

百里酚对奇异变形杆菌生物膜的抑制作用及其机制研究

王钰雯, 汪辉, 张海兵, 陈向东*

中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京

王钰雯, 汪辉, 张海兵, 陈向东. 百里酚对奇异变形杆菌生物膜的抑制作用及其机制研究[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2061-2071.
WANG Yuwen, WANG Hui, ZHANG Haibing, CHEN Xiangdong. Inhibitory effect and mechanism of thymol on biofilm formation of *Proteus mirabilis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2061-2071.

摘要: 【目的】研究百里酚对奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, PM)生物膜的抑制作用及其潜在机制。【方法】采用微量肉汤稀释法测定百里酚的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)和最低生物膜抑制浓度(minimal biofilm inhibitory concentration, MBIC); 采用菌落计数法测定百里酚的时间-杀菌曲线; 结晶紫染色法测定百里酚对生物膜形成的抑制作用; 测定百里酚对奇异变形杆菌群集运动和泳动能力的影响; 测定百里酚对生物膜胞外聚合物(胞外多糖、胞外蛋白、eDNA)的影响; 采用实时荧光定量 PCR 法测定百里酚对奇异变形杆菌生物膜相关基因表达量的影响, 涉及的基因包括 *rsbA* (双组分系统中组氨酸激酶感应蛋白基因)、*flhD* (鞭毛一级调控子基因) 和 *mrpA* (耐甘露糖样变形杆菌菌毛基因)。【结果】百里酚对奇异变形杆菌的 MIC 为 0.156 mg/mL, MBIC 为 0.313 mg/mL, 可显著抑制生物膜的形成。百里酚抑制奇异变形杆菌的运动能力, 抑制生物膜胞外多糖、蛋白质和 eDNA 的形成, 同时抑制 *rsbA*、*flhD* 和 *mrpA* 基因的表达。【结论】百里酚可以抑制奇异变形杆菌生物膜的形成, 其机制可能与抑制细菌运动能力、胞外多聚物的形成及菌毛黏附等生物膜相关基因表达有关。

关键词: 百里酚; 奇异变形杆菌; 生物膜; 抑制作用; 机制

*Corresponding author. E-mail: chenxd@cpu.edu.cn

Received: 2024-11-11; Accepted: 2025-01-10; Published online: 2025-02-26

Inhibitory effect and mechanism of thymol on biofilm formation of *Proteus mirabilis*

WANG Yuwen, WANG Hui, ZHANG Haibing, CHEN Xiangdong*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the inhibitory effect and mechanism of thymol on the biofilm formation of *Proteus mirabilis* (PM). [Methods] The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal biofilm inhibitory concentration (MBIC) of thymol were determined by the broth micro-dilution method. The time-kill curve of thymol was established by the colony counting method. Crystal violet staining was performed to determine the inhibitory effect of thymol on the biofilm formation of PM. The effects of thymol on the swarming and swimming of PM and the extracellular polymeric substances (extracellular polysaccharides, extracellular proteins, and eDNA) of the biofilm were determined. RT-qPCR was employed to investigate the effects of thymol on the expression levels of PM biofilm-related genes: *rsbA* (encoding histidine-containing phosphotransmitter of the bacterial two-component system), *flhD* (encoding the flagellar regulon), and *mrpA* (encoding mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae). [Results] The MIC of thymol against PM was 0.156 mg/mL. Thymol significantly inhibited the biofilm formation of PM, with the MBIC of 0.313 mg/mL. Thymol inhibited the motility of PM, reduced the formation of extracellular polysaccharides, proteins, and eDNA in PM biofilm, and decreased the expression levels of *rsbA*, *flhD*, and *mrpA*. [Conclusion] Thymol inhibits the biofilm formation of PM by suppressing the motility and formation of extracellular polymers and down-regulating the expression of biofilm-related genes.

Keywords: thymol; *Proteus mirabilis*; biofilm; inhibitory effect; mechanism

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, PM)是肠杆菌科变形杆菌属的一种条件致病菌革兰氏阴性菌,具有鞭毛和菌毛。奇异变形杆菌可引起泌尿系统、呼吸道、伤口等多种感染,也可继发引起菌血症,是仅次于大肠埃希菌的泌尿系统感染的主要病原菌^[1],同时也是我国第四大食物中毒病原菌,严重威胁人类健康。近年来,随着抗菌药物的广泛大量使用,细菌的耐药率逐年上升,表明奇异变形杆菌对人类的威胁在不断扩大,抗生素替代品的研究与开发因此受到越来越多科研人员的重视。尽管研究显示奇异变形杆菌的总检出率逐年升高,且在重症监护病房和老年科的占比增加,但大部分医院的关注重

点仍是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌等^[2],耐药奇异变形杆菌尚未引起足够的关注。奇异变形杆菌生物膜的形成是其产生耐药性的重要原因之一,生物膜是指细菌相互聚集或黏附于载体表面后所分泌的胞外多聚物(extracellular polymeric substances, EPS)及其包裹的三维细胞群体^[3]。这种结构显示出更强的环境适应力,生物膜内的细菌处于半休眠状态,降低了对抗菌药物的敏感性,使细菌能够逃避宿主免疫系统且难以被清除,常导致设备相关感染和慢性感染,研究显示产生生物膜的耐药菌每年能造成约 70 万人死亡^[4]。

