

研究报告

有机栽培龙脑百里香精油对白色念珠菌体外抑菌活性的研究

刘梓萱¹, 杨芳², 唐双焱³, 金建明², 肖俊松¹, 吴华^{*1}

1 北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048

2 北京工商大学化学与材料工程学院, 北京 100048

3 中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

刘梓萱, 杨芳, 唐双焱, 金建明, 肖俊松, 吴华. 有机栽培龙脑百里香精油对白色念珠菌体外抑菌活性的研究[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 642-654.

LIU Zixuan, YANG Fang, TANG Shuangyan, JIN Jianming, XIAO Junsong, WU Hua. *In vitro* inhibitory activity of organic *Thymus vulgaris* CT borneol essential oil against *Candida albicans*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 642-654.

摘要: 【背景】白色念珠菌(*Candida albicans*)属于条件致病性真菌,可引起严重的黏膜真菌感染及全身系统性真菌感染,是导致患者高发病率和高死亡率的主要菌群之一。【目的】探究百里香精油对白色念珠菌的抑菌活性及抑制机理。【方法】测定5种百里香精油对白色念珠菌的抑菌圈直径,分析具有高抑菌活性的精油成分。在此基础上,通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察精油对白色念珠菌菌体细胞形态的影响。测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)含量、胞外溶液电导率并进行碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色分析,探究精油对白色念珠菌生物膜的形成与黏附及磷脂酶活性的影响,并通过实时荧光定量PCR法分析与白色念珠菌生物膜形成相关基因(凝集素样序列基因 *ALS4*, 从酵母型向菌丝型细胞的形态转变基因 *HWPI*、磷脂酶基因 *PLB1*)的表达水平,探究该精油对白色念珠菌的抑菌机制。【结果】筛选出了对白色念珠菌高度敏感的有机栽培龙脑百里香精油(*Thymus vulgaris* CT borneol essential oil, TBEO),其抑菌圈直径为(36.0±4.8) mm。TBEO的主要成分有 α -松油醇(43.43%)、苾烯(8.97%)、丁香烯(7.70%)、香芹酚(5.81%)和芳樟醇(5.19%)等,约占TBEO总含量的70%。扫描电子显微镜的结果表明TBEO改变了白色念珠菌的表观形态,菌体表面凹陷、扭曲变形。胞外AKP含量、溶液电导率和碘化丙啶(PI)染色分析结果表明TBEO增大了白色念珠菌细胞膜及细胞壁的通透性。TBEO对白色念珠菌生物膜的形成有抑制作用,对已形成的生物膜有良好的清除作用。TBEO减少菌丝形成、影响黏附和降低磷脂酶活性。实时荧光定量PCR试验显示TBEO可显著下调*HWPI*、*ALS4*和*PLB1*基因的表达量。【结论】TBEO对白色念珠菌有良好的抑制作用,本研究为TBEO在白色念珠菌感染防控中的应用提供了理论依据。

关键词: 白色念珠菌; 精油; 龙脑百里香; 抑菌

资助项目: 北京市教委一般项目(KM202010011010)

This work was supported by the General Project of Beijing Municipal Education Commission (KM202010011010).

*Corresponding author. E-mail: wuhua@btbu.edu.cn

Received: 2023-07-17; Accepted: 2023-09-18; Published online: 2023-10-31

In vitro inhibitory activity of organic *Thymus vulgaris* CT borneol essential oil against *Candida albicans*

LIU Zixuan¹, YANG Fang², TANG Shuangyan³, JIN Jianming², XIAO Junsong¹, WU Hua^{*1}

¹ Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

² College of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

³ CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] *Candida albicans* is a conditional pathogenic fungus capable of causing severe mucosal and systemic fungal infections and one of the major fungi leading to high morbidity and mortality in patients. [Objective] To study the inhibitory activity and mechanism of thyme essential oil against *C. albicans*. [Methods] The inhibitory zone diameters of 5 thyme essential oils against *C. albicans* were determined, and the components of the essential oils with high inhibitory activity were identified. Scanning electron microscope (SEM) was employed to observe the effect of essential oils on the morphology of *C. albicans*. The alkaline phosphatase (AKP) content and extracellular solution conductivity were determined, and propyl iodide (PI) staining was performed, on the basis of which the effects of essential oil on the biofilm formation and adhesion and the phospholipase activity of *C. albicans* were determined. In addition, real-time fluorescence quantitative PCR was conducted for the lectin-like sequence gene *ALS4* involved in the biofilm formation, *HWPI* involved in the switch from yeast growth to hyphal growth, and the phospholipase gene *PLB1* to reveal the inhibitory mechanism of this essential oil on *C. albicans*. [Results] The Organic *Thymus vulgaris* CT borneol essential oil (TBEO) with the strongest inhibitory effect on *C. albicans* was selected, which showed the inhibition zone diameter was (36.0±4.8) mm. The main components of TBEO were α -terpineol (43.43%), camphene (8.97%), caryophyllene (7.70%), carvacrol (5.81%), and linalool (5.19%), which accounted for about 70% of the total TBEO. The results of SEM showed that TBEO caused concave surface and distorted cells of *C. albicans*. TBEO increased the permeability of the cell membrane and cell wall of *C. albicans*, causing the leakage of intracellular substances. TBEO inhibited the biofilm formation and exerted a scavenging effect on the formed biofilm of *C. albicans*. TBEO reduced mycelium formation, affected adhesion, and decreased phospholipase activity. Real-time fluorescence quantitative PCR results showed that TBEO significantly down-regulated the expression levels of *HWPI*, *ALS4*, and *PLB1*. [Conclusion] TBEO exerts an inhibitory effect on *C. albicans*. This study provides a theoretical basis for the application of TBEO in the prevention and control of *C. albicans* infection.

Keywords: *Candida albicans*; essential oil; organic *Thymus vulgaris* CT borneol; antifungal

白色念珠菌(*Candida albicans*)是一种条件性致病菌,它是全球高发病率和高死亡率真菌感染病的最常见食源性致病菌之一^[1],在人体口腔、

胃肠道和生殖道等部位都有定殖,并且可与其他微生物共生^[2-3]。当外界环境(营养或 pH)或人体免疫系统发生改变,白色念珠菌可能迅速增殖,

形成菌丝态和生物被膜,并侵袭宿主细胞、组织,造成黏膜和真皮感染,增加如口腔念珠菌病、食道念珠菌病等疾病的感染机会,进而引起口腔、舌头疼痛,味觉障碍和吞咽困难等^[4-6]。现有唑类(如氟康唑)等抗真菌药物被用于治疗念珠菌感染,但这些药物的长期使用容易导致耐药性^[7]。此外,口服唑类药物可能会使人产生消化不良、头痛和皮肤瘙痒等反应。因此,有必要针对不同情形采用不同的生物形态控制策略,避免耐药性白色念珠菌的过度增殖,确保现有抗真菌药物的有效性^[8-9]。精油(essential oils, EOs)是存在于芳香植物体内具有特殊香味的次生代谢物,具有较强的抑菌特性,可作为克服微生物耐药性的有效替代药物^[10]。

