

植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的作用

李宇轩, 王琳*

(北京食品科学研究院 中国肉类食品综合研究中心 北京 100068)

摘要 本文研究具有抑菌效果的药食同源植物提取物对冷却肉中关键腐败菌——假单胞菌生物被膜的抑制、清除效果。从市售冷却肉中分离一株具有较强生物被膜形成能力的假单胞菌,经鉴定为浅黄假单胞菌 8-4。采用结晶紫染色法观察蒲公英、金银花、丁香、肉桂、薄荷、桑叶等 6 种植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制和清除作用。结果表明:金银花提取物和蒲公英提取物对浅黄假单胞菌的抑制和清除效果最佳。为进一步分析其对生物被膜的作用机制,将提取物的共同功效性成分绿原酸作用于生物被膜,测定绿原酸对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制、清除作用及对生物被膜代谢活性的影响。采用激光共聚焦扫描电镜观察绿原酸对生物被膜微观结构的变化。结果表明:绿原酸对浅黄假单胞菌的抑制和清除作用效果显著,在绿原酸作用下生物被膜的代谢活性降低。在高质量浓度绿原酸作用下菌体无法聚集黏连形成生物被膜,而低质量浓度作用下的菌体虽能形成生物被膜,但结构立体性较低。结论:植物提取物中的绿原酸通过抑制菌体生长而抑制生物被膜形成,通过弱化成熟生物被膜立体结构而清除生物被膜。

关键词 浅黄假单胞菌; 生物被膜; 植物提取物; 绿原酸; 抑制; 清除

文章编号 1009-7848(2022)02-0271-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.029

假单胞菌是冷却肉中的关键腐败菌^[1-2]。生物被膜是一种包裹细菌群落的外膜,其成分十分复杂,含有细菌、细菌分泌的大分子多聚物(如蛋白质、多糖、脱氧核糖核酸、核糖核酸、肽聚糖、磷脂等)、吸附的营养物质和代谢产物以及细菌裂解产物等^[3-4]。形成生物被膜后的假单胞菌对外界环境的耐性和抗性增加,难以被清除,在生产、加工以及流通经营过程中,可附着于食品及原材料表面,对加工设备和操作人员造成二次污染^[5-6]。

大量研究表明植物多酚具有抑菌^[7-8]、抗炎^[9-10]等作用。例如:松毛菇多酚抑制金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母活性^[11],鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜有清除作用^[12],金银花中酚酸类成分对巨噬细胞经 LPS 刺激后产生的炎症具有缓解作用^[13]。然而,植物活性成分对生物被膜的作用效果鲜有报道。植物多酚大多为多羟基结构,与生物被膜中多糖成分具有结构相似性,能与之形成分子间作用力^[14-15]。推断植物多酚具有清除生物被膜的潜在能力^[16-17]。然而,植物活性成分来源广泛、分离难度

大、成本较高,难以快速、准确筛选具有控制生物被膜的功能成分。此外,植物活性成分结构复杂,非单一性物质参与生物活性反应,导致其对生物被膜的作用机制不明^[18]。

蒲公英、金银花、丁香、肉桂、薄荷、桑叶等已被我国列入“药食同源食品”目录,其植物提取物成本低,且在我国已实现规模化生产。本研究将上述 6 种比例提取物作用于浅黄假单胞菌及其生物被膜,探究其对生物被膜的抑制和清除效果,筛选出效果较好的植物提取物,归纳总结提取物中的相似功效性成分。从生物被膜的代谢活性和微观结构方面验证该功效性成分对生物被膜的影响,旨在明确植物性功效成分与生物被膜的作用关系,初步探讨植物性成分对生物被膜的作用机制,为调控生物被膜提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

浅黄假单胞菌(*Pse.luteola*)8-4 为本实验室保存菌株;假单胞菌选择性培养基,法国科玛嘉公司;营养琼脂培养基、LB 培养基、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB),北京陆桥技术股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;引物由华大基因合成;二甲基亚砜(Dimethyl

收稿日期: 2021-02-20

作者简介: 李宇轩(1991—),男,硕士,工程师

通信作者: 王琳 E-mail: linwang1110@163.com

sulfoxide, DMSO); 噻唑蓝, 江苏凯基生物技术股份有限公司; 异硫氰酸荧光素标记的刀豆蛋白 A (FITC-conA), 美国 Sigma 公司; 6 种植物提取物 (10:1 蒲公英提取物粉末、10:1 金银花提取物粉末、10:1 丁香提取物粉末、10:1 肉桂提取物粉末、10:1 薄荷提取物粉末、10:1 桑叶提取物粉末)、来源于金银花的绿原酸粉末 (纯度 98%), 南京泽朗生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

MULTISKAN GO 1510 酶标仪, 美国 Thermo 公司; BPC-150F 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统, 生物梅里埃(中国)有限公司; BX 51 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定 菌株进行革兰氏染色、形态观察和氧化酶试验, 用 16S rDNA 进行确证。上游引

物 (27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 (1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'; 以细菌总 DNA 为模板进行聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增^[19]。PCR 扩增参数为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 重复 30 个循环, 72 °C 保温 5 min^[20-21]。PCR 产物送华大基因测序。测序结果在 NCBI 网站进行 Blast 比对, 用 MEGA5 软件构建系统发育树^[22-23]。

