

# 纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑制作用

索标<sup>1,2,3</sup>, 李化嵘<sup>1</sup>, 王娜<sup>3</sup>, 范会平<sup>3</sup>, 潘治利<sup>1</sup>, 谢新华<sup>1</sup>, 艾志录<sup>1,2,3</sup>

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南郑州 450002) (2. 河南粮食作物协同创新中心, 河南郑州 450002)

(3. 速冻面米及调制食品河南省工程实验室, 河南郑州 450002)

**摘要:** 研究 37 °C 条件下不同浓度纳米和非纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑制作用, 以及低温 (4 和 -18 °C) 对纳米氧化镁抑菌作用的影响, 并通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察了 37 °C 条件下纳米氧化镁处理前后单核细胞增生李斯特菌细胞形态的变化。结果表明, 37 °C 条件下, 纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的生长具有明显的抑制作用, 且抑菌效果随着纳米氧化镁浓度的增加而增大。在中性缓冲溶液中纳米氧化镁仍具有抑菌效果, 但同浓度的非纳米氧化镁以及与纳米氧化镁同 pH 的碱性条件对单核细胞增生李斯特菌均无显著的抑制作用, 因而推测纳米氧化镁的纳米材料特性是其抑菌的主要因素。在低温条件下, 对照组单核细胞增生李斯特菌在 4 °C 条件下能缓慢生长, -18 °C 条件下呈现下降趋势, 添加纳米氧化镁后单核细胞增生李斯特菌的生长均受到显著抑制。37 °C 条件下的扫描电镜结果显示, 1.5 mg/mL 纳米氧化镁处理后单核细胞增生李斯特菌的菌体有所变长。

**关键词:** 纳米氧化镁; 单核细胞增生李斯特菌; 低温; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2015)12-161-165

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.024

## Antibacterial Activity of Magnesium Oxide Nanoparticles against *Listeria monocytogenes*

SUO Biao<sup>1,2,3</sup>, LI Hua-rong<sup>1</sup>, WANG Na<sup>3</sup>, FAN Hui-ping<sup>3</sup>, PAN Zhi-li<sup>1</sup>, XIE Xin-hua<sup>1</sup>, AI Zhi-lu<sup>1,2,3</sup>

(1. Institute of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

(2. Collaborative Innovation Center of Henan food crops, Zhengzhou 450002, China)

(3. Henan Key Laboratory Base Quick-frozen Flour-rice and Prepared Food, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The antibacterial effects of different concentrations of magnesium oxide (MgO) nanoparticles and non-nano MgO particles on *Listeria monocytogenes* were investigated in this study. Additionally, the impact of low temperature (4 and -18 °C) on the antibacterial effect of MgO nanoparticles was studied. Scanning electron microscopy (SEM) was used to characterize the morphological changes of *L. monocytogenes* before and after MgO nanoparticle treatment at 37 °C. The results showed that MgO nanoparticles had strong antibacterial activity against *L. monocytogenes* at 37 °C, in a concentration dependent manner. In addition, MgO nanoparticles showed antibacterial effect in a neutral buffer solution, whereas non-nano MgO at the same concentration had almost no antibacterial effect, along with the alkaline condition with the same pH that was used for MgO nanoparticles. Thus, it is speculated that the main antibacterial factors are the nanomaterial properties of MgO nanoparticles. At low temperature, the *L. monocytogenes* in the control group grew slowly at 4 °C, with growth showed a downward trend at -18 °C. The growth rate of *L. monocytogenes* was significantly inhibited by the addition of MgO nanoparticles at low temperatures. SEM analysis at 37 °C showed that *L. monocytogenes* cells were elongated after treatment with MgO nanoparticles.

**Key words:** magnesium oxide nanoparticles; *Listeria monocytogenes*; low temperature; antibacterial activity

食源性致病菌是引起人类发病和死亡的主要因素之一<sup>[1]</sup>。国内外已报道的爆发性食物中毒事件中有

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1204331); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD37B07, 2015BAD16B04)

作者简介: 索标 (1982-), 男, 博士, 副教授, 主要从事食品微生物分子生态与食品安全研究

通讯作者: 艾志录 (1965-), 男, 博士, 教授, 主要从事速冻食品及主食产业化工程理论与技术研究

66%是由细菌引起的<sup>[2]</sup>, 单核细胞增生李斯特菌是其中常见的食源性致病菌之一, 并且具有一定的耐药性<sup>[3]</sup>, 可使人畜患脑膜炎、心肌炎、败血症、早产等疾病, 危害较大<sup>[4]</sup>。将抑菌剂直接添加在食品中或是添加在食品包装中是确保食品安全最有效的途径之一<sup>[5]</sup>, 因此为了进一步提高食品的安全性并延长食品货架期, 开发新的抑菌剂显得尤为必要。