百里酚(5-甲基-2-异丙基苯酚),是一种单萜

类化合物,天然存在于唇形科植物百里香、牛至以及伞形科植物粗果芹等的种子中^[5],具有抗菌^[5]、抗氧化^[6]、抗炎^[7]等作用,因其毒副作用小、作用速度快、抗菌谱广等优点,在食品、药品、化妆品等领域广泛应用。2020年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)将其列入“一般公认安全”(generally recognized as safe, GRAS)名单。

近年来,有关奇异变形杆菌的研究主要集中在其导致的食物中毒和耐药机制方面,而生物膜的研究则主要集中在抗生素对生物膜的防控和耐药性研究。因此,对奇异变形杆菌生物膜的控制具有重要的研究意义。在此基础上,本研究主要分析了百里酚对奇异变形杆菌生物膜形成的抑制作用,并重点从细菌运动能力、胞外多聚物以及生物膜相关基因 *rsbA*、*flhD*、*mrpA* 的表达,探讨百里酚抑制奇异变形杆菌生物膜形成的作用机制,以期预防及降低因奇异变形杆菌生物膜引起的感染提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

十株临床分离的奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)由南方医科大学南方学院临床检验室提供(编号为5-14)。

1.1.2 主要试剂和仪器

百里酚(含量98%),酷尔化学科技(北京)有限公司;左氧氟沙星,上海麦克林生化科技股份有限公司;MH肉汤培养基,北京索莱宝科技有限公司;DMSO、九水合结晶紫,国药集团化学试剂有限公司;TSB培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;PBS缓冲液,上海碧云天生物技术股份有限公司;硫酸、苯酚,南京化学试剂股份有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、Bacteria RNA Extraction Kit、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR、*Taq* Pro Universal

SYBR qPCR Master Mix,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

酶标仪、S1000™ Thermal Cycler PCR, Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机、超微量分光光度计、QuantStudio 3 real-time PCR System, ThermoFisher Scientific 公司。

1.2 抗生素敏感性试验

采用药敏纸片法^[8]检测临床分离的奇异变形杆菌对常用抗菌药物的敏感性,结果判断依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2019 标准。挑取活化的单菌落,接种于MH肉汤培养基中,37℃、160 r/min 摇床中培养4-5 h,调整菌浓度为 1×10^8 CFU/mL的菌悬液,均匀涂布于培养基表面。将含药纸片贴于含菌平板上,药物包括环丙沙星、左氧氟沙星、亚胺培南、氨苄西林、头孢曲松、庆大霉素、红霉素、氯霉素、复方新诺明、林可霉素。37℃培养16-18 h,观察并记录抑菌圈大小。

1.3 百里酚最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的测定

采用微量肉汤稀释法测定百里酚对奇异变形杆菌的MIC。在96孔板中加入100 μL 稀释好的菌悬液和不同浓度的百里酚,使孔内百里酚终浓度为0.019-5 mg/mL,菌液终浓度为 5×10^5 CFU/mL。以菌悬液和含0.017%-3% DMSO的培养基作为溶剂对照,每组设置3个复孔。37℃培养16-18 h,肉眼观察孔内未见浑浊的最低药物浓度即为MIC,阳性对照为左氧氟沙星。

1.4 百里酚时间-杀菌曲线的测定

将1 mL菌悬液和1 mL药液加入到8 mL MH培养基中,使试管内菌液终浓度为 1×10^6 CFU/mL,百里酚的终浓度分别为4×、2×、1×、1/2×、1/4×、1/8×、1/16×MIC,设置不含药对照组,每个浓度设置8个平行。分别在0、2、4、8、12、24 h取出对应试管,取

100 μL 培养物涂布于 MH 平板上进行菌落计数。

1.5 奇异变形杆菌生物膜生成能力的测定

采用结晶紫染色法^[9]测定奇异变形杆菌生物膜形成能力。预实验测定生物膜生长曲线显示, 24 h 时奇异变形杆菌生物膜已成熟。用 TSB 培养基调整菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL, 取 200 μL 菌液加入到 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后弃去培养物, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 200 μL 99% 甲醇固定 5 min, 室温干燥 5 min, 加入 0.1% 结晶紫 200 μL 染色 15 min。弃去染液后用 PBS 洗涤 3 次, 加入 200 μL 无水乙醇静置 15 min 复溶。待染液完全溶解后测定 595 nm 处的吸光度值, 每株菌设置 3 个复孔, 计算 3 个复孔吸光度的平均值, 空白对照为 200 μL TSB 培养基。

1.6 百里酚最低生物膜抑制浓度(minimal biofilm inhibitory concentration, MBIC)的测定

采用微量肉汤稀释法测定百里酚的 MBIC^[10-11]。用 TSB 培养基调整菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL, 向 96 孔板每孔加入 200 μL 菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后弃去培养物, 用 PBS 洗涤 3 次, 建立生物膜模型。每孔加入 200 μL 含有系列浓度药物的 TSB 培养基, 使孔内百里酚终浓度分别为 $16\times$ 、 $8\times$ 、 $4\times$ 、 $2\times$ 、 $1\times$ 、 $1/2\times\text{MIC}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 每个浓度设置 3 个复孔。肉眼观察孔内未见浑浊的最低药物浓度即为 MBIC, 阳性对照为左氧氟沙星。