1.3.2 碳源代谢指纹图谱分析 用无菌棉签收集 30 °C 下营养琼脂平板培养 24 h 的菌株至生理盐水中, 用浊度仪制备 0.50~0.63 麦氏单位的菌悬液。在 GN 卡上, 每孔接种配制好的菌悬液 100 μ L。将 GN 卡置于载卡台上, 30 °C 孵育 24 h。用 VITEK 2 Compact 微生物自动分析系统读取 GN 卡板鉴定结果, 获得菌株的碳源代谢指纹图谱。GN 卡的碳源分布如表 1 所示。

表 1 GN 板的碳源分布

Table 1 Distribution of carbon source on GN plate

	1	2	3	4	5	6
A	APPA	AGLTp	BXYL	SAC	SUCT	CMT
B	ADO	dGlu	BAlap	dTAG	NAGA	BGUR
C	PyrA	GGT	ProA	dTRE	AGAL	O129R
D	lARL	OFF	LIP	CIT	PHOS	GGAA
E	dCEL	BGLU	PLE	MINT	GlyA	IMLTa
F	BGAL	dMAL	TyrA	5KG	ODC	ELLM
G	H2S	Dman	URE	ILATk	LDC	ITATa
H	BNAG	dMNE	dSOR	AGLU	IHISa	

注: 生化试验名称均为生化反应的缩写, 全称见 VITEK 2 的使用说明书。

1.3.3 生物被膜的定量检测 将冻存于 -80 °C 的浅黄假单胞菌 8-4 解冻, 接种于新鲜的 TSB 液体培养基中, 在 (36 \pm 1) °C 下培养 24 h 活化, 将经过 2 次活化 10 h 以上的重悬菌液在光密度 (OD) 为 600 nm 处稀释至 0.5, 将 96 孔酶标板中加入 195 μ L TSB 培养基, 然后用移液器吸取 5 μ L 菌悬液至酶标板孔中, 设置 6 个平行和 1 个空白对照, 在 30 °C 条件下将上述酶标板培养 24 h, 将酶标板孔内浮游菌用无菌生理盐水清洗干净, 重复 3 次。用移液器吸取 200 μ L 甲醇放入每孔中, 静置 15 min 固定, 吸出甲醇并置于超净工作台晾干; 吸取质量

浓度为 1 g/mL 的结晶紫草酸铵溶液 200 μ L 加入每孔中, 染色 5 min。随后吸出染液并用流水反复冲洗酶标板, 直至洗净; 将酶标板晾干后, 每孔加入 200 μ L 33% 乙酸, 用酶标仪测定 OD_{655nm} 值^[24-25]。

1.3.4 植物提取物对生物被膜的抑制作用 参考 Andreia 等^[26]和刘永吉等^[27]的方法, 利用微量肉汤稀释法测定最小抑菌质量浓度 (MIC)。将 195 μ L 用 TSB 培养基稀释的不同质量浓度 (50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.00 mg/mL) 的植物提取物依次加入到 96 孔板各列。第 1~7 行分别接种 5 μ L OD_{600nm}=0.5 的菌悬

液,第 8 行不接菌,作为空白对照。在 30 ℃恒温条件下培养 24 h,然后根据观察判断,选出板中明显不长菌的孔,其对应加入植物提取物的质量浓度作为 MIC。同时,按照 1.3.3 节方法测定生物被膜,并计算抑制率,随后选取相关数据进行做图分析。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{655\text{nm}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100$$

1.3.5 植物提取物对生物被膜的清除作用 在 96 孔板加入新鲜的 TSB 培养基,将假单胞菌 8-4 转入并培养 24 h,随后将板孔内培养基吸出,孔板用无菌生理盐水清洗,重复 3 次。将 195 μL 用 TSB 培养基稀释的不同质量浓度 (50, 25, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.00 mg/mL) 植物提取物依次加入到 96 孔板各列。30 ℃培养 24 h,按照 1.3.3 节的方法测定生物被膜,并计算清除率,随后选取相关数据进行做图分析。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{655\text{nm}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100$$

1.3.6 生物被膜代谢活力的测定 将上一步 96 孔板中的培养液弃去,用无菌磷酸盐缓冲溶液冲洗孔板 3 次,避光进行试验操作,将 10% MTT 溶液与 TSB 培养基以体积比 1:9 混合均匀。每孔加入 200 μL 混合液,37 ℃避光培养 4 h 后取出,弃废液。用无菌磷酸盐缓冲液清洗孔板 3 次后,加入 200 μL 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 静置 10 min,使结晶物甲瓚充分溶解。用酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度值。

1.3.7 激光共聚焦扫描显微镜观察 将菌液用吸纸缓慢吸出,用 PBS 清洗 3~5 min,重复 3 次。加入 2.5% 戊二醛静置 2 h 固定后,用 PBS 反复清洗

3 次。将玻片边缘水分吸净,用 50 μg/mL 的 FITC-conA 滴加在玻片上覆盖,在 4 ℃避光条件下染色 30 min。用 PBS 清洗干净后制成玻片,将玻片置于 LeicaTCS SP5 激光共聚焦扫描电镜中,在 488 nm 激发波长条件下形成图像。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 软件进行数据处理。对生物被膜使用 IBM SPSS Statistics 20 软件 ANOVA 法进行定量、抑制率、清除率、代谢活性、泳动能力等单因素分析。差异显著水平 $P < 0.05$,数据用平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 冷却肉中浅黄假单胞菌的鉴定