无机抗菌剂与有机、天然抗菌剂相比具有安全、耐热、持久等优点<sup>[6]</sup>, 自从 20 世纪 90 年代 Sawai 等

人<sup>[7]</sup>研究发现金属氧化物 ZnO、MgO 和 CaO 的抑菌性并证明其对革兰氏阳性菌和阴性菌均有很强的抑菌效果后,关于金属氧化物特性的研究便受到国内外科学界的广泛关注。纳米金属氧化物以其较小的粒径、独特的微观结构和大的比表面积与普通氧化物相比有着更好的物理、化学和生物特性<sup>[8]</sup>。纳米氧化镁不仅价格低廉,热稳定性好,还含有人体必需的矿物质元素,具有高生物相容性<sup>[9]</sup>。

近年来的研究证明纳米氧化镁对大肠杆菌、假单胞菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有较好的抑菌活性<sup>[10][11]</sup>,而对单核细胞增生李斯特菌的抑制尚未有报道。由于单核细胞增生李斯特菌在低温食品中也经常被检出<sup>[12]</sup>,因此本论文研究了不同浓度纳米氧化镁在低温条件下对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果,并通过扫描电镜观察了纳米氧化镁处理前后菌体形态的变化,初步分析了其抑菌作用机制,研究结果可以为纳米氧化镁作为抑菌剂应用于食品行业提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

单核细胞增生李斯特菌 ATCC27708,美国标准菌种收藏所,-80℃甘油管保存。

胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB),北京陆桥技术有限责任公司;酵母浸粉,生工生物工程(上海)有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯),天津市永大化学试剂有限公司。使用时均按使用说明配制。

纳米氧化镁(<50 nm)阿拉丁试剂(上海)有限公司。

### 1.2 仪器与设备

SX-500 高压蒸汽灭菌锅,日本 Tomy 公司;JJ-CJ-2F,金净洁净工作台,吴江市净化设备总厂;BS-S 氧浴恒温振荡器,国华企业;LHP-250 智能恒温恒湿培养箱,上海鸿都电子科技有限公司;DHG-9143B5III 电热恒温鼓风干燥箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;WH-966 漩涡混合器,上海康华生化仪器制造厂;FA2004A 电子天平,上海精天电器有限公司。TGL-16G 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;S-3400N-II 型扫描电镜,日本日立公司

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌悬液制备

在无菌条件下,将供试菌株 ATCC27708 接种到 TSA 平板,37℃培养 18~24 h,挑选典型菌落接种于已灭菌的 TSB 培养基中培养至指数后期(约  $10^7\sim 10^8$  cfu/mL),备用。

#### 1.3.2 不同浓度条件下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌生长曲线影响的测定

纳米氧化镁在 180℃下干热灭菌 30 min,用无菌 TSB 溶解并稀释,使纳米氧化镁终浓度分别为 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL,不加抑菌剂的一组作为阴性对照,用 PBS 将受试菌株进行 10 倍梯度稀释,取 100 μL 菌液加入上述液体培养基中(约为  $10^3$  CFU/mL),并以此时作为 0 h,测定初始菌落数。在 37℃培养箱中摇床培养,每隔一定时间测定一次菌液中的菌落数,并绘制曲线。实验中菌落计数方法均采用 6×6 点样计数法<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.3 纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑菌因素的研究

用 pH 为 7.0 的磷酸钠缓冲溶液配置 TSB 培养基,确保加入纳米氧化镁后的培养基仍为中性,按照 1.3.2 的方法研究中性 pH 值条件下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌生长的影响,另用氢氧化钠溶液调节 TSB 培养基的 pH 值分别为 9 和 10,按照上述方法研究碱性 pH 值对单核细胞增生李斯特菌生长的影响。并用非纳米氧化镁抑菌实验研究  $Mg^{2+}$  对单核细胞增生李斯特菌抑制作用的影响。