1.7 百里酚对生物膜形成的影响

在 96 孔板每孔加入 100 μL 菌悬液和 100 μL 百里酚系列稀释液, 使孔内菌液终浓度为 1×10^6 CFU/mL, 孔内药液终浓度分别为 $1\times$ 、 $1/2\times$ 、 $1/4\times$ 、 $1/8\times$ 、 $1/16\times\text{MIC}$ 。设置无药孔为空白对照, 每个浓度设置 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 用结晶紫染色法测定生物膜生成情况, 并计算抑制率, 如公式(1)所示。

$$\text{抑制率} = (1 - \frac{OD_1}{OD_0}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: OD_1 为处理组吸光度值, OD_0 为对照组吸光度值。

1.8 百里酚对细菌运动能力的影响

在 LB 培养基中分别添加 0.5% 琼脂粉和 0.3% 琼脂粉, 分别配制成群集运动培养基和泳动培养基。高压灭菌后, 恒温至约 45 $^{\circ}\text{C}$ 时加入不同浓度的百里酚, 使其终浓度分别为 $1\times$ 、 $1/2\times$ 、 $1/4\times$ 、 $1/8\times\text{MIC}$, 空白对照组加入等量溶剂。制备好的半固体培养基在室温下过夜干燥。在培养基中央滴入 3 μL 浓度为 1×10^9 CFU/mL 的菌悬液, 待完全吸收后移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置培养 24 h, 观察细菌的群集运动和泳动情况, 并测量直径大小。

1.9 百里酚对生物膜胞外聚合物的影响

1.9.1 胞外聚合物的提取

在 6 孔板中每孔放置一片无菌盖玻片, 每孔加入 2 mL 菌悬液和 2 mL 百里酚药液, 使孔内药物终浓度分别为 $1/2\times$ 、 $1/4\times$ 、 $1/8\times$ 、 $1/16\times\text{MIC}$, 对照组为不含药的菌液, 每个浓度设置 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 用 PBS 洗去浮游菌, 取出盖玻片, 用 PBS 冲洗后超声 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤即得 EPS 样本。

1.9.2 百里酚对胞外多糖的影响

取 200 μL EPS 样本, 采用硫酸苯酚法^[12]测量胞外多糖浓度, 同时以葡萄糖为标准物绘制标准曲线。

1.9.3 百里酚对胞外蛋白的影响

使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒按说明书测量蛋白质含量, 绘制蛋白质标准曲线。在 96 孔板每孔加入 20 μL EPS 样本, 加入 200 μL BCA 工作液, 测定 562 nm 处的吸光度值, 计算蛋白质含量。

1.9.4 百里酚对胞外 DNA 的影响

取 450 μL EPS 样本, 加入 50 μL 3 mol/L

醋酸钠和 1 mL 无水乙醇, 混匀后于 -80°C 沉淀 2 h, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 70% 冷乙醇洗涤沉淀, 干燥后加入 20 μL TE 溶液溶解沉淀, 使用超微量分光光度计测量胞外 DNA 浓度。

1.10 百里酚对生物膜相关基因表达量的影响

采用实时荧光定量 PCR 法分别测定百里酚对生物膜形成过程中和成熟生物膜相关基因表达量的影响。涉及的基因包括组氨酸激酶感应蛋白基因 *rsbA*、鞭毛一级调控子基因 *flhD* 和耐甘露糖样变形杆菌菌毛基因 *mrpA*。(1) 生物膜形成过程中: 在 6 孔板每孔加入对数生长期的菌悬液(OD_{600} 值为 0.4)和百里酚药液, 使其终浓度分别为 $1\times\text{MIC}$ 、 $1/2\times\text{MIC}$, 37°C 培养 6 h。(2) 成熟生物膜: 在 6 孔板每孔加入 5 mL 菌悬液, 37°C 培养 24 h。弃去培养物, 用 PBS 缓冲液洗涤, 加入 2 mL 浓度为 $1\times\text{MIC}$ 、 $1/2\times\text{MIC}$ 的百里酚药液, 作用 1 h。

弃去培养物后, 用 PBS 洗涤 3 次, 超声 10 min 洗脱生物膜并移至离心管中。使用 RNA Isolater Total RNA Extraction Reagent 提取总 RNA, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。RT-qPCR 所用引物如表 1 所示, 反应步骤参照 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书, 以 *rpoA* 为内参基因, 基因表达水平采用相对定量法中 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

1.11 统计分析

实验数据采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计分析并绘图, 所有数据取 3 次平行试验

的平均值, 以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 抗生素敏感性试验结果

抗生素敏感性试验结果分为敏感(S)、中介(I)、耐药(R) 3 个级别, 质控大肠杆菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的检测结果均在标准范围内。如表 2 所示, 10 株奇异变形杆菌对至少 1 种抗菌药物具有耐药性, 其中对林可霉素、复方新诺明、红霉素、氨苄西林表现出较高的耐药水平, 10 株奇异变形杆菌均对林可霉素耐药, 有 8 株菌对复方新诺明耐药, 有 8 株菌对红霉素耐药, 有 7 株菌对氨苄西林耐药。