在前期研究中已证明,假单胞菌 8-4 具有较强生物被膜形成能力^[28]。将该假单胞菌进行 16S rDNA 测序,将测序结果序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 检索,经比对后从检索结果中选取基因序列相似性 99% 以上的典型菌株,采取 Neighbour-Joining 方法构建系统发育进化树,结果如图 1 所示。从检索结果和构建的进化树综合分析,该假单胞菌与假单胞菌 PP103 等假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 的菌株亲源性较近。为进一步对该菌进行生理生化鉴定,采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行分析,该系统是根据生化反应结果与库中标准菌株进行聚类分析,从而有效反映不同菌株在代谢上的关系^[29]。经系统鉴定分析,判定假单胞菌 8-4 为浅黄假单胞菌(结果如表 2 所示)。

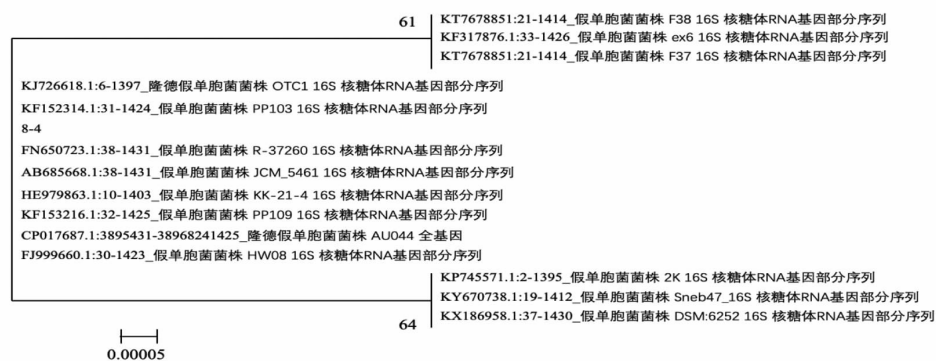


图 1 假单胞菌 8-4 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育进化树

Fig.1 Phylogenetic tree made by *Pseudomonas* sp. 8-4 based on 16S rDNA gene sequences

表2 冷却肉中浅黄假单胞菌的碳源代谢指纹图谱分析

Table 2 Analysis of carbon source metabolism fingerprint of *Pseudomonas luteus* in chilled meat

生化试验名称	结果	生化试验名称	结果	生化试验名称	结果
APPA	-	IARL	-	SUCT	+
H2S	-	dGLU	+	PHOS	-
BGLU	-	dMNE	+	LDC	-
ProA	+	TyrA	+	BGUR	-
SAC	-	CIT	+	IMLTa	+
ILATk	+	NAGA	-	dTRE	-
GlyA	(-)	IHISa	-	5KG	-
O29R	+	ELLM	-	dSOR	-
ADO	-	dCEL	+	PLE	-
BNAG	-	GGT	+	BAlap	-
dMAL	+	BXYL	-	dMAN	-
LIP	-	URE	-	OFF	+
dTAG	-	MNT	-	AGLTp	-
AGLU	-	AGAL	-	BGAL	-
ODC	-	CMT	+	PyrA	+
GGAA	-	ILATa	-		
鉴定结果		浅黄假单胞菌		可信度	85%

2.2 植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制作用

图2是不同质量浓度的6种植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜测定数值的影响。植物提取物质量浓度在50~3.13 mg/mL范围时,生物被膜数值与蒲公英、金银花提取物质量浓度成正相关。在3.13~0.20 mg/mL质量浓度范围为生物被膜数值最低区间。植物提取物质量浓度小于0.20 mg/mL时,生物被膜数值与蒲公英、金银花提取物质

量浓度成负相关,其余植物提取物则规律不显著。综上,蒲公英、金银花提取物仅在小于等于3.13 mg/mL时对浅黄假单胞菌生物被膜具有抑制作用,抑制作用随质量浓度降低而减弱。表3为6种植物提取物对浅黄假单胞菌的MIC测定结果,丁香、肉桂、薄荷、桑叶提取物对浅黄假单胞菌不具有抑制作用。蒲公英提取物对浅黄假单胞菌的MIC为25 mg/mL,金银花提取物对浅黄假单胞菌的MIC为12.5 mg/mL。蒲公英、金银花提取物大于等于