百里香是常用的食品香料,其精油具有良好的抑菌活性,能抑制包括白色念珠菌在内的多种微生物的生长^[11]。Alves 等^[12]研究证实两种伊比利亚百里香对白色念珠菌生物膜的形成具有较强抑制作用;Rajkowska 等^[13]发现丁香精油、百里香精油通过抑制生物膜的形成,改变细胞油脂分布情况进而达到抑菌效果。郭罕星等^[14]将 0.8%柑橘油和百里香油组合饲喂患病肉鸽,证实该组合有防治肉鸽白色念珠菌病的潜力。由此可见,百里香精油可能成为替代、辅助抑制白色念珠菌的候选药物原料。然而精油的成分及其活性会因种质资源、栽培地域和管理、提取方式而有所差异。因此,本文对来自西班牙的常见 5 种百里香精油,即有机栽培龙脑百里香(*organic T. vulgaris* CT *borneol*)精油、有机栽培沉香醇百里香(*organic T. vulgaris* CT *linalool*)精油、沉香醇百里香(*T. vulgaris* CT *linalool*)精油、香芹酚百里香(*T. vulgaris* CT *carvacrol*)精油和百里酚百里香(*T. vulgaris* CT *thymol*)精油的抑菌活性进行比较,并对抑菌效果最好的有机栽培龙脑百里香精油 (*organic Thymus vulgaris* CT *borneol*

essential oil, TBEO)的抑菌机制进行探讨,以期为百里香精油在生物安全领域的应用提供理论和研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

白色念珠菌(*C. albicans*) ATCC 10231 标准菌株,中国普通微生物菌种保藏管理中心。

有机栽培龙脑百里香(*organic T. vulgaris* CT *borneol*)精油、有机栽培沉香醇百里香(*organic T. vulgaris* CT *linalool*)精油、沉香醇百里香(*T. vulgaris* CT *linalool*)精油、香芹酚百里香(*T. vulgaris* CT *carvacrol*)精油和百里酚百里香(*T. vulgaris* CT *thymol*)精油,颇黎芳香医药科技(上海)有限公司。

酵母粉, Oxoid 公司;胰蛋白胨,北京奥博星生物技术公司;氟康唑、百里香酚等,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)试剂盒、钾离子(K⁺)试剂盒,南京建成生物工程研究所;RPMI 1640 培养液, Gibico 公司;碘化丙啶、2-壬基酮和结晶紫溶液, Sigma-Aldrich 公司;反转录试剂盒, 东洋纺(上海)生物科技有限公司;SYBR Green, 北京索莱宝科技有限公司。

气相色谱仪、气相质谱仪,安捷伦科技有限公司;电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;扫描电镜, HITACHI 公司;荧光定量 PCR 仪, ABI 公司;超微量紫外分光光度计, Quawell 公司。

酵母膏 胰蛋白胨 葡萄糖(yeast peptone dextrose, YPD)琼脂培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 胰蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0。YPD 液体培养基: 不加琼脂, 其余成分与固体培养基相同。培养基于 121 °C 灭菌 20 min 后分装备用。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备

取白色念珠菌接种于 YPD 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 恒温摇床活化厌氧培养 24 h, 使用接种环蘸取活化后的白色念珠菌菌液于固体培养基中划线厌氧培养 48 h。挑取长势较好的单菌落至 YPD 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 厌氧培育 24 h。如未特殊说明, 后续试验中使用的菌液终浓度均为 1×10^6 CFU/mL。

1.2.2 抑菌圈直径的测量

抑菌圈直径测量方法参考 Humphries 等^[15]的方法并稍作修改, 将菌悬液稀释至 1×10^6 CFU/mL, 取 100 μ L 菌悬液均匀涂布在 YPD 固体培养基, 将 10 μ L TBEO 滴入灭菌后的滤纸片 (6 mm \times 6 mm) 中并放置在涂布好的含菌平板上, 37 °C 恒温厌氧培养 24 h 后观察并测量抑菌圈直径。试验重复 3 次, 取平均值。

1.2.3 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 及最小杀菌浓度 (minimal fungicidal concentration, MFC) 测定

参考 Haddouchi 等^[16]报道的方法, 将菌悬液稀释至 1×10^6 CFU/mL, 采用倍半稀释法, 将精油分散于含 0.1% (体积分数) 吐温-80 的 YPD 液体培养基中, 配制不同浓度的精油乳化液, 将其与等量菌悬液混合, 使待测精油乳液终浓度范围为 0.1–10.0 μ L/mL。氟康唑为阳性对照组, 同时设置空白对照组和只加菌液的模型组, 每组 3 个平行。37 °C 培养 24 h。MIC 为明显抑制白色念珠菌生长的最低浓度, MFC 为细菌两次培养中均不能生长的最低浓度。

1.2.4 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 成分分析

采用气相色谱仪和配备 DB-WAX 色谱柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) 的质量选择检测器进行分析。取 1 μ L TBEO 和 1 μ L 2-壬基酮 (标准品) 溶于 998 μ L 二氯甲烷, 充分混合, 用微量注射器过滤。进样温度与检测温度为 250 °C, 分

流比为 5:1, 载气为纯度 99.99% 的氦气, 流量为 3.1 mL/min。质谱使用电子轰击 (electron impact, EI) 离子源 (70 eV), 离子源温度: 230 °C, 质量扫描范围为 m/z 50–500。色谱操作条件: 40 °C 保持 1 min, 随后 5 °C/min 升至 57 °C, 2 °C/min 升至 78 °C; 4 °C/min 升至 88 °C; 3 °C/min 升至 92 °C; 1 °C/min 升至 107 °C; 6 °C/min 升至 129 °C; 4 °C/min 升至 137 °C; 6 °C/min 升至 159 °C; 4 °C/min 升至 163 °C; 1 °C/min 升至 169 °C; 6 °C/min 升至 230 °C。比较美国国家标准技术研究院 (National Institute of Standards and Technology, NIST) 数据库中与标准品色谱峰保留时间及保留指数, 判定有机龙脑百里香精油中单体的组成。将样品的保留指数和质谱与 NIST 库进行比对, 定性样品中的成分。

1.2.5 扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察

向 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液中加入不同浓度 (1/2MIC、MIC 和 MFC) 的 TBEO 溶液, 以无菌水作为空白对照, 37 °C 培养 4 h 后, 8 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 弃掉上清液, 使用 0.1 mol/L 的无菌 PBS 冲洗 2 次, 沉淀物重悬于体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液, 4 °C 固定 2–3 d。无菌 PBS 洗涤 3 次后再次弃去上清液, 分别用体积分数为 30%、50% 和 70% 乙醇溶液逐级脱水, 6 000 r/min 离心 2 min 后取沉淀物即菌体细胞, 冷冻干燥 24 h 后均匀涂在金属箔片上并固定喷金, 置于扫描电子显微镜下观察菌体细胞形态结构。