#### 1.3.4 不同温度条件下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌生长曲线影响的测定

准确称取 15 mg 的纳米氧化镁溶于装有 9.9 mL 无菌 TSB 的 PA 瓶中使之分散均匀。用 PBS 将受试菌株进行 10 倍梯度稀释,取 100 μL 菌液加入之前配好的液体培养基中(约为  $10^3$  CFU/mL),并以此时作为 0 h,测定初始菌落数。然后分别在 37℃培养箱、4℃和-18℃冰箱中培养,每隔一定时间测定一次菌液中的菌落数,并绘制曲线。

#### 1.3.5 细胞形态的扫描电镜观察

分别取 37℃条件下 1.5 mg/mL 的纳米氧化镁处理 24 h 的实验组和未经纳米氧化镁处理的对照组菌液各 1 mL 于离心管中,4000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用 1×PBS 清洗 2~3 次,离心弃上清,沉淀用 4% 的戊二醛固定过夜,用 1×PBS 洗涤戊二醛残留,再用 2% 戊二醛进行二次固定,1×PBS 洗涤,分别用 20%、50%、80%、100% (两次)体积分数的乙醇进行梯度脱水,处理 10 min,使脱水后的菌体分散在 1×1 cm 的铝箔纸上,自然风干,菌体表面喷金进行扫描电镜观察。

### 1.4 数据处理

采用 Excel 2003 进行均值和标准差计算; 采用 SPSS 17.0 的 ANOVA 进行显著性分析, 显著水平为 0.05。

## 2 结果与讨论

### 2.1 37 °C 条件下不同浓度纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑菌活性

37 °C 条件下, 对照组单核细胞增生李斯特菌能够正常生长, 添加纳米氧化镁后单核细胞增生李斯特菌的生长受到抑制(图 1)。除了 0.1 mg/mL 的纳米氧化镁抑菌效果不显著( $P>0.05$ )外, 其他各组均能显著抑制单核细胞增生李斯特菌的生长( $P<0.05$ )。在小于等于 1.5 mg/mL 的浓度下, 随着纳米氧化镁浓度的增加抑菌效果逐渐增大, 大于 1.5 mg/mL 时, 各浓度之间抑菌效果略有增加但效果差异不显著( $P>0.05$ ), 菌落数基本维持在初始菌落数附近, 由此可见, 纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌是抑菌作用而非杀菌作用。而 Jin 等人<sup>[10]</sup>研究得到纳米氧化镁对大肠杆菌具有杀菌作用, 说明纳米氧化镁对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑菌作用方式不同。

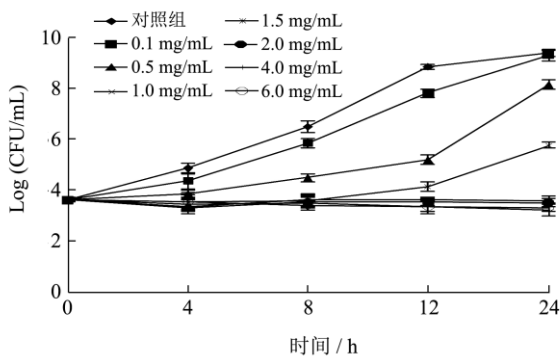


图 1 37 °C 下不同浓度纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果

Fig.1 Antibacterial activity of different concentrations of MgO nanoparticles against *L. monocytogenes* at 37 °C

### 2.2 中性缓冲条件下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑菌活性

由于纳米氧化镁溶液呈现一定的碱性, 随着浓度的增大碱性逐渐增加, 因此用磷酸盐缓冲溶液调节培养基的 pH 值为  $7.00 \pm 0.02$  进行实验, 结果如图 2 所示,

可见在中性条件下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌也具有较好的抑菌效果, 并且随着浓度的增加抑菌效果增大。但与图 1 相比, 同浓度纳米氧化镁的抑菌效果在中性条件下比在碱性条件下略低, 说明纳米氧化镁的碱性特性与其纳米材料的特性对抑制单核细胞增生李斯特菌的生长具有一定的协同作用。

### 2.3 非纳米氧化镁及碱性 pH 条件对单核细胞增生李斯特菌的抑菌活性

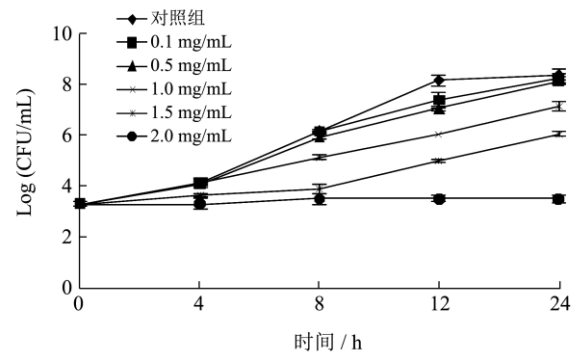


图 2 中性缓冲条件下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果

Fig.2 Antibacterial activity of MgO nanoparticles against *L. monocytogenes* in a neutral buffer solution