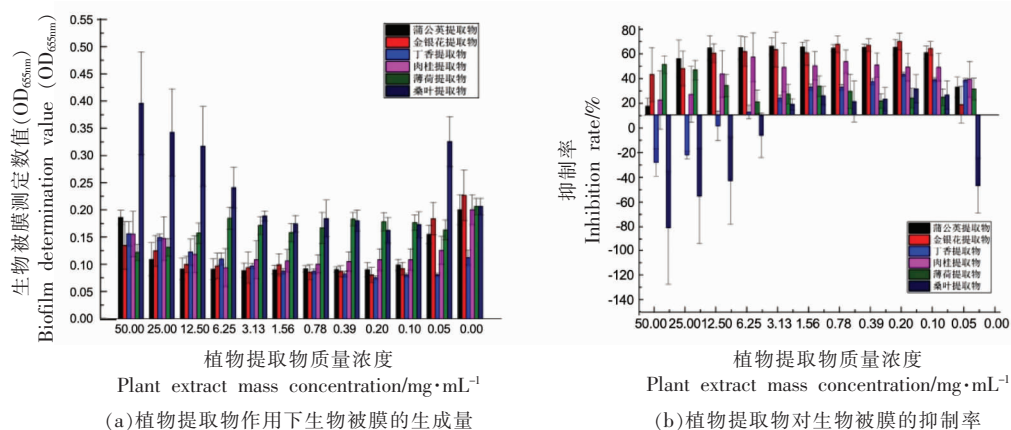


图2 植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制作用

Fig.2 Inhibition effect of plant extracts on *Pseudomonas luteola* biofilm

MIC 时, 主要通过抑制菌体生长而抑制生物被膜形成。然而, 生物被膜测定结果表明(图 2), 在高于最小抑菌浓度(蒲公英:25 mg/mL、金银花:12.5 mg/mL)时, 提取物对生物被膜反而具有促进作用。这可能是由于在培养过程中植物提取物少量析出, 在测定时被固定, 被结晶紫染色, 造成测定结

果偏高。

通过分析植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜抑制率(图 2b)的影响可知, 蒲公英和金银花提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制效果较好。这两种提取物中的抑菌成分均为绿原酸^[30-31], 推测绿原酸对生物被膜具有抑制作用。

表 3 植物提取物对浅黄假单胞菌 MIC 的测定结果

Table 3 Determination results of MIC of plant extracts against *Pseudomonas luteola*

植物提取物 质量浓度/ mg·mL ⁻¹	植物提取物作用效果						
	蒲公英提取物	金银花提取物	丁香提取物	肉桂提取物	薄荷提取物	桑叶提取物	绿原酸
50.00	-	-	+	+	+	++	-
25.00	-	-	+	-	+	+	-
12.50	+	-	+	-	+	++	-
6.25	+	+	+	+	++	++	-
3.13	+	+	+	+	++	++	-
1.56	++	+	+	++	++	++	+
0.78	++	+	++	++	++	+++	+
0.39	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0.20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0.10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0.05	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
培养基对照	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
空白对照	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”代表澄清,“+”代表轻微浑浊,“++”代表浑浊,“+++”代表十分浑浊。

2.3 植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的清除作用

图 3 是探究不同质量浓度的 6 种植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的清除作用。通过分析

植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜清除率的影响(图 3b)可知, 蒲公英和金银花提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的清除率较高。由此推测这两种提取物中的绿原酸是通过抑制生物被膜的形成来

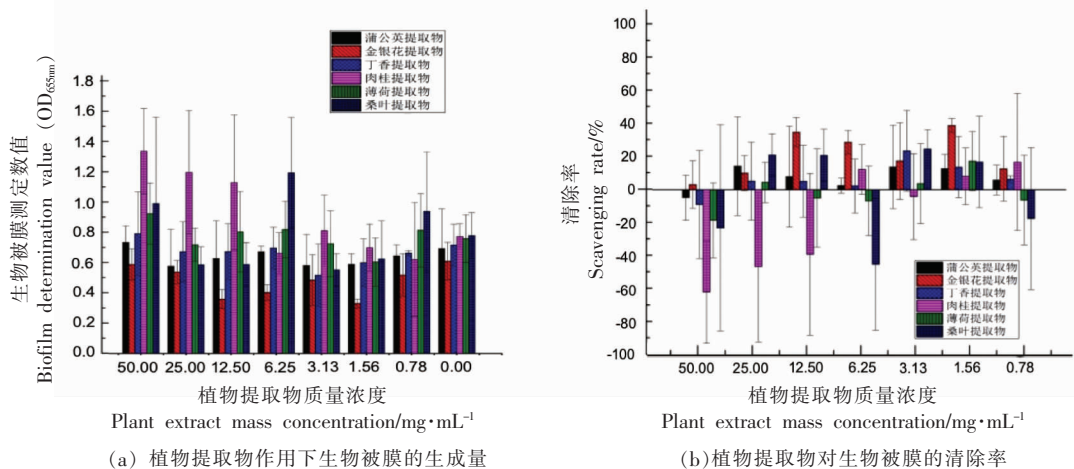


图 3 植物提取物对浅黄假单胞菌生物被膜的清除作用

Fig.3 Scavenging effect of plant extracts on *Pseudomonas luteola* biofilm

实现有效清除,而具体过程还需进一步研究。

2.4 绿原酸对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制和清除作用

图4为不同质量浓度绿原酸对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制作用和清除作用。绿原酸在低于

0.39 mg/mL时抑制菌体生长的能力逐渐降低,推测因植物提取物中绿原酸含量存在差异,是造成金银花提取物和蒲公英提取物对浅黄假单胞菌生物被膜抑制效果不同的主要原因。