2.2 百里酚 MIC 的测定结果

百里酚对奇异变形杆菌的 MIC 结果如表 3 所示, 百里酚对大部分菌株的 MIC 均为 0.156 mg/mL。

2.3 百里酚时间-杀菌曲线测定结果

百里酚对奇异变形杆菌的时间-杀菌曲线如图 1 所示, $4\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 浓度的百里酚具有杀菌效果, $1\times\text{MIC}$ 浓度的百里酚具有抑菌效果。12 h 后, $1/2\times\text{MIC}$ 及以下浓度的活菌数量与空白培养基对照组中的活菌数量基本一致。

2.4 奇异变形杆菌生物膜生成能力的测定结果

十株奇异变形杆菌的生物膜生成能力如图 2 所示, 所有菌株均能形成生物膜, 最终选用成膜能力较强且稳定的 PM12 菌株构建生物膜模型。

表1 RT-qPCR引物

Table 1 Primers for RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>rsbA</i>	TCCGTATCGTACTTCCATACC	GGCGAGTTTTGCAGTTATACC
<i>mrpA</i>	ATTGCGGGCTCTGCATTA	GGAATACGTTGAGCACCTGA
<i>flhD</i>	TGCCCGTTTCTTTGTAGCAGA	CCGTTTGAAGACAGCGAAA
<i>rpoA</i>	GCAAATCTGGCATTGGCCCT	TAGGGCGCTCATCTTCTCCG

表2 十株奇异变形杆菌抗菌药物敏感性试验结果

Table 2 Results of antimicrobial susceptibility test of 10 strains of *Proteus mirabilis*

Antimicrobial	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9	PM10	PM11	PM12	PM13	PM14
Ciprofloxacin	I	S	I	R	S	I	R	S	R	S
Levofloxacin	S	I	I	I	S	I	I	S	R	I
Imipenem	I	I	R	I	I	S	S	S	S	S
Ampicillin	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R
Ceftriaxone	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
Gentamicin	I	S	S	S	R	S	R	R	R	R
Erythromycin	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Chloramphenicol	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R
Trimethoprim-sulfamethoxazole	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
Lincomycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.

表3 百里酚对奇异变形杆菌的MIC

Table 3 MIC of thymol on *Proteus mirabilis*

Strains	MIC (mg/mL)
PM5	0.156
PM6	0.156
PM7	0.156
PM8	0.313
PM9	0.313
PM10	0.156
PM11	0.156
PM12	0.156
PM13	0.156
PM14	0.313

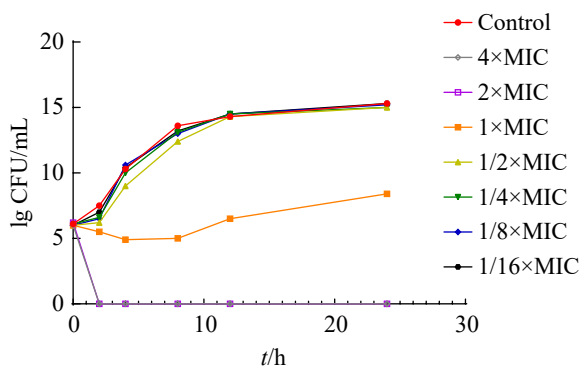


图1 百里酚的时间-杀菌曲线

Figure 1 The time-kill curves of thymol.

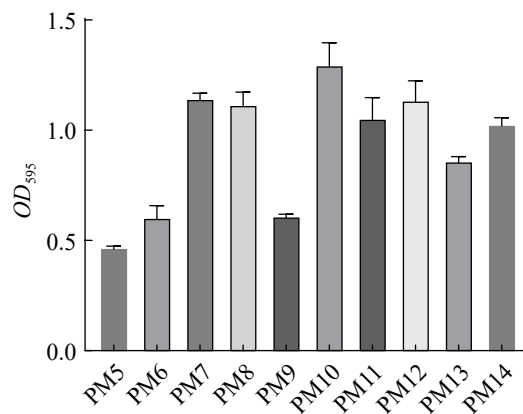


图2 十株奇异变形杆菌生物膜形成能力

Figure 2 The biofilm formation ability of ten strains *Proteus mirabilis*.

2.5 百里酚 MBIC 的测定结果

百里酚对 PM12 的 MBIC 为 0.313 mg/mL, 左氧氟沙星的 MBIC 为 0.064 mg/mL, 生物膜内的细菌在生物膜的屏障保护下, 相较于游离菌表现出更强的抗药性。抗菌物质的 MBIC 通常高于 MIC。作为植物源提取物, 百里酚对生物膜的抑制活性较强(表 4)。