1.2.6 白色念珠菌胞外 AKP 泄露的测定

将菌悬液 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 收集菌体后使用无菌 PBS 冲洗并重悬, 加入含有 1/2MIC、MIC 的 TBEO 溶液, 无菌 PBS 再次冲洗并充分重悬作为待测样本, 等体积无菌水作为空白对照。将待测样本置于 37 °C 水浴温育, 分别于温育 1、2、4、6、8、10 和 24 h 后在 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液,

按照 AKP 试剂盒说明书的方法测定 AKP 含量。

1.2.7 白色念珠菌细胞膜相对电导率的测定

用细胞膜外相对电导率表示细胞膜渗透率变化,实验方法参考 Ye 等^[17]并稍作改动。将菌悬液于 5 000 r/min 离心 10 min,用无菌 PBS 反复洗涤沉淀并重悬至电导率接近 PBS 溶液,该菌悬液即为菌液样品。将 1/2MIC、MIC 浓度的 TBEO 溶液分别加入制备好的菌液样品中,完全混合后,测定其电导率标记为 L_1 ,分别在 37 °C 水浴孵育的 2、4、6、8、12、18 和 24 h 后取样,测得电导率记为 L_2 。对照组为将菌液样品沸水浴 5 min 后测得的电导率 L_0 。细胞膜渗透率计算如公式(1)所示。

$$\text{渗透率(\%)} = \frac{L_2 - L_1}{L_0} \times 100 \quad (1)$$

1.2.8 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色分析

PI 染色分析实验参考 Calabrese 等^[18]的方法。将菌悬液 5 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液,无菌 PBS 冲洗并重悬菌体,加入含有 1/2MIC、MIC 和 MFC 的 TBEO 溶液后使用无菌 PBS 冲洗并重悬作为待测样本,等体积无菌水作为空白对照。将待测样本置于 37 °C 水浴 5 h 后,加入 PI 荧光染料使其终浓度为 3.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$,避光孵育 30 min,取适量被染色菌液制片,置于荧光倒置显微镜下观察荧光染色情况,并拍照记录。

1.2.9 TBEO 对白色念珠菌生物膜形成的影响

试验参考 Leite 等^[19]的方法并稍作修改。使用 96 孔板培育生物膜,每孔加入 100 μL 菌悬液,37 °C、100 r/min 恒温振荡 90 min。无菌 PBS 洗去未黏附细胞,每孔中加入一定量 RPMI 1640 培养液培育生物膜。在生物膜形成的 4、8、24 和 48 h 过程中,加入不同浓度 TBEO 溶液孵育 6 h,以等体积无菌水为空白对照。除去孔中的培养液,用无菌 PBS 清洗一次,每孔加入 20%的甲醇固定 10 min,吸出甲醇,孔液室温下干燥 15 min。随后每孔加入 200 μL 0.02%

结晶紫水溶液,染色 10 min,吸出结晶紫溶液,无菌水洗涤至无色。加入体积比 3:7 的乙醇与丙酮的混合溶液 200 μL 溶解结晶紫,使用紫外分光光度计测定 590 nm 下每孔溶液的吸光度。

1.2.10 TBEO 对白色念珠菌菌丝转化的影响

参考 Yousuf 等^[20]的方法对菌丝形成进行观察。将菌悬液与 RPMI 1640 培养液混合在 96 孔板中,加入不同浓度(1/2MIC、MIC 和 MFC)的 TBEO 溶液,等体积无菌水作为空白对照,37 °C 培育菌丝 24 h 后,显微镜下观察菌丝形态。

1.2.11 TBEO 对白色念珠菌黏附作用的影响

结晶紫法分析精油对白色念珠菌黏附作用的影响。96 孔板每孔中加入 100 μL 菌悬液,加入不同浓度(1/2MIC、MIC 和 MFC) TBEO 溶液后在 37 °C、100 r/min 条件下培育 90 min。使用无菌 PBS 冲洗,随后吸出培养液,并用 PBS 清洗一次。20%甲醇固定 10 min,吸出甲醇,孔液室温下干燥 15 min。各孔加入 0.02%结晶紫水溶液 200 μL ,染色 10 min,吸出结晶紫溶液并用无菌水洗涤。加入体积比 3:7 的乙醇与丙酮的混合溶液 200 μL 溶解结晶紫,测定 590 nm 处每孔溶液的吸光度。

1.2.12 TBEO 对白色念珠菌水解作用的影响

参考 Ellepola 等^[21]的方法测定磷脂酶的活性,判断精油对白色念珠菌水解作用的影响。向制备好的菌悬液中加入配制好的不同浓度(1/2MIC、MIC 和 MFC)的 TBEO 溶液,吸取 2 μL 滴于凝固的卵黄培养基上,以无菌水处理的菌悬液为空白对照。37 °C 温育 48 h 后测量沉淀圈直径及菌落直径,计算菌落沉淀相对比(zone ratio of precipitation, PZ)值,PZ 值计算如公式(2)所示。

$$\text{PZ} = \frac{\text{菌落直径(mm)}}{\text{菌落直径(mm)} + \text{沉淀圈直径(mm)}} \quad (2)$$

1.2.13 TBEO 对白色念珠菌相关致病基因的调控

测定经 TBEO 处理后形态转变相关基因

(*HWPI*)、黏附相关基因(*ALS4*)和磷脂酶相关基因(*PLBI*)的表达水平变化。样品准备如 1.2.3, 制备含不同浓度(1/2MIC、MIC 和 MFC) TBEO 的菌悬液, 37 °C、180 r/min 恒温振荡厌氧培养 24 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 除去培养基, 加入 1 mL 无菌 PBS, 再次离心弃掉上清液, 收集菌沉淀, 置于-80 °C 冷冻干燥 24 h 后研磨捣碎。

按照 RNA 提取试剂盒步骤说明提取菌体总 RNA: 取研磨后的样品加入 1 mL 裂解液, 枪头吹打均匀使细胞完全破碎后, 吸取上清液至 RNase-free 离心管, 放置 5 min 后, 加入氯仿去除蛋白质, 颠倒混匀后静置 5–10 min, 10 000×g、4 °C 离心 15 min, 随后取上清液, 加入等量乙醇颠倒混匀沉淀 RNA, 12 000×g、4 °C 离心 30 s, 弃下液。随后使用 CB9 冲洗两次, WB9 冲洗两次。室温干燥 10 min 后, 加入适量 RNase-free 水溶解 RNA 沉淀。