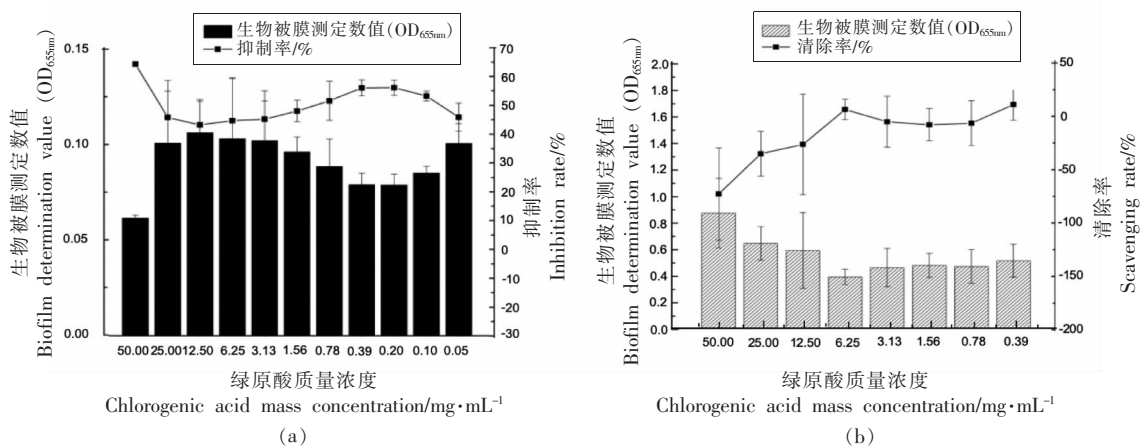


图4 绿原酸对浅黄假单胞菌生物被膜的抑制和清除作用

Fig.4 Inhibitory and scavenging effects of chlorogenic acid on *Pseudomonas luteola* biofilms

2.5 绿原酸对浅黄假单胞菌生物被膜的作用机制

2.5.1 绿原酸对生物被膜活力的影响分析 在浅黄假单胞菌生物被膜形成之前,使用不同质量浓度绿原酸处理浅黄假单胞菌,结果如图5所示。随着绿原酸质量浓度加大,对生物被膜活力的抑制作用越明显。绿原酸的最小抑菌浓度为3.13 mg/mL,且质量浓度降低,抑制率明显降低。为进一步

研究绿原酸对生物被膜的清除作用,在形成成熟生物被膜之后加入绿原酸,检测生物被膜活力的数值。随着绿原酸质量浓度升高,生物被膜活力明显降低。当低于最小抑菌浓度3.13 mg/mL时,其对生物被膜的清除效果呈现逐渐降低趋势,这说明植物提取物对生物被膜代谢活力不具有清除作用,且对生物被膜的清除机制是通过抑制菌体生长从而清除生物被膜。

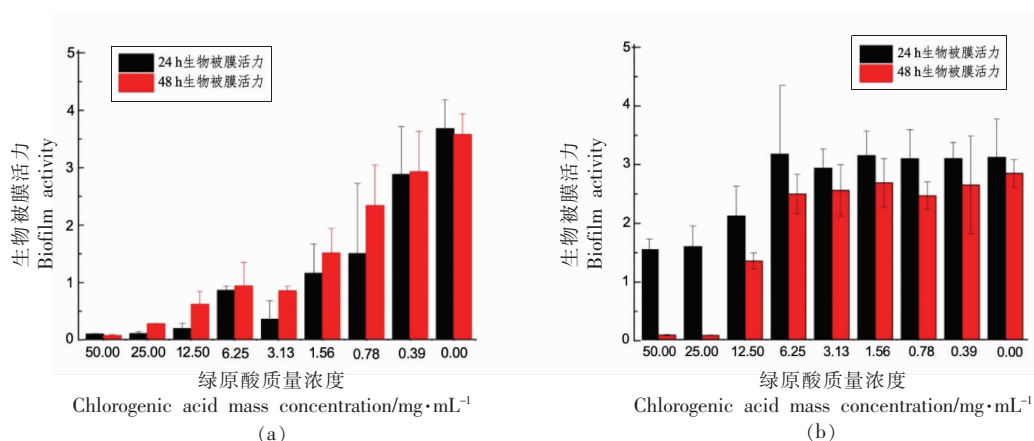


图5 绿原酸对浅黄假单胞菌生物被膜活力的抑制和清除作用

Fig.5 Effect of chlorogenic acid on the biofilm activity of *Pseudomonas luteola*

2.5.2 绿原酸作用下生物被膜表观呈像分析 荧光染料 FITC 标记的 ConA 与细菌的胞外多糖特异结合并发出绿色荧光, 荧光信号的强弱与多糖黏附量有关, 多糖黏附量增加, 荧光信号积累增强。用 FITC-ConA 染色生物被膜后, 采用激光共聚焦显微镜观察绿原酸对生物被膜的抑制效果, 如图 6 所示。由图 6a 和 6b 可知, 在高于最小抑菌浓度 3.13 mg/mL 条件下, 绿原酸通过抑制菌体生长从抑制生物被膜产生, 其胞外多糖和菌体呈散落状分布。图 6c 和 6d 可见荧光信号增强, 菌体明