2.6 百里酚对生物膜形成的影响

不同浓度的百里酚对 PM12 生物膜形成的影响如图 3 所示, 百里酚对奇异变形杆菌生物膜

表4 百里酚对12号奇异变形杆菌的MBIC

Table 4 MBIC of thymol on *Proteus mirabilis* 12

Drug	MBIC (mg/mL)	MBIC/MIC
Thymol	0.313	2
Levofloxacin	0.064	64

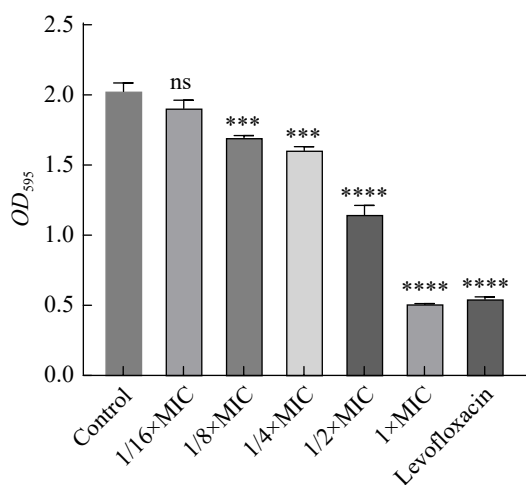


图3 百里酚对生物膜形成的影响

Figure 3 The effects of thymol on biofilm formation. ns: No significance; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

的形成表现出显著的抑制效果, 且与药物浓度呈正相关。1×、1/2×、1/4×、1/8×MIC 浓度的百里酚处理组吸光度值显著低于对照组($P < 0.001$), 其抑制率分别为 77.3%、51.2%、20.7% 和 16.2%。

2.7 百里酚对细菌运动能力的影响

群集运动是指细菌在固体表面依靠鞭毛的旋转运动, 而泳动则是单个细菌依靠鞭毛的旋转运动^[13]。细菌的黏附和定殖与其依赖鞭毛的运动密切相关。图 4 展示了不同浓度百里酚对细菌运动能力的抑制情况, 其中图 4A、4C 为群集运动, 图 4B、4D 为泳动。无药对照组的细菌运动能力最强, 蔓延至整个平板(直径 8.50 cm)。在培养基中添加百里酚后, 细菌在培养基表面的迁移距离显著下降。在 MIC 浓度下, 细菌的

群集运动基本无法展开, 而泳动能力也受到明显抑制, 泳动直径为(3.50±0.45) cm, 且最外侧的细菌圈较为透明, 细菌量明显少于内圈。在 1/2×MIC 浓度下, 细菌的群集运动直径为(5.20±0.20) cm, 泳动直径为(6.00±0.25) cm, 均受到显著抑制。

2.8 百里酚对生物膜胞外聚合物的影响

2.8.1 百里酚对胞外多糖的影响

胞外多糖有助于细菌黏附在接触表面。葡萄糖标准曲线为 $y = 4.408x + 0.1723$ ($R^2 = 0.9916$)。如图 5A 所示, 1/2×、1/4×、1/8×MIC 浓度的百里酚处理组胞外多糖含量显著低于对照组, 且与药物浓度呈正相关。这说明百里酚可抑制胞外多糖的产生。

2.8.2 百里酚对胞外蛋白的影响

胞外蛋白质通过与胞外多糖和胞外 DNA 相互作用, 形成三维结构以稳定生物膜基质, 其在接触表面形成蛋白质层, 有利于细菌的黏附。蛋白质标准曲线为 $y = 7.280x + 0.1158$ ($R^2 = 0.9903$)。如图 5B 所示, 1/2×MIC、1/4×MIC 浓度的百里酚处理组胞外蛋白含量显著低于对照组, 且与药物浓度呈正相关。这说明百里酚可抑制胞外蛋白的产生。

2.8.3 百里酚对胞外 DNA 的影响

胞外 DNA 在维持生物膜稳定性、提供营养来源和遗传物质交换等方面发挥重要作用。如图 5C 所示, 1/2×、1/4×、1/8×MIC 浓度的百里酚处理组可显著减少胞外 DNA 的生成, 且与药物浓度呈正相关。这说明百里酚可抑制胞外 DNA 的形成。

2.9 百里酚对生物膜相关基因表达水平的影响

采用实时荧光定量 PCR 检测百里酚对奇异变形杆菌生物膜形成相关基因转录水平的影响, 结果如表 5 所示, 1×MIC 和 1/2×MIC 浓度的百里酚作用后, *rsbA*、*flhD*、*mrpA* 基因的表达量均显著下降, 且与药物浓度呈正相关。