以提取的总 RNA 为模板, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA。取 1 µg RNA 样品于 PCR 管中, 置于 PCR 仪中 65 °C 预变性 5 min。反转录反应体系为 4×DN Master Mix 2 µL, 5× RT-Mix 2 µL, Nuclease-free 水补足 10 µL, 在冰上进行试验操作。加完各种试剂后, 振荡混匀, 将 PCR 管置于离心机中使反应液沉聚管底, 随后置于 PCR 仪中进行反转录, 反应条件: 37 °C 15 min, 50 °C 5 min, 98 °C 5 min。

反转录成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 分析。目的基因及内参基因(*ACT1*)的引物序列如表 1 所示。

PCR 反应体系: SYBR Green 3 µL, 上、下游引物(5 mmol/L)各 0.5 µL, DNA 模板(5 mmol/L) 0.5 µL, 无菌水补足 10 µL。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Primer name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>ALS4</i> -F	TCCGAGTCCATTCCAGTACTAA	190
<i>ALS4</i> -R	GTTACAGCATCACTAGAAGGAATATC	190
<i>PLBI</i> -F	GCAATGTTGACTGGAGCAGGT	125
<i>PLBI</i> -R	AACCACGATCCACCTGATAACC	125
<i>HWPI</i> -F	ATGACTCCAGCTGGTTC	503
<i>HWPI</i> -R	TAGATCAAGAATGCAGC	503
<i>ACT1</i> -F	GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCTG	158
<i>ACT1</i> -R	CCGTGTTCAATTGGGTATCTCAAGGTC	158

PCR 反应条件:

(1) *ACT1*: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。

(2) *HWPI*: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。

(3) *ALS4*: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。

(4) *PLBI*: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。

反应结束后, 计算各基因的相对表达量, 见公式(3)。以不加精油为空白对照, 每组试验重复 3 次。

$$\text{相对定量值} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3)$$

式中, $C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{样品组}} - (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{样品组}}$

1.3 数据处理

所有试验均做 3 次重复。采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析和多重比较(least-significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示数据之间差异显著。使用 OriginPro 2022 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 五种百里香精油对白色念珠菌的抑菌圈活性

抑菌圈直径小于 7 mm 为无抑菌效果, 7–9 mm 为不敏感, 10–15 mm 为中度敏感, 15 mm 以上

为高度敏感^[22]。本试验中,通过测定 5 种精油对 *C. albicans* ATCC 10231 的抑菌圈直径并测量它们对白色念珠菌的 MIC 与 MFC 发现, TBEO 抑菌圈直径最大,为(36.0±4.8) mm, MIC 为 0.4 μL/mL。结果也显示,当阳性对照氟康唑的浓度达到 100 μg/mL 时仍有大量菌生长,抑菌活性远不如 TBEO (表 2)。因此,试验选择抑菌效果最佳的 TBEO 进行后续机制研究。

2.2 TBEO 主要成分

对 TBEO 进行 GC-MS 成分分析,如表 3 所示, TBEO 总共鉴别出 25 种主要成分, α-松油醇含量最高(43.43%),其次是茨烯(8.97%)、丁香烯(7.70%),此外,还含有少量香芹酚(5.81%)、芳樟醇(5.19%)等成分,其他成分如 α-蒎烯、对位伞花烃和乙酸冰片酯等都有微量存在。测定 α-松油醇对白色念珠菌的抑菌活性, α-松油醇 MIC 为 0.6 μL/mL, MFC 为 1.0 μL/mL。

2.3 TBEO 对白色念珠菌微观形态的影响

图 1 可见 TBEO 对白色念珠菌的微观形态影响明显。未经精油处理的对照组菌体(图 1A)表面光洁平整、折光性好,大小比较整齐。经 1/2MIC 的精油处理后(图 1B),部分细胞表面粗糙,菌体表面凹陷,个别细胞发生黏连现象。精油浓度达到 MIC (图 1C)时,大部分细胞外观形态发生显著变化,菌体明显皱缩,部分细胞形态受损严重。经 MFC 的精油处理后(图 1D),

菌体表面发生溶解、黏连现象, TBEO 对菌体结构的破坏程度与精油浓度成正比。

2.4 TBEO 对白色念珠菌细胞壁和细胞膜完整性的影响

2.4.1 TBEO 对白色念珠菌细胞壁完整性的影响

碱性磷酸酶(AKP)存在于真菌细胞壁与细胞膜之间,当细胞壁通透性增大或破损, AKP 泄露至胞外。因此,胞外 AKP 量越多,表明细胞壁破损程度越大。如图 2 所示,与对照组比较, TBEO 处理后的白色念珠菌胞外 AKP 含量远高于空白对照组,且 TBEO MIC 组胞外 AKP 含量明显高于 1/2MIC 组。试验结果表明,在精油处理白色念珠菌 1 h 后, 1/2MIC、MIC 组白色念珠菌胞外 AKP 含量均迅速上升,随后逐步增大,在 8 h 后趋于平稳状态并保持稳定,表明白色念珠菌细胞壁在短时间内接触 TBEO 后被破坏。

2.4.2 TBEO 对白色念珠菌细胞膜完整性的影响

PI 染色分析中, PI 作为一种 DNA 荧光染料会进入 DNA 双链释放红色荧光,它不能通过活细胞完整的细胞膜,但能进入受损细胞使细胞核染色,因此通常可用于检测细胞膜完整性。本试验通过 PI 染色分析观察结果如图 3 所示。白色念珠菌在 1/2MIC 浓度的精油处理下(图 3B),部分细胞膜受损而显现出微弱红色荧光。随着精油浓度增大,红色荧光点增多,当精油

表 2 五种百里香精油及氟康唑对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 抑菌圈直径及 MIC/MFC
Table 2 Inhibition zone diameters and MIC/MFC of 5 thyme essential oils and fluconazole against *Candida albicans* ATCC 10231

Samples	Diameters of inhibitory zone (mm)	MIC (μL/mL)	MFC (μL/mL)
Fluconazole	/	>100.0	>100.0
Organic <i>T. vulgaris</i> CT borneol	36.0±4.8	0.4	1.0
Organic <i>T. vulgaris</i> CT linalool	24.7±2.2	0.4	1.0
<i>T. vulgaris</i> CT linalool	12.7±2.0	0.6	1.0
<i>T. vulgaris</i> CT carvacrol	/	/	/
<i>T. vulgaris</i> CT thymol	/	/	/

/表示该精油抑菌圈直径小于 7 mm

/ indicates that the diameter of the inhibitory zone of the essential oil is less than 7 mm.