显聚集, 生物被膜厚度增加, 且周围布满孔隙。在图 6d 中可见少量褶皱, 这表明在 6.25 mg/mL 已经开始呈立体结构。图 6e 和 6f 褶皱、沟壑明显增多, 生物被膜立体结构呈堆状连结。图 6m 为 TSB 培养基对照, 为多层的成熟生物被膜。绿原酸能够抑制假单胞菌生物被膜, 当高于最小抑菌浓度时, 通过初期抑制菌体生长来抑制菌体形成生物被膜; 当低于最小抑菌浓度时, 通过抑制生物被膜形成立体结构来抑制形成生物被膜。

在培养 24 h 的成熟生物被膜中加入不同质

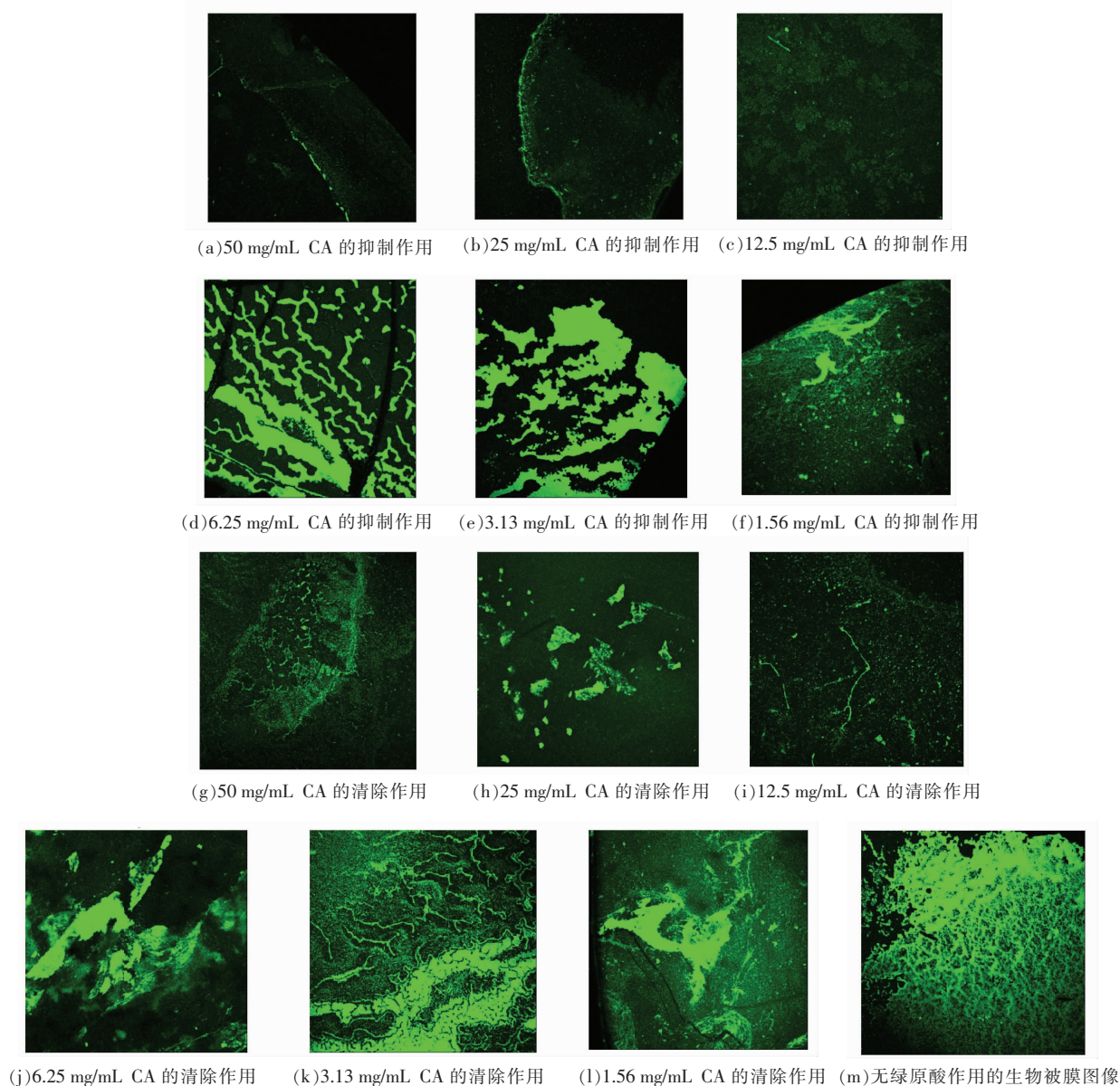


图 6 绿原酸作用下对浅黄假单胞菌生物被膜的激光共聚焦图像(20×)

Fig.6 Confocal laser imaging of *Pseudomonas luteol* biofilm under chlorogenic acid(20×)

量浓度绿原酸,随着绿原酸质量浓度的逐渐降低,对生物被膜的清除效果逐渐减弱。用 FITC-ConA 染色生物被膜后,激光共聚焦显微镜观察结果对生物被膜的清除效果,见图 6g~m。随着绿原酸质量浓度降低,生物被膜褶皱明显增多,生物被膜立体结构增强。绿原酸对生物被膜的清除作用是通过破坏生物被膜的立体结构。