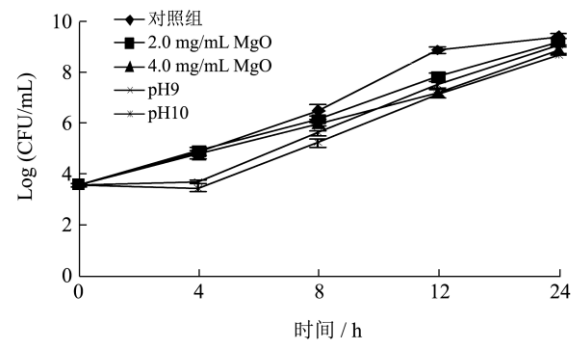


图 3 非纳米氧化镁及碱性 pH 条件对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果

Fig.3 Antibacterial activity of MgO and alkaline pH values against *L. monocytogenes*

为了进一步了解碱性条件对单核细胞增生李斯特菌生长的影响, 根据不同浓度纳米氧化镁呈现出的 pH 值范围, 分别调节培养基的 pH 值为 9 和 10 研究碱性条件对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果, 与非纳米氧化镁的抑菌效果如图 3 所示。可见, 非纳米氧化镁和碱性条件对单核细胞增生李斯特菌也具有一定的抑制作用, 但效果不显著( $P>0.05$ ), 两者对单核细胞增生李斯特菌的抑制作用与 0.1 mg/mL 的纳米氧化镁的抑菌效果相当。由此证明碱性并不是纳米氧化镁

抑菌的主要原因<sup>[14]</sup>。而非纳米氧化镁的抑菌效果显著低于同浓度的纳米氧化镁的抑菌效果,说明纳米氧化镁的抑菌效果与  $Mg^{2+}$  的浓度无关,这一结果与前人研究的氧化镁抑菌效果与  $Mg^{2+}$  的存在无关这一结果基本一致<sup>[15]</sup>。

## 2.4 低温条件下纳米氧化镁的抑菌活性

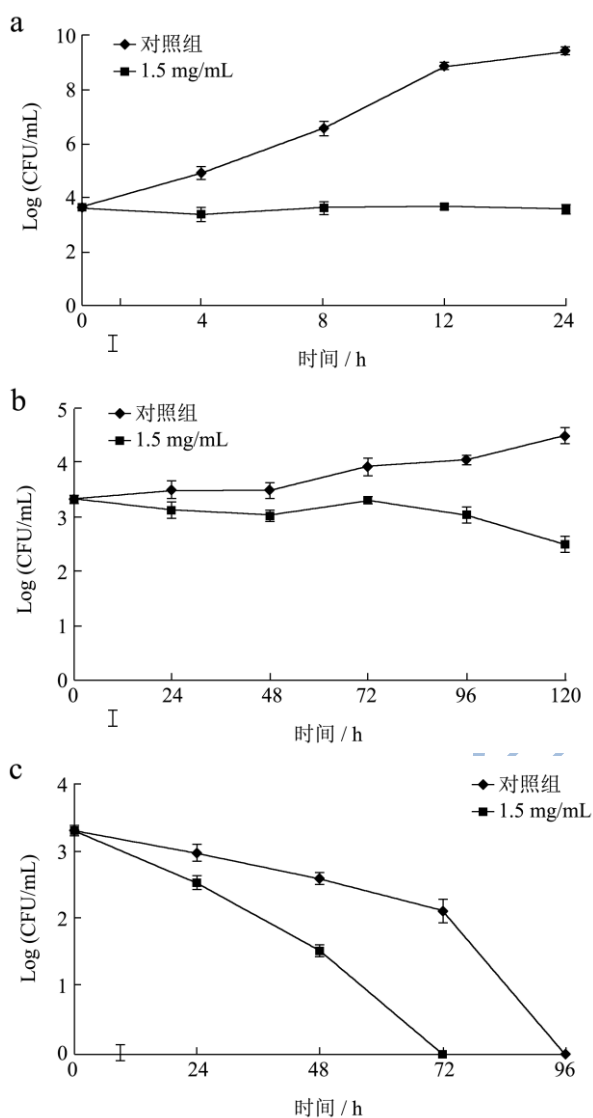


图4 不同温度下纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果

Fig.4 Inhibition effects of MgO nanoparticles on *L. monocytogenes* at different temperatures