表 3 TBEO 成分及含量

Table 3 Compositions and contents of TBEO

Compositions	RT (min)	RI	Content (%)
α -pinene	6.82	1 028	3.92
Camphene	7.55	1 071	8.97
β -pinene	8.24	1 112	1.09
β -myrcene	9.32	1 161	0.25
α -terpinene	9.70	1 180	0.49
Limonene	10.13	1 200	1.36
Eucalyptol	10.33	1 213	1.29
γ -terpinene	11.18	1 246	1.17
p-cymene	11.82	1 272	3.47
Terpinolene	12.12	1 283	0.27
α -cubebene	18.06	1 463	0.25
α -copaene	18.91	1 492	0.26
Camphor	19.04	1 518	1.73
Linalool	19.76	1 547	5.19
Bornyl acetate	20.71	1 581	3.67
Bornyl formate	20.85	1 588	0.84
Methyl thymyl ether	21.14	1 590	1.29
Caryophyllene	21.39	1 595	7.70
Terpinen-4-ol	21.55	1 602	3.61
Pinocarveol	23.01	1 654	0.23
γ -muurolene	24.03	1 692	0.52
α -terpineol	24.40	1 697	43.43
Caryophyllene oxide	31.31	1 989	0.39
Thymol	35.04	2 189	3.40
Carvacrol	35.63	2 236	5.81
Total amount			99.36

浓度达到 MFC 时红色荧光点数量骤增。试验结果表明, 当精油浓度增大时, 细胞膜受损的菌的数量也随之增加, TBEO 可能会通过破坏细胞膜的完整性来抑制白色念珠菌活性。

细胞膜渗透率测定: 为研究抑菌机制与细胞膜通透性的关系, 试验测量了 TBEO 处理后的 *C. albicans* ATCC 10231 相对电导率的变化。从图 4 中看到, 在加入精油的 2–24 h, 1/2MIC、MIC 组细胞膜渗透率分别上升至 68.08% 和 80.77%, 渗透率及渗透率上升速率均

高于对照组。在加入 TBEO 后的短时间内, 白色念珠菌的细胞膜渗透率迅速增大, 表明 TBEO 对于 *C. albicans* ATCC 10231 的抑菌机制可能是通过增大单个细胞的细胞膜的通透性来实现的。

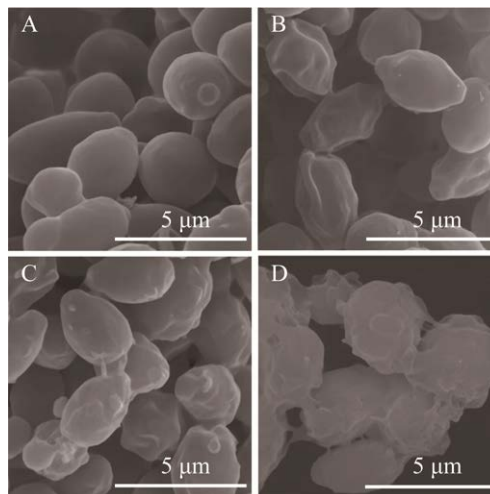


图 1 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 形态影响的扫描电镜图

Figure 1 SEM photography of the effect of different concentrations of TBEO on the morphology of *Candida albicans* ATCC 10231. A: Control (0 μ L/mL). B: 1/2MIC (0.2 μ L/mL). C: MIC (0.4 μ L/mL). D: MFC (1.0 μ L/mL).

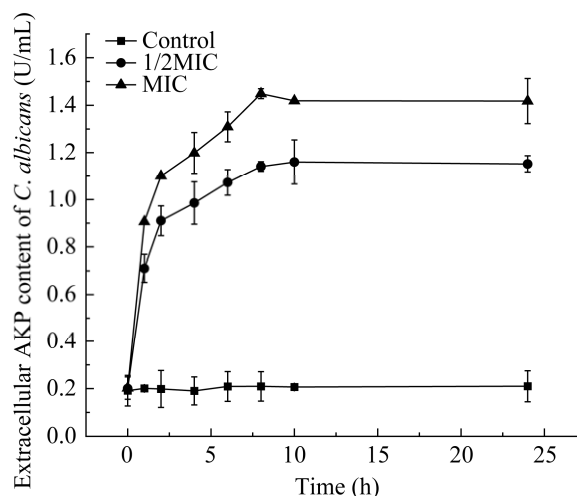


图 2 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 胞外 AKP 含量的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of TBEO on the extracellular AKP content of *Candida albicans* ATCC 10231.

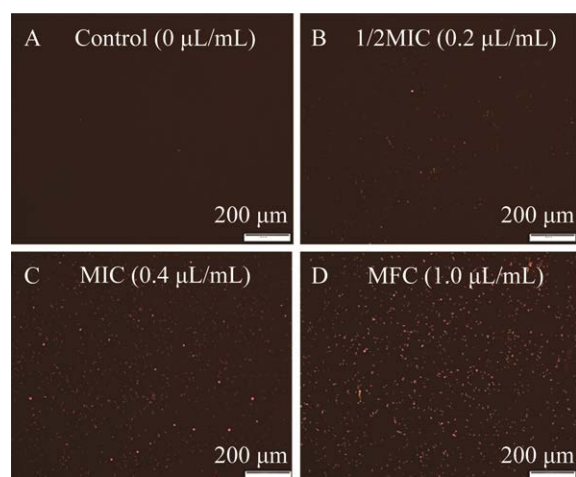


图3 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 细胞膜完整性影响的 PI 染色荧光显微图
Figure 3 PI fluorescence microscope photograph of different concentrations of TBEO on cell membrane integrity of *Candida albicans* ATCC 10231. A: Control (0 $\mu\text{L/mL}$). B: 1/2MIC (0.2 $\mu\text{L/mL}$). C: MIC (0.4 $\mu\text{L/mL}$). D: MFC (1.0 $\mu\text{L/mL}$).

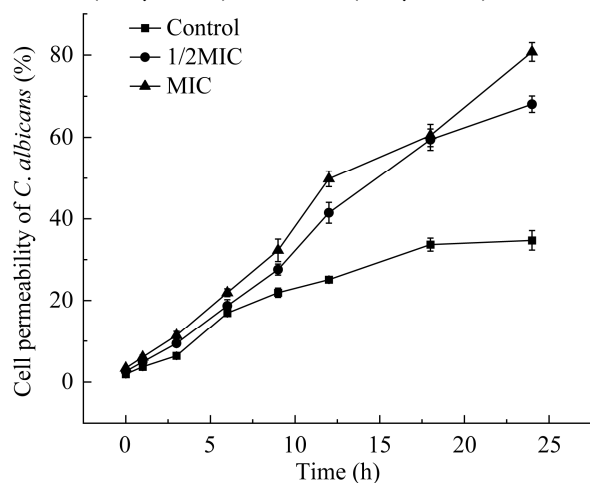


图4 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 细胞渗透率的影响
Figure 4 Effects of different concentrations of TBEO essential oil on cell permeability of *Candida albicans* ATCC 10231.