3 结论

本研究证明绿原酸能够抑制生物被膜的形成,对成熟生物被膜具有清除作用。绿原酸对生物被膜的抑制和清除效果与质量浓度有关。绿原酸作用下的成熟生物被膜活力与质量浓度呈负相关,这说明绿原酸能够渗透到生物被膜内部,对活菌具有杀灭效果。表观成像研究结果表明,绿原酸通过抑制浅黄假单胞菌菌体生长而抑制生物被膜形成。对成熟生物被膜的作用体现在弱化了生物被膜的紧实结构,导致生物被膜断裂成块状,且质量浓度越高,这种破坏被膜结构的作用效果越强,推测绿原酸清除生物被膜的机制主要是通过弱化生物被膜分子间作用力,使生物被膜的结构出现疏松的孔状,从而深入到生物被膜内部,对菌体活力产生影响。本研究为植物资源应用于肉制品保鲜提供新思路。

参 考 文 献

- [1] 朱军莉,王慧敏,王桂洋,等. 茶多酚和葡萄籽提取物对假单胞菌抗生物被膜的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 84-90.
ZHU J L, WANG H M, WANG G Y, et al. Inhibition activity of tea polyphenols and grape seed extract on biofilm formation of *Pseudomonas*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 84-90.
- [2] SADEKUZZAMAN M, MIZAN M, KIM H S, et al. Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces [J]. LWT -Food Science and Technology, 2018, 89: 134-139.
- [3] COSTERTON J W, GREENBERG P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [4] 邹明明,王文骏,马晓彬,等. 细菌生物被膜的研究进展[J]. 中国食品学报, 2017, 17(7): 156-164.
ZOU M M, WANG W J, MA X B, et al. Research progress on bacterial biofilm [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(7): 156-164.
- [5] ZHANG X, YUAN H, WANG Y, et al. Cell surface energy affects structure of microalgal biofilm[J]. Langmuir, 2020, 36(12): 3057-3063.
- [6] DONLAN R M, COSTERTON J W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2): 167-193.
- [7] 张红锋,白艳军. 中药金银花提取物的体外抑菌作用 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2000(1): 107-110.
ZHANG H F, BAI Y J. *In vitro* antibacterial effect of traditional Chinese medicine honeysuckle extract [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 2000(1): 107-110.
- [8] CHIBANE L B, DEGRAEVE P, FERHOUT H, et al. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(4): 1457-1474.
- [9] 王芳,黄超培,李彬,等. 复方蜂胶金银花提取物对炎症大鼠和小鼠的抗炎作用[J]. 广西医学, 2018, 40(16): 1833-1836.
WANG F, HUANG C P, LI B, et al. Anti-inflammatory effects of compound formula propolis and *Lonicera japonica* Thunb. extract on inflammatory rats and mice [J]. Guangxi Medical Journal, 2018, 40(16): 1833-1836.
- [10] ZENG B Y, SU M H, CHEN Q X, et al. Protective effect of a polysaccharide from *Anoectochilus roxburghii* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 200(22): 124-135.
- [11] 李彦坡,黄艳,程璐洁,等. 松毛菇多酚的抗氧化及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(3): 173-178.
LI Y P, HUANG Y, CHENG L J, et al. Antioxidant and antibacterial activity of polyphenols from *Lyophyllum Cinoraseens* Konr&Maubl [J]. Food and Machinery, 2020, 36(3): 173-178.
- [12] 王艳,程惠娟,朱玲玲,等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜的影响[J]. 食品科学, 2013(11):

