膜表面形成微孔，破坏了细胞膜的稳定性，增加 CN 进入细胞的几率并增强了其杀菌活性；超声联合 CN 处理导致细菌氧化应激，与对照组和单独超声或 CN 处理组相比，超声联合 $0.30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CN 处理的 ROS 水平显著升高到

1 866.99, MDA 含量显著增加到 $1.25 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, 导致细菌氧化损伤甚至最终死亡; 超声联合 CN 处理还使细胞的形态皱缩干瘪, 破坏了细胞膜的完整性并促进了细胞内容物的泄漏, 从而加速了细胞死亡。此外, 超声联合 CN 处理可有效清除卷心菜表面的鼠伤寒沙门氏菌, 使其存活量显著降低 $0.89 \sim 2.01 \lg \text{ CFU/g}$, 且对卷心菜的色泽和硬度无显著影响。综上所述, 超声联合 CN 在去除果蔬表面鼠伤寒沙门氏菌具有良好的效果, 该研究为超声联合 CN 处理作为一种提高新鲜农产品安全性的新型杀菌方法提供了理论依据。

参考文献

- [1] BOTTIEAU E, VAN DUFFEL L, EL SAFI S, et al. Etiological spectrum of persistent fever in the tropics and predictors of ubiquitous infections: a prospective four-country study with pooled analysis [J]. BMC Medicine, 2022, 20(1): 1-11.
- [2] GALÁN-RELAO NGELA, VALERO DÍAZ ANTONIO, HUERTA LORENZO BELÉN, et al. *Salmonella* and Salmonellosis: An update on public health implications and control strategies [J]. Animals (2076-2615), 2023, 13(23): 13233666.
- [3] TOROVI L, VUKOVI G, DIMITROV N. Pesticide residues in fruit juice in Serbia: Occurrence and health risk estimates [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 99: 103889.
- [4] FAN K, ZHANG M, JIANG F J. Ultrasound treatment to modified atmospheric packaged fresh-cut cucumber: Influence on microbial inhibition and storage quality [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 54: 162-170.
- [5] PARK J B, KANG J H, SONG K B. Improving the microbial safety of fresh-cut endive with a combined treatment of cinnamon leaf oil emulsion containing cationic surfactants and ultrasound [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(4): 503-509.
- [6] BAI Y, SHI C H, MA X L, et al. Encapsulation of Zn/Co nanocrystals into sponge-like 3D porous carbon for *Escherichia coli* inactivation coupled with ultrasound: Characterization, kinetics and inactivation mechanism [J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 447: 137545.
- [7] JIANG Q Y, ZHANG M, XU B G. Application of ultrasonic technology in postharvested fruits and vegetables storage: A review [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 69: 105261.
- [8] HUU C N, RAI R, YANG X, et al. Synergistic inactivation of bacteria based on a combination of low frequency, low-intensity ultrasound and a food grade antioxidant [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 74: 105567.
- [9] SUNTRES Z E, COCCIMIGLIO J, ALIPOUR M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2015, 55(3): 304-318.
- [10] ABDELMALEK L, FATIHA M, LEILA N, et al. Computational study of inclusion complex formation between carvacrol and beta-cyclodextrin in vacuum and in water: Charge transfer, electronic transitions and NBO analysis [J]. Journal of Molecular Liquids, 2016, 224: 62-71.
- [11] LIN L, PENG S X, CHEN X C, et al. Silica nanoparticles loaded with caffeic acid to optimize the performance of cassava starch/sodium carboxymethyl cellulose film for meat packaging [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 241: 124591.
- [12] DAI J M, LI C Z, CUI H Y, et al. Unraveling the anti-bacterial mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against *E. coli* O157:H7 and its application in vegetable juices [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 338: 108989.
- [13] LIAO S L, YANG G, WANG Z R, et al. Ultrasonic preparation of Tween-essential oil (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc) oil/water nanoemulsion: Improved stability and alleviation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm [J]. Industrial Crops & Products, 2022, 188: 115654.
- [14] GUO M M, ZHANG L J, HE Q, et al. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 66: 104988.
- [15] HE Q, LIU D H, ASHOKKUMAR M, et al. Antibacterial mechanism of ultrasound against *Escherichia coli*: Alterations in membrane microstructures and properties [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 73(1): 105509.
- [16] YANG H, SONG L Y, SUN P W, et al. Synergistic bactericidal effect of ultrasound combined with citral nanoemulsion on *Salmonella* and its application in the preservation of purple kale [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 92: 106269.
- [17] DÍAZ-GARCÍA D, ARDILES P R, DÍAZ-SÁNCHEZ M, et al. Copper-functionalized nanostructured silica-based systems: Study of the antimicrobial applications and ROS generation against gram positive and gram negative bacteria [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2020, 203: 110912.
- [18] HU Z Y, XIAO Y P, WANG B K, et al. Combined treatments of low dose irradiation with antimicrobials for inactivation of foodborne pathogens on fresh pork [J]. Food Control, 2021, 125: 107977.
- [19] TIAN L, WANG X Y, LIU R J, et al. Antibacterial mechanism of thymol against *Enterobacter sakazakii* [J]. Food Control, 2021, 123(1): 107716.
- [20] NIETO-VELÁZQUEZ N G, GOMEZ-VALDEZ A A, GONZÁLEZ-ÁVILA M, et al. Preliminary study on citrus oils antibacterial activity measured by flow cytometry: A step-by-step development [J]. Antibiotics, 2021, 10(10): 1218.
- [21] COSKUN E, OZTURK S, AKPINAR M, et al. Effect of far infrared heating process on surface decontamination and quality attributes of whole yellow and white onions [J]. Food Control, 2021, 130: 108376.
- [22] YAZGAN H. Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 130: 109669.
- [23] ROBLEDON, VERA P, LOPEZ L, et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes [J]. Food Chemistry, 2018, 246: 211-219.
- [24] YANG H, ZHAN X J, SONG L Y, et al. Synergistic antibacterial and anti-biofilm mechanisms of ultrasound combined with citral nanoemulsion against *Staphylococcus aureus* 29213 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 391: 110150.

- [25] LI J, AHN J, LIU D H, et al. Evaluation of ultrasound-induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1828.
- [26] LI J, MA L Y, LIAO X Y, et al. Ultrasound-Induced *Escherichia coli* O157:H7 cell death exhibits physical disruption and biochemical apoptosis [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 02486.
- [27] PERALTA D R, ADLER C, CORBALÁN N S, et al. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire [J]. Plos One, 2016, 11(6): e0157799.
- [28] JANERO D R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1990, 9(6): 515-540.
- [29] LOH B, GRANT C, HANCOCK R E. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1984, 26(4): 546-551.
- [30] SU R Y, GUO X Y, CHENG S, et al. Inactivation of *Salmonella* using ultrasound in combination with *Litsea cubeba* essential oil nanoemulsion and its bactericidal application on cherry tomatoes [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 98:106481.