注: a表示 37 °C; b表示 4 °C; c表示 -18 °C。

除了 37 °C 时纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌具有抑菌作用,在低温 4 °C 和 -18 °C 条件下,与对照组相比,纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌也表现出良好抑菌效果(图 3),但是与 37 °C 相比抑菌效果有所延迟。37 °C 条件下,1.5 mg/ml 的纳米氧化镁从 4 h 开始时便表现出抑制单核细胞增生李斯特菌的

生长的效果。4 °C 条件下,对照组单核细胞增生李斯特菌呈现缓慢上升的趋势,纳米氧化镁处理的单核细胞增生李斯特菌数目在 72 h 之前一直保持平稳缓慢下降趋势,72 h 之后开始迅速下降,在 120 h 时菌落数与对照组相比降低 3Log CFU/mL。-18 °C 条件下,单核细胞增生李斯特菌对对照组和处理组菌落数均呈现下降趋势,分别在 96 h 和 72 h 达到不可检出水平,说明 -18 °C 的低温和纳米氧化镁对单核细胞增生李斯特菌具有协同抑制作用。对照组结果也进一步证明在低温 4 °C 下单核细胞增生李斯特菌仍然可以缓慢生长<sup>[16]</sup>。

## 2.5 扫描电镜结果分析

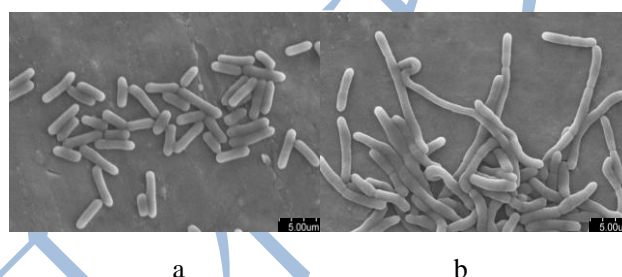


图5 纳米氧化镁处理前后单核细胞增生李斯特菌的扫描电镜图

Fig.5 Scanning electron micrographs of *L. monocytogenes* incubated with and without MgO nanoparticles

注: a. 37 °C TSB 培养 24 h; b. 37 °C 纳米氧化镁处理 24 h。

37 °C 条件下经过 1.5 mg/mL 纳米氧化镁处理前后单核细胞增生李斯特菌形态的变化如图 5 所示,对照组单核细胞增生李斯特菌(图 5a)菌体表面光滑,呈较规则的杆状,纳米氧化镁处理后(图 5b)菌体有所变长,并且粗细不均匀。菌体越细长,其与外界环境的接触面积越大,与球状菌相比抵抗外界环境胁迫的能力越弱<sup>[17]</sup>,纳米氧化镁改变了单核细胞增生李斯特菌正常的菌体形态,使菌体变长,由此推测纳米氧化镁可能降低了单核细胞增生李斯特菌的抗胁迫能力。目前关于纳米氧化物的抑菌机理一方面是因为纳米氧化物表面的氧空位增强了细菌的氧化应激反应,菌体产生的活性氧物质增多,从而使细胞内化受损导致菌体死亡<sup>[18-19]</sup>。另一方面是纳米金属氧化物与菌体的静电相互作用,使菌体膜产生机械性损伤导致菌体死亡<sup>[20]</sup>。

## 3 结论

3.1 37 °C 条件下,在小于等于 1.5 mg/mL 的浓度下,随着纳米氧化镁浓度的增加抑菌效果逐渐增大,大于 1.5 mg/mL 时,各浓度之间抑菌效果略有增加,但差异不显著。中性缓冲条件下的结果表明纳米氧化镁的

碱性特性和其纳米材料特性协同抑制单核细胞增生李斯特菌的生长。

3.2 非纳米氧化镁和碱性条件对单核细胞增生李斯特菌有一定的抑制作用,但与对照组相比效果不显著。说明纳米氧化镁的抑菌效果与  $Mg^{2+}$  的存在无关。碱性特性虽然参与抑制了单核细胞增生李斯特菌的生长,但并非纳米氧化镁抑菌的主要原因,并推测纳米氧化镁的纳米材料特性是其抑菌的主要因素。