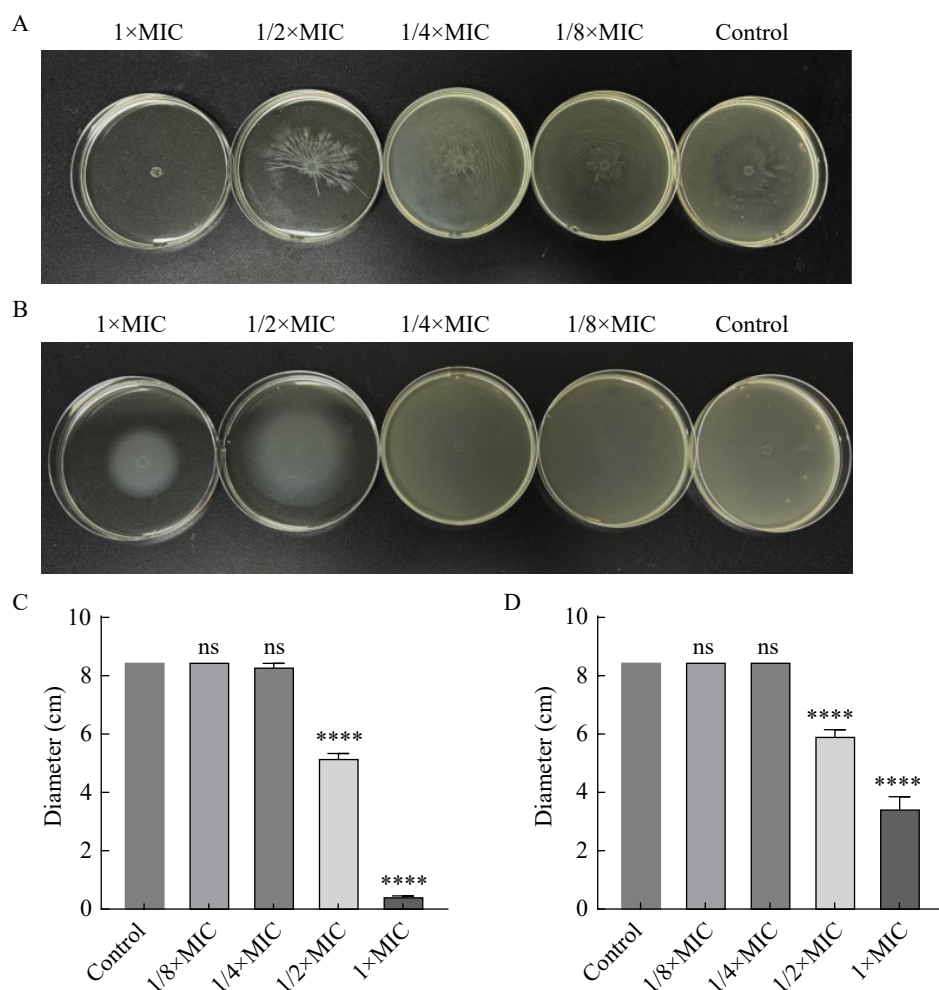


图4 百里酚对奇异变形杆菌群集运动和泳动的影响。A: 百里酚对群集运动的影响; B: 百里酚对泳动的影响; C: 群集运动直径; D: 泳动直径。

Figure 4 The effects of thymol on *Proteus mirabilis* swarming and swimming. A: Effect of thymol on swarming; B: Effect of thymol on swimming; C: Swarming diameter; D: Swimming diameter. ns: No significance; ****: $P < 0.0001$.

菌毛有助于细菌的早期黏附, 百里酚可能通过降低 *mrpA* 的表达抑制菌毛的形成, 从而减少细菌的定殖与黏附。RsbA 在群集运动中起重要作用, 降低 *rsbA* 和 *flhD* 的表达可减少鞭毛的形成, 抑制奇异变形杆菌的运动能力。此外, *rsbA* 基因还与多糖合成相关, 百里酚可通过减少胞外多糖的形成来抑制生物膜的生成, 这一结果与百里酚对胞外多糖的影响一致。

3 讨论与结论

奇异变形杆菌是引起泌尿系统感染的主要病原菌, 在一定条件下还可引起腹泻、脑膜炎及新生儿败血症等疾病^[14]。奇异变形杆菌的耐药机制复杂, 近年来随着抗生素的广泛使用, 其耐药率逐年增加。奇异变形杆菌可产生多种 β -内酰胺酶, 这些酶能够破坏抗生素的结构使其水解失活^[1]。此外, 奇异变形杆菌还可通过质

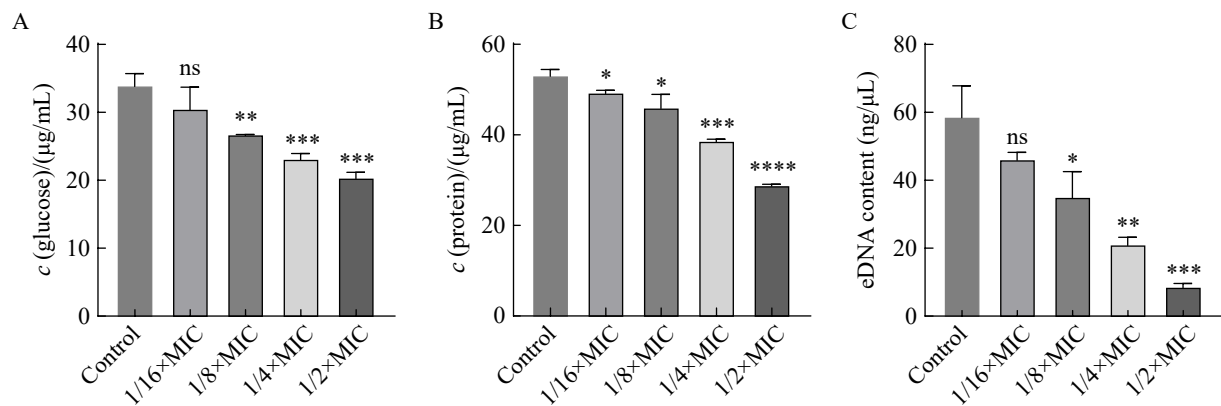


图5 百里酚对胞外聚合物的影响。A：百里酚对胞外多糖的影响；B：百里酚对胞外蛋白的影响；C：百里酚对胞外DNA的影响。

Figure 5 The effects of thymol on extracellular polymeric substances. A: Effect of thymol on exopolysaccharide; B: Effect of thymol on extracellular protein; C: Effect of thymol on eDNA. ns: No significance; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