2.5 TBEO 对白色念珠菌生物膜形成的影响结果

在白色念珠菌生物膜形成的 4、8、24 和 48 h 后加入 TBEO, 在 96 孔板共培养 6 h, 采用结晶紫分析法测定白色念珠菌生物膜的形成

量, 结果如图 5 所示。与对照组相比, 在不同时间段经多浓度精油处理后, 最终生物膜形成量减少了 40%–80%, 说明精油可有效抑制白色念珠菌生物膜的形成。而且从图 5 中可以看出, 在生物膜形成过程中, 精油加入时间越早, 抑制效果越强。

2.6 TBEO 对白色念珠菌菌丝转化的影响结果

白色念珠菌菌丝的形成影响着生物膜的结构与体系, 其菌丝具有对宿主更强的黏附及入侵能力。显微镜下观察经不同浓度精油处理后白色念珠菌的菌丝形态, 可探究 TBEO 对白色念珠菌菌丝转化的影响, 试验结果如图 6 所示。未加精油处理的对照组(图 6A)在培育之后, 大部分菌形成较长菌丝且结聚成团。与对照组相比, 经精油处理后的 3 个试验组, 生成的菌丝数量明显减少, MFC 浓度组(图 6D)中几乎无菌丝的形成。试验结果表明, TBEO 能够抑制白色念珠菌菌丝的形成且抑制作用随精油浓度的增大而增强。

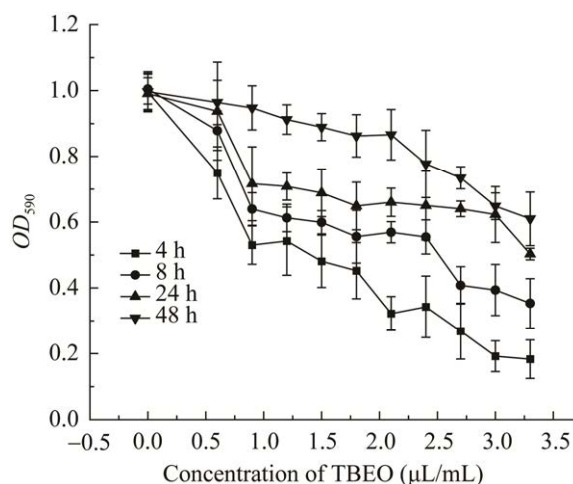


图5 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 生物膜生物量的影响
Figure 5 Effects of different concentrations of TBEO on biofilm formation of *Candida albicans* ATCC 10231.

2.7 TBEO 对白色念珠菌黏附作用的影响结果

黏附作用在早期白色念珠菌生物膜的形成过程中十分重要, 因此抑制黏附对抗菌尤为关键^[23]。通过结晶紫分析法检测经精油处理后黏附的真菌数量, 试验结果如图 7 所示。与未加精油处理的对照组相比, 加入不同浓度精油处理后, 菌黏附数量显著减少($P<0.05$),

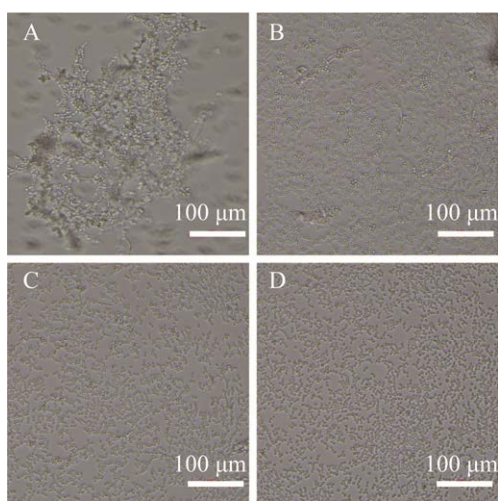


图 6 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 菌丝形成的影响

Figure 6 Effects of different concentrations of TBEO on hyphae formation of *Candida albicans* ATCC 10231. A: Control (0 $\mu\text{L/mL}$). B: 1/2MIC (0.2 $\mu\text{L/mL}$). C: MIC (0.4 $\mu\text{L/mL}$). D: MFC (1.0 $\mu\text{L/mL}$).

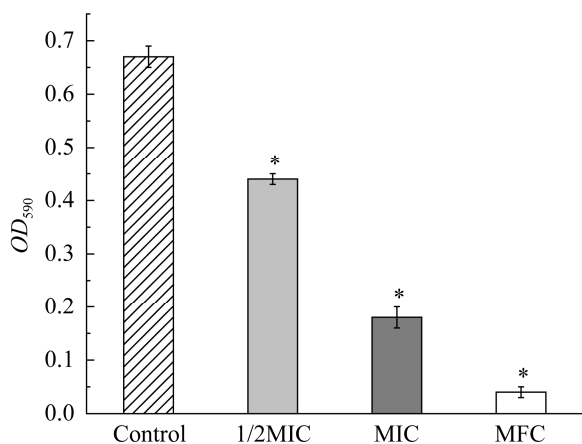


图 7 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 黏附作用的影响

Figure 7 Effect of different concentrations of TBEO on adhesion of *Candida albicans* ATCC 10231. *: $P<0.05$.

当精油浓度达到 MFC 时几乎无黏附。由此结果猜测, 白色念珠菌黏附作用能够被精油抑制, 精油浓度越高, 抑制作用越强。

2.8 TBEO 对白色念珠菌水解作用的抑制能力

磷脂酶作为白色念珠菌的一类水解酶可水解宿主细胞, 加速对宿主的侵袭, 进而导致组织损伤^[24]。通过测定磷脂酶活性判断抑菌机制与白色念珠菌水解能力的关系, 试验结果如图 8 所示。除 1/2MIC 处理组外, 其余精油处理组的 PZ 值均显著高于对照组($P<0.05$)。随着精油浓度增大, PZ 值增大, MFC 浓度组 PZ 值接近 1, 磷脂酶几乎无活性。试验结果表明 TBEO 可有效降低白色念珠菌磷脂酶活性, 磷脂酶活性随着精油浓度增大而减小。

2.9 TBEO 对白色念珠菌相关基因的调控作用

HWPI、*ALS4* 和 *PLB1* 在白色念珠菌生物膜的形成过程中发挥着重要作用, 控制 3 种基因的表达可以有效抑制生物膜的形成, 达到高效除菌的效果。前期试验结果也证明 TBEO 确实对白色念珠菌形态转变、黏附和磷脂酶活性有抑制作用。因此本试验通过实时荧光定量 PCR 法进一步探究 *HWPI*、*ALS4* 和 *PLB1* 的表达水平, 试验结果如图 9 所示。由图 9A 可知, 基因

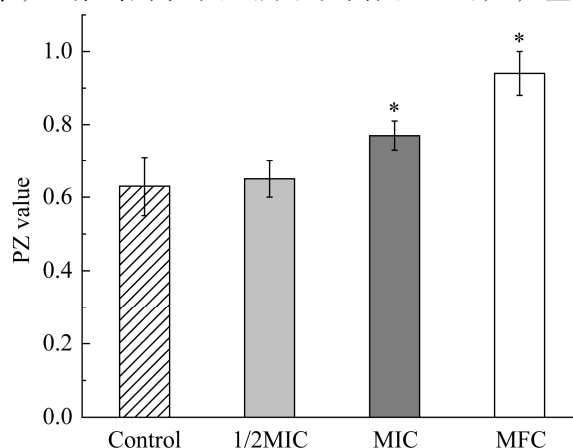


图 8 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 磷脂酶分泌的影响

Figure 8 Effect of different concentrations of TBEO on phospholipase secretion of *Candida albicans* ATCC 10231. *: $P<0.05$.