3.3 在低温(4 °C和-18 °C)条件下,对照组单核细胞增生李斯特菌在 4 °C 条件下能缓慢生长,添加纳米氧化镁后其生长受到显著抑制,而在-18 °C 条件下对照组单核细胞增生李斯特菌菌落数迅速下降,与添加纳米氧化镁后的处理组分别在 96 h 和 72 h 达到不可检出水平。低温和纳米氧化镁协同抑制了单核细胞增生李斯特菌的生长,可以考虑将其作为抗菌材料来延长食品保质期。

3.4 扫描电镜观察了 37 °C 条件下 1.5 mg/mL 纳米氧化镁处理前后单核细胞增生李斯特菌体形态的变化,可以看出,纳米氧化镁的处理使单核细胞增生李斯特菌体粗细不均匀,并有所变长。

#### 参考文献

- [1] CHAN S F, CHAN Z C Y. A review of foodborne disease outbreaks from 1996 to 2005 in HongKong and its implications on food safety promotion [J]. *Journal of Food Safety*, 2008, 28: 276-299
- [2] 史贤明,施春雷,索标,等.食品加工过程中致病菌控制的关键科学问题[J].*中国食品学报*,2011,11(9): 194-208  
SHI Xian-ming, SHI Chun-lei, SUO Biao, et al. Key scientific issues on the control of foodborne pathogens during food processing [J]. *Journal of Chinese institute of food science and technology*, 2011, 11(9): 194-208
- [3] 闫鹤,陈妙瑞,石磊.食源性单核细胞增生李斯特菌四环素、红霉素耐药基因研究[J].*现代食品科技*,2010,26(8): 772-849  
YAN He, CHEN Miao-ru, SHI Lei. Tetracycline and Erythromycin Resistant Genes in Foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(8): 772-849
- [4] Renato H O, Henk C B, Martin W. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301: 79-96
- [5] Xie Y P, He Y P, Peter L, et al. IrwinAntibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni* [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, 77(7): 2325-2331
- [6] Mohammad J H, Katharina M F, Ali A A, et al. Antibacterial properties of nanoparticles [J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(10): 499-511
- [7] Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54: 177-182
- [8] Rachel L. Metal-oxide nanoparticles increase the bactericidal effect of blue light [J]. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2012, 30(3): 115-117
- [9] Zeyneb C, Sema E, Sabriye Y. Magnesium oxide nanoparticles: preparation, characterization, and uranium sorption properties [J]. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2012, 31(4): 536-543
- [10] Jin T, He Y P. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens [J]. *Nanopart Res.*, 2011, 13: 6877-6885
- [11] Karthikeyan K, Govindasamy M, Sang J K, et al. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy [J]. *Nanopart Res*, 2012, 14: 1063
- [12] Mastronicolis S K, Boura A, Karaliota A, et al. Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: Focus on neutral lipids [J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 184-194
- [13] Chen C Y, Nace G W, Irwin P L. A 6×6 drop plate method for simultaneous colonycounting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 475-479
- [14] Dong C X, Cairney J, Sun Q H, et al. Investigation of  $Mg(OH)_2$  nanoparticles as an antibacterial agent [J]. *Nanopart Res.*, 2010, 12: 2101-2109
- [15] Sawai J, Kojima H, Igarashi H, et al. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2000, 16: 187-194
- [16] 赵丽,蔡阳,黄伟,等.单核细胞增生李斯特菌液相芯片检测方法建立[J].*现代食品科技*,2014,30(4):296-300  
ZHAO Li, CAI Yang, HUANG Wei, et al. Establishment of a liquidchip method for *Listeria Monocytogenes* detection [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 296-300
- [17] Mutlu P, Yousef A, Alpas H. Physiological changes of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*

- following exposure to high hydrostatic pressure [J]. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2013, 8(3): 175-183
- [18] Applerot, Lipovsky A, Dror R, et al. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury [J]. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19: 842-852
- [19] Manuela V, Ingo K, Kwade A. Zinc oxide nanoparticles in bacterial growth medium: optimized dispersion and growth inhibition of *Pseudomonas putida* [J]. *Advances in Nanoparticles*, 2013, 2: 287-293
- [20] Zhang L L, Ding Y L, Povey M, et al. ZnO nanofluids-a potential antibacterial agent [J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18: 939-944

现代食品科技