表5 百里酚对生物膜相关基因转录水平的影响

Table 5 The effect of thymol on transcription levels of biofilm-related genes

Gene	During biofilm formation			Mature biofilm		
	1/2×MIC	1×MIC	Control	1/2×MIC	1×MIC	Control
<i>rsbA</i>	0.51±0.08****	0.28±0.02****	1.00±0.03	0.80±0.02*	0.24±0.01****	1.00±0.01
<i>flhD</i>	0.20±0.02****	0.10±0.04****	1.00±0.03	0.73±0.07**	0.13±0.01****	1.00±0.00
<i>mrpA</i>	0.70±0.05**	0.18±0.01****	1.00±0.08	0.58±0.10**	0.38±0.05****	1.01±0.15

*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

粒、转座子等在不同细菌之间传播耐药基因^[15]。奇异变形杆菌能够形成生物膜，其屏障作用使抗菌药物难以直接作用于细菌表面，同时对抗宿主免疫系统，增加了治疗难度。Stewart 等^[16]研究表明，生物膜内的细菌耐药性可达浮游菌的 100–1 000 倍^[16]。

目前，研究发现一些中药单体可以抑制奇异变形杆菌。例如，亚抑菌浓度的姜黄素可以抑制多糖的产生和群集运动^[17]；大蒜素在亚抑菌浓度下可减少 35% 的生物膜形成，并且在较高浓度下可以完全清除细菌生物膜^[18]。百里酚具有抗炎、抗细菌、抗真菌等功效，因其潜在毒性较小而被广泛应用于多个领域，其广谱抗菌活性使百里酚可作为潜在的抗菌先导化合物，

由于其溶解性较差，可能会限制其应用，近些年，越来越多的研究探讨百里酚与其他植物提取物、纳米颗粒和壳聚糖等的联合抗菌效果，以提高其生物利用度^[19]。在本研究中，百里酚对奇异变形杆菌的 MIC 为 0.156 mg/mL，MBIC 为 0.313 mg/mL，对奇异变形杆菌及其生物膜表现出显著的抑制活性，1×、1/2×、1/4×MIC 浓度的百里酚对生物膜的抑制率分别为 77.3%、51.2% 和 20.7%。

生物膜的形成过程十分复杂，受到多种因素的调控。在革兰氏阴性菌中，细菌运动是生物膜形成的关键因素，群集运动和泳动在细菌的表面不可逆黏附过程中发挥重要作用^[20]。本研究发现，1×MIC 和 1/2×MIC 浓度的百里酚可

以通过抑制奇异变形杆菌的群集运动和泳动,抑制其初期黏附作用。细菌分泌的胞外聚合物能帮助细菌形成立体结构,在生物膜形成中期起着重要作用。EPS 主要由胞外蛋白、胞外多糖和胞外 DNA 组成。百里酚能显著减少奇异变形杆菌胞外蛋白、胞外多糖和胞外 DNA 等胞外聚合物的合成与分泌,从而抑制生物膜的形成。在亚抑菌浓度下,百里酚作用后胞外多糖、胞外蛋白和胞外 DNA 的含量分别下降 40.1%、45.5% 和 85.1%。

RsbA 是一种组氨酸激酶感应蛋白,负责调节奇异变形杆菌的群集运动,在细菌初始聚集和黏附阶段发挥重要作用, Hussein 等^[21]研究表明, RsbA 还可以促进胞外多糖的产生。鞭毛是奇异变形杆菌的重要运动“器官”, *flhD* 是鞭毛合成的主要调节因子,在细菌运动与定殖过程中发挥重要作用^[22]。奇异变形杆菌的菌毛(如 MRP、PMF、UCA)是感染初期必不可少的毒力因子,能使细菌黏附于宿主细胞上,而 *mrpA* 是编码 *mrp* 操纵子主要结构的基因^[23]。本研究显示, 1×MIC 和 1/2×MIC 浓度的百里酚能显著下调 *rsbA*、*flhD* 和 *mrpA* 基因的转录水平,抑制细菌在生物膜形成过程中的黏附与定殖作用,减少胞外多糖的合成,进而抑制奇异变形杆菌生物膜的形成。

综上所述,百里酚对奇异变形杆菌具有良好的体外抗生物膜活性,能够抑制生物膜相关基因的表达,抑制细菌的运动能力,减少生物膜形成的关键胞外基质如菌毛、胞外聚合物的形成,从而抑制生物膜的形成。本研究为百里酚抑制奇异变形杆菌生物膜提供了理论基础,为临床上控制和治疗由奇异变形杆菌引起的感染提供了实验依据。百里酚作为一种天然产物,分子结构简单,抑菌活性较高,未来可进一步对其作用机制、结构优化与应用层面进行研究,为其开发为低毒、高效的生物源杀菌剂提供参考。后续研究可探索百里酚与抗生素的联合抑菌活性,以及百里酚体内抗生物膜作用,为预