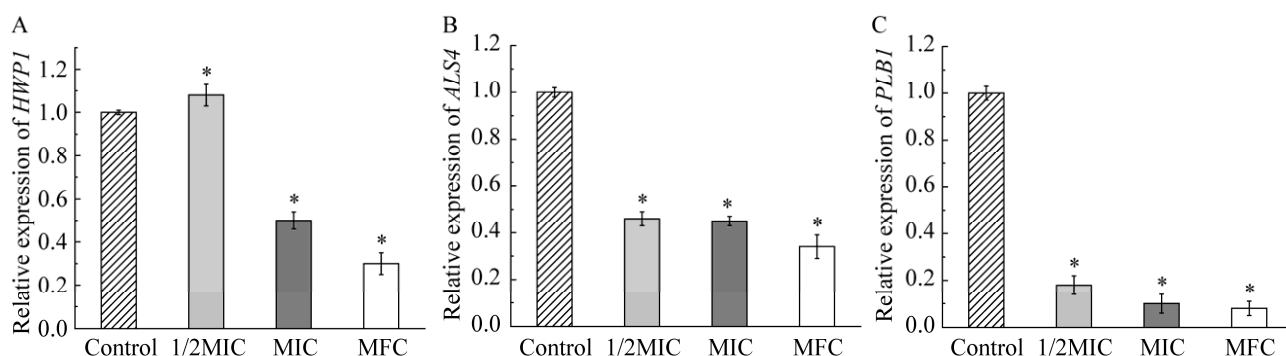


图9 不同浓度 TBEO 对白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 相关基因相对表达量的影响

Figure 9 Effects of different concentrations of TBEO on the relative expression of genes in *Candida albicans* ATCC 10231. *: $P < 0.05$.

HWP1 表达量经 MIC 和 MFC 的精油处理后均有所下调, 表达水平下调程度大于 50%。由图 9B 和图 9C 可知, 经 1/2MIC、MIC 和 MFC 浓度的精油处理 6 h 后, *ALS4* 及 *PLB1* 两个基因表达量显著下调($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

本试验首先评价 5 种百里香精油对白色念珠菌的抑菌活性, 筛选出的 TBEO 对白色念珠菌具有最佳抑菌作用。在 Pozzatti 等^[25]的研究中, 百里香精油、牛至精油对真菌、酵母菌以及革兰氏阴性菌和阳性菌均具有良好的杀菌作用。这与本试验中 TBEO 展现出的良好抑菌活性相符, 植物精油对白色念珠菌具有较好的抑菌功效, 且符合人们追求绿色自然的理念, 具有良好的应用前景和实用价值。此外, 从试验结果中可以看出, 同种精油的抑菌活性差异较大, 如 TBEO 相较于其他种类的百里香精油展现出更高的抑菌活性。这可能是由于精油的植物来源、植物种植时间和提取效率等差异, 导致精油成分差异较大, 抑菌功效不同。

在张好^[26]的研究中, 同一时期不同种百里香精油存在一定的成分差异, 东北百里香精油相较于其他百里香精油, 其成分以芳香族化合

物、氧化萜类化合物为主, 含量最多为百里香酚; 而兴凯百里香精油中百里香酚含量仅为 4.11%; 兴安百里香精油中含量最多的是烷烃类化合物(36.74%)。百里香酚为百里香属植物共同含量较高的成分, 但各地区百里香属植物精油的成分在组成和相对含量上有明显的不同, 这表明了百里香属植物的多样性。本研究气质分析试验结果显示, TBEO 的主要成分 α -松油醇(43.43%), MIC 为 0.6 $\mu\text{L/mL}$, MFC 为 1.0 $\mu\text{L/mL}$, 抑菌效果接近 TBEO 本身, 初步推测含有更多 α -松油醇可能是 TBEO 对白色念珠菌的抑菌活性优于其他百里香精油的主要原因。

为阐明 TBEO 抑制白色念珠菌的机制, 首先评估了 TBEO 对白色念珠菌细胞壁膜及细胞膜的损伤能力。经扫描电镜观察, 未处理的白色念珠菌表面光滑, 形态清晰, 结构良好; 处理后的念珠菌细胞凹陷皱缩, 表面不规则, 这可能是细胞膜受损、细胞内压力变化的结果。PI 染料很难穿透活细胞的细胞膜, 除非细胞膜产生破洞损伤。与 Adhavan 等^[27]的研究结果相似, 在加入 TBEO 后, 短时间内 *C. albicans* ATCC 10231 的 AKP 浓度、细胞膜渗透率迅速增大, 表明 TBEO 使白色念珠菌的细胞壁发生破裂, 细胞壁的完整性受到损伤, 并增大了白

色念珠菌细胞膜的通透性。

研究表明,白色念珠菌在形成生物膜后对抗真菌药物的耐受性将提高 1 000 多倍^[28]。生物膜的抗药能力增强与多种因素相关。例如,影响黏附过程、影响部分基因的改变以及细胞外基质阻止药物渗透等。在本研究中,TBEO 对 *C. albicans* ATCC 10231 生物膜的形成有良好的抑制作用,并且对与白色念珠菌生物膜相关的 3 个毒力因子(黏附、形态转变和水解酶)有抑制作用。黏附是白色念珠菌致病的首要因素^[29],RT-qPCR 结果显示,TBEO 处理后白色念珠菌的黏附相关基因 *ALS4* 的相对表达量显著下降;而且通过结晶紫染色分析发现,MIC 组的精油可减少 70% 的白色念珠菌黏附。菌丝的转换是白色念珠菌致病的初始阶段。结果表明,TBEO 能显著下调形态转变相关基因 *HWPI* 的相对表达量,通过显微镜观察发现 TBEO 可抑制白色念珠菌菌丝的形成,从而在致病过程的初始阶段起到预防作用。通常情况下,宿主细胞的细胞膜由蛋白质和脂质组成,白色念珠菌能够分泌多种水解酶,如蛋白酶和磷脂酶水解宿主细胞表面,加快侵袭,引起组织损伤。TBEO 下调了磷脂酶相关基因 *PLB1* 的相对表达量,对磷脂酶的活性有明显的抑制作用,表明精油能抑制白色念珠菌对宿主细胞的水解。但精油在 1/2MIC 组,基因表达量略微上调,需要进一步研究探明原因。精油的成分种类多样,可同时从多方面作用于菌体,不仅可以减少白色念珠菌对宿主的黏附,阻止菌体向致病性更强的菌丝形态转变,也可以降低白色念珠菌对宿主的侵袭和损伤,从而产生抑菌功效。