- 173-176.
- WANG Y, CHENG H J, ZHU L L, et al. Effect of sodium houttuynonate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. Food Science, 2013(11): 173-176.
- [13] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.
- SONG Y L, WANG H M, NI F Y, et al. Study on anti-inflammatory activities of phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(4): 490-495.
- [14] 费鹏, 赵胜娟, 陈曦. 植物多酚抑菌活性、作用机理及应用研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 226-230.
- FEI P, ZHAO S J, CHEN X. The research progress on antimicrobial activity, mechanism and application of plant polyphenols[J]. Food & Machinery, 2019, 35(7): 226-230.
- [15] 李文慧, 刘飞, 李应彪, 等. 植物多酚对肉制品蛋白氧化的抑制机理及其延长货架期的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 266-272.
- LI W H, LIU F, LI Y B, et al. Inhibitory mechanism of plant polyphenols on protein oxidation and their application for shelf-life extension of meat products: A literature review[J]. Food Science, 2019, 40(21): 266-272.
- [16] 慈颖, 王思, 王静, 等. 植物源抗菌消毒剂研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2020, 43(4): 4.
- CI Y, WANG S, WANG J, et al. Research progress on botanical antibacterial disinfectant [J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2020, 43(4): 4.
- [17] MAGDALENA A O, ASTRID G, MANUEL S. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry [J]. Food Research International, 2020, 134(2): 109214.
- [18] 张佳欣. 多酚类化合物协同抗氧化性研究进展[J]. 现代农业研究, 2020, 49(1): 117-118, 121.
- ZHANG J X. Advances in the synergistic antioxidant properties of polyphenols[J]. Modern Agriculture Research, 2020, 49(1): 117-118, 121.
- [19] 王琳, 李宇轩, 范维, 等. 金银花提取物对冷却肉中假单胞菌黏附性的影响[J]. 肉类研究, 2020, 34(2): 20-26.
- WANG L, LI Y X, FAN W, et al. Effect of flos *Lonicerae japonicae* extract on the adhesion ability of *Pseudomonas* strains from chilled pork[J]. Meat Research, 2020, 34(2): 20-26.
- [20] 刘永吉, 谢晶, 赵丽珺, 等. 冷却猪肉及托盘表面细菌生物被膜分析和肉源荧光假单胞菌的鉴定与被膜研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(6): 42-49.
- LIU Y J, XIE J, ZHAO L J, et al. Biofilm-forming ability of bacteria from chilled pork and tray surfaces and biofilm characteristics of meat-related *Pseudomonas fluorescens* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 42-49.
- [21] 李娜, 范祎立, 李雪, 等. 1株微生物絮凝剂产生菌的分离, 鉴定与絮凝剂的成分分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 288-292.
- LI N, FAN Y L, LI X, et al. Isolation, identification of a bioflocculant-producing bacterium and analysis of flocculant components[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(13): 288-292.
- [22] 王琳, 曹雁平, 张单单, 等. 真空包装麻酱中腐败菌的分离鉴定及对麻酱品质的影响[J]. 中国食品学报, 2017, 17(6): 187-194.
- WANG L, CAO Y P, ZHANG D D, et al. Isolation and identification of the spoiled bacteria from the vacuum packaging sesame noodle seasoning and analysis the spoilage impact on it[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(6): 187-194.
- [23] 张吉红, 陆承平. 嗜水气单胞菌生物被膜对其耐药性的影响[J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 498-502.
- ZHANG J H, LU C P. Effects of *Aeromonas hydrophila* biofilm on the drug resistance[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(4): 498-502.
- [24] KOCOT A M, OLSZEWSKAI M A. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes*, in a food processing context [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 47-57.
- [25] MALEGORI C, FRANZETTI L, GUIDETTI R, et al. GLCM, an image analysis technique for early detection of biofilm[J]. Journal of Food Engineering, 2016, 185: 48-55.
- [26] ANDREIA D, ALVES A C, SUSANA F, et al. Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*[J]. Food Research International, 2015, 77(2): 244-250.
- [27] 刘永吉, 范玉慧, 郭红辉. 桃金娘果实花色苷提取

- 物对两种假单胞菌生物被膜的抑制[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 28-31.
- LIU Y J, FAN Y H, GUO H H. Antibiofilm activity of anthocyanin extracts from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk for two *Pseudomonas* bacterial[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 28-31.
- [28] 王琳, 李宇轩, 刘国荣, 等. 金银花和蒲公英提取物对肉源性假单胞菌生物被膜的清除作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 106-111, 120.
- WANG L, LI Y X, LIU G R, et al. Scavenging effect of honeysuckle and dandelion extracts on the biofilm of *Pseudomonas* stains from meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 106-111, 120.
- [29] 姚婷, 陈其葳, 张燕, 等. 3株果实采后葡萄孢属真菌 ITS 区 rDNA 序列与碳源代谢指纹图谱分析[J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(4): 49-55.
- YAO T, CHEN Q W, ZHANG Y, et al. Analysis of rDNA ITS and carbon metabolic fingerprinting of botrytis nees isolated from three fruits[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 35(4): 49-55.
- [30] 潘明飞, 杨晶莹, 李睿, 等. 药食同源食品金银花中绿原酸标准物质的研制与评价[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 230-238.
- PAN M F, YANG J Y, LI R, et al. Development and evaluation of chlorogenic acid reference material in honeysuckle of medicinal and food homologous food[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(4): 230-238.
- [31] 张浩超, 郝宝燕, 孙皓熠, 等. 绿原酸研究进展[J]. 食品与药品, 2017, 19(3): 222-227.
- ZHANG H C, HAO B Y, SUN H Y, et al. Research progress on chlorogenic acid [J]. Food and Drug, 2017, 19(3): 222-227.

Effect of Plant Extract on *Pseudomonas luteola* Biofilm

Li Yuxuan, Wang Lin*

(China Meat Research Center, Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100068)

Abstract In order to research the inhibitory effect and mechanism of plant extracts on the biofilm of *Pseudomonas luteola*. The effects of 6 kinds of extracts, such as dandelion, honeysuckle, clove, cinnamon, mint and mulberry leaf, on the biofilm formation of *Pseudomonas luteola* were measured. The clearance rate and inhibition rate of biofilm were calculated. The results showed that the extracts of dandelion and honeysuckle, which contains the same functional components - chlorogenic acid (CA), has the best inhibitory and scavenging effects on the biofilm of *Pseudomonas luteola*. Under the action of chlorogenic acid, the amount of biofilm was determined by crystal violet method, the metabolic activity of biofilm was determined by MTT method, and the apparent morphology of biofilm was analyzed by laser confocal scanning electron microscopy. CA had a significant inhibitory and scavenging effect on *Pseudomonas luteola*. The metabolic activity of biofilm was reduced under the action of CA. High concentrations of CA prevented the bacteria from conglomerating to form biofilm. The bacteria could form biofilm at low concentrations, but the stereoscopic property of the structure was low. Conclusion: CA from the plant extract could inhibit the formation of biofilm by inhibiting the growth of bacteria, weaken the three-dimensional structure of mature biofilm, and have the ability to clear biofilm

Keywords *Pseudomonas luteola*; biofilm; plant extracts; chlorogenic acid; inhibition; clear