防或降低奇异变形杆菌耐药性提供新思路。

作者贡献声明

王钰雯:实验构思、设计和操作、数据收集和处理、论文撰写和修改;汪辉:论文讨论;张海兵:协助实验操作;陈向东:研究构思,论文讨论与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 石磊,楼正青. 奇异变形杆菌的临床分布以及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(6): 692-694.
SHI H, LOU ZQ. Clinical distribution of *Proteus mirabilis* and analysis of its drug resistance[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2023, 33(6): 692-694 (in Chinese).
- [2] 张健,张翔,蒋桂平. 南京某三甲医院老年医学科ICU病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 31(1): 21-26.
ZHANG J, ZHANG X, JIANG GP. Distribution and drug resistance analysis of pathogenic bacteria in ICU of geriatrics of a grade-a tertiary hospital in Nanjing[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacy, 2022, 31(1): 21-26 (in Chinese).
- [3] YAN J, BASSLER BL. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms[J]. Cell Host & Microbe, 2019, 26(1): 15-21.
- [4] PRAMANA A, FIRMANDA A, ARNATA IW, SARTIKA D, SARI EO. Reduction of biofilm and pathogenic microorganisms using curcumin-mediated photodynamic inactivation to prolong food shelf-life[J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 425: 110866.
- [5] 邱镜伊. 百里酚及其衍生物的抗菌活性及机制研究[D]. 重庆: 重庆理工大学硕士学位论文, 2023.
QIU JY. Study on the antibacterial activity and mechanism of thymol and its derivatives[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [6] KACHUR K, SUNTRES Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(18): 3042-3053.
- [7] ESCOBAR A, PÉREZ M, ROMANELLI G, BLUSTEIN G. Thymol bioactivity: a review focusing on practical applications[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2020, 13(12): 9243-9269.
- [8] 王林果,康娟. 纸片法药敏试验失败的原因分析及解决

- 措施[J]. 兽医导刊, 2015(7): 50-51.
- WANG LG, KANG J. Cause analysis and solution of failure of drug sensitivity test by disk method[J]. Veterinary Orientation, 2015(7): 50-51 (in Chinese).
- [9] HANEY EF, TRIMBLE MJ, HANCOCK REW. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria[J]. Nature Protocols, 2021, 16(5): 2615-2632.
- [10] MACIA MD, ROJO-MOLINERO E, OLIVER A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2014, 20(10): 981-990.
- [11] THIEME L, HARTUNG A, TRAMM K, KLINGER-STROBEL M, JANDT KD, MAKAREWICZ O, PLETZ MW. MBEC versus MBIC: the lack of differentiation between biofilm reducing and inhibitory effects as a current problem in biofilm methodology[J]. Biological Procedures Online, 2019, 21: 18.
- [12] 罗春萍, 陆友利, 王星星. 苯酚-硫酸法快速测定多糖方法的优化[J]. 化工管理, 2021(3): 90-91, 94.
- LUO CP, LU YL, WANG XX. Optimization of rapid determination of polysaccharide by phenol-sulfuric acid method[J]. Chemical Enterprise Management, 2021(3): 90-91, 94 (in Chinese).
- [13] KEARNS DB. A field guide to bacterial swarming motility[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 634-644.
- [14] OMORUYI. *Proteus mirabilis* septicemia and meningitis in a neonate[J]. Journal of Medical Cases, 2014, 5(4): 245-247.
- [15] 葛强. 广西猪源奇异变形杆菌的耐药分析及一株奇异变形杆菌噬菌体的分离鉴定与初步应用[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2021.
- GE Q. Drug resistance analysis of *Proteus mirabilis* from pigs in Guangxi and isolation, identification and preliminary application of a *Proteus mirabilis* phage[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2021 (in Chinese).
- [16] STEWART PS, WILLIAM COSTERTON J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. The Lancet, 2001, 358(9276): 135-138.
- [17] PACKIAVATHY IASV, PRIYA S, PANDIAN SK, RAVI AV. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin: an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*[J]. Food Chemistry, 2014, 148: 453-460.
- [18] RANJBAR-OMID M, ARZANLOU M, AMANI M, SHOKRI AL-HASHEM SK, AMIR MOZAFARI N, PEERI DOGHAHEH H. Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis in vitro*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(9): fnv049.
- [19] EDIS Z, BLOUKH SH. Thymol, a monoterpenoid within polymeric iodophor formulations and their antimicrobial activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(9): 4949.
- [20] 张晨曦, 刘鼎阔. 细菌群集运动特性的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3188-3203.
- ZHANG CX, LIU DK. Characterization of bacterial swarming motility: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3188-3203 (in Chinese).
- [21] HUSSEIN EI, AL-BATAYNEH K, MASADEH MM, DAHADHAH FW, AL ZOUBI MS, ALJABALI AA, ALZOUBI KH. Assessment of pathogenic potential, virulent genes profile, and antibiotic susceptibility of *Proteus mirabilis* from urinary tract infection[J]. International Journal of Microbiology, 2020, 2020: 1231807.
- [22] 刘慧, 蓝明明, 邢蕾蕾. 鞭毛主调控因子 *flhDC* 调控机制及其在 PGPR 定殖中的功能[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(10): 2575-2582.
- LIU H, LAN MM, XING LL. Regulation mechanism of flagellar major regulator *flhDC* and its function in PGPR colonization[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2023, 64(10): 2575-2582 (in Chinese).
- [23] JANSEN AM, LOCKATELL V, JOHNSON DE, MOBLEY HLT. Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the *in vivo* localization of bacteria, and contribute to biofilm formation[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(12): 7294-7305.