REFERENCES

- [1] TALAPKO J, JUZBAŠIĆ M, MATIJEVIĆ T, PUSTIJANAC E, BEKIĆ S, KOTRIS I, ŠKRLEC I. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2021, 7(2): 79.
- [2] BOMMANAVAR SB, GUGWAD S, MALIK N. Phenotypic switch: the enigmatic white-gray-opaque transition system of *Candida albicans*[J]. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 2017, 21(1): 82.
- [3] HALL RA, NOVERR MC. Fungal interactions with the human host: exploring the spectrum of symbiosis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 40: 58-64.
- [4] PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES D, BENJAMIN DK Jr, CALANDRA TF, EDWARDS JE Jr, FILLER SG, FISHER JF, KULLBERG BJ, OSTROSKY-ZEICHNER L, REBOLI AC, REX JH, WALSH TJ, SOBEL JD, AMERICA IDSO. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America[J]. Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 2009, 48(5): 503-535.
- [5] TERA H, SHIMAHARA M. Atrophic tongue associated with *Candida*[J]. Journal of Oral Pathology and Medicine, 2005, 34(7): 397-400.
- [6] TERA H, SHIMAHARA M. Glossodynia from *Candida*-associated lesions, burning mouth syndrome, or mixed causes[J]. Pain Medicine, 2010, 11(6): 856-860.
- [7] PEREIRA R, dos SANTOS FONTENELLE RO, de BRITO EHS, de MORAIS SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(1): 11-22.
- [8] ALSHAikh NA, PERVEEN K. Susceptibility of fluconazole-resistant *Candida albicans* to thyme essential oil[J]. Microorganisms, 2021, 9(12): 2454.
- [9] KATIRAE F, AHMADI AFSHAR S, RAHIMI PIRMAHALLEH SF, SHOKRI H. *In vitro* antifungal activity of essential oils extracted from plants against fluconazole-susceptible and-resistant *Candida albicans*[J]. Current Medical Mycology, 2017, 3(2): 1-6.
- [10] DIDRY N, DUBREUIL L, PINKAS M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria[J]. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1994, 69(1): 25-28.
- [11] 王龔, 林威, 俞根荣, 孙培龙. 植物精油在食品防腐保质中应用的研究进展[J]. 核农学报, 2021, 35(5): 1170-1177. WANG Y, LIN W, YU GR, SUN PL. Advance in anti-fungus application of plant essential oil in food preservation[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(5): 1170-1177 (in Chinese).
- [12] ALVES M, GONÇALVES MJ, ZUZARTE M, ALVES-SILVA JM, CAVALEIRO C, TERESA CRUZ

- M, SALGUEIRO L. Unveiling the antifungal potential of two iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 446.
- [13] RAJKOWSKA K, NOWICKA-KRAWCZYK P, KUNICKA-STYCZYŃSKA A. Effect of clove and thyme essential oils on *Candida* biofilm formation and the oil distribution in yeast cells[J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1954.
- [14] 郭罕星, 王占新, 鲁俊鹏, 覃健萍, 祁姣姣, 胡学生, 元波, 陈彤, 房向杰, 胡文锋. 植物精油对鸽源白色念珠菌的体外抑菌作用及肉鸽攻毒保护试验[J]. *中国家禽*, 2020, 42(9): 47-53.
- GUO HX, WANG ZX, LU JP, QIN JP, QI JJ, HU XS, YUAN B, CHEN T, FANG XJ, HU WF. Antibacterial effect of plant essential oil on *Candida albicans* from pigeon *in vitro* and protective test of meat pigeon against virus[J]. *China Poultry*, 2020, 42(9): 47-53 (in Chinese).
- [15] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321.
- [16] HADDOUCHI F, CHAOUICHE TM, ZAOUALI Y, KSOURI R, ATTOU A, BENMANSOUR A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four ruta species growing in *Algeria*[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(1): 253-258.
- [17] YE XL, LI XG, YUAN LJ, HE HM. Effect of the surface activity on the antibacterial activity of octadecanoyl acetal sodium sulfite series[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, 268(1/2/3): 85-89.
- [18] CALABRESE EC, CASTELLANO S, SANTORIELLO M, SGHERRI C, QUARTACCI MF, CALUCCI L, WARRILOW AGS, LAMB DC, KELLY SL, MILITE C, GRANATA I, SBARDELLA G, STEFANCICH G, MARESCA B, PORTA A. Antifungal activity of azole compounds CPA18 and CPA109 against azole-susceptible and-resistant strains of *Candida albicans*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(5): 1111-1119.
- [19] LEITE B, GOMES F, TEIXEIRA P, SOUZA C, PIZZOLITTO E, OLIVEIRA R. Combined effect of linezolid and *N*-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2013, 31(10): 655-659.
- [20] YOUSUF S, AHMAD A, KHAN A, MANZOOR N, KHAN LA. Effect of garlic-derived allyl sulphides on morphogenesis and hydrolytic enzyme secretion in *Candida albicans*[J]. *Medical Mycology*, 2011, 49(4): 444-448.
- [21] ELLEPOLA ANB, JOSEPH BK, KHAN ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate[J]. *Mycoses*, 2014, 57(9): 553-559.
- [22] MAURYA A, PRASAD J, DAS S, DWIVEDY AK. Essential oils and their application in food safety[J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2021, 5: 653420.
- [23] EL-HOUSSAINI HH, ELNABAWY OM, NASSER HA, ELKHATIB WF. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 128: 13-19.
- [24] MAHBOUBI M, MAHDIZADEH E, HEIDARYTABAR R. The anti-candidal activity of *Pelargonium graveolens* essential oils against clinical isolates of *Candida albicans*[J]. *Infectio*, 2018, 22(1): 9-12.
- [25] POZZATTI P, ALVES SCHEID L, SPADER TB, ATAYDE ML, SANTURIO JM, ALVES SH. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp.[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54(11): 950-956.
- [26] 张妤. 百里香精油成分含量及组分的比较研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2007.
- ZHANG Y. Comparison between components and contents of aromatic oil in different species of *Thymus*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2007 (in Chinese).
- [27] ADHAVAN P, KAUR G, PRINCY A, MURUGAN R. Essential oil nanoemulsions of wild patchouli attenuate multi-drug resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 100: 106-116.
- [28] KHAN MSA, AHMAD I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 140(2): 416-423.
- [29] DIAO WR, HU QP, ZHANG H, XU JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 109-116.