

苯乳酸对霍氏肠杆菌及其生物被膜的抑制作用

孙家兴^{1,2}, 李秋莹^{1,2*}, 崔方超^{1,2}, 檀茜倩^{1,2}, 孙彤^{1,2}

¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

²生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013)

摘要 目的:探究苯乳酸(PLA)对霍氏肠杆菌及其生物被膜中的抑制作用。方法:通过最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)、生长曲线、流式细胞术、碱性磷酸酶(AKP)活性、细胞膜完整性、DNA含量、运动能力、生物被膜形成量的测定与激光共聚焦观察等试验,评价 PLA 对霍氏肠杆菌及其生物被膜的抑制作用。结果:PLA 对霍氏肠杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 1.25 mg/mL 和 2.5 mg/mL,在该质量浓度下可完全抑制霍氏肠杆菌生长。流式细胞仪检测结果表明:1/2 MIC 和 MIC 苯乳酸不会导致细胞凋亡和坏死,而 2 MIC PLA 可造成细胞死亡。28 °C 培养下霍氏肠杆菌的生长曲线虽较 37 °C 培养延滞近 1 h,但未影响其最大生物量,且细胞凋亡率没有显著差异。PLA 破坏了细胞结构的完整性,造成细胞内 AKP 活性降低,核酸与蛋白质泄漏;2 MIC PLA 可导致菌体 DNA 含量显著降低 ($P < 0.05$);PLA 处理可导致霍氏肠杆菌运动能力和生物被膜生成量降低。结论:PLA 对霍氏肠杆菌及其生物被膜有较强的抑制作用。

关键词 苯乳酸;霍氏肠杆菌;抑菌;生物被膜

文章编号 1009-7848(2024)11-0040-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.11.005

霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)是革兰氏阴性直杆菌,周生鞭毛、兼性厌氧,可以从乳制品、牛奶、水果、蔬菜、大米和婴儿奶粉等食品中分离出来^[1]。霍氏肠杆菌在特定条件下会引起动物和人感染,属于条件性致病菌。霍氏肠杆菌与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)同属于阴沟肠杆菌复合群,由于抗生素的过度使用和误用,因此产生较强的耐药性^[2]。

生物被膜(Biofilm, BF)是指细菌附着在有生命或无生命物体表面后被胞外大分子物质包裹的细菌群落^[3]。生物被膜具有较强的黏附性,成型后的生物被膜耐受性增强,因其具有很强的三维结构,故能构成物理屏障,限制和阻止抗菌剂或其它化学物质的穿透^[4-5],导致生物被膜中的细菌难以与抗菌剂接触,产生对抗菌剂的抗性^[6]。霍氏肠杆菌会在食品与医疗设备、运输管道和排水管道上形成生物被膜,且可以长时间存在,造成更多、更广泛的污染。因此,有必要发现新的、天然的霍氏肠杆菌及其生物被膜的抑制剂。

苯乳酸(Phenyllactic acid, PLA)化学名 2-羟基-3-苯基丙酸,是一种天然无毒且具有广谱抑菌作用的新型生物防腐剂^[7-9]。有报道证实 PLA 对大肠杆菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)等有较好的抑菌活性^[10-12]。然而,目前有关苯乳酸对霍氏肠杆菌及其生物被膜抑制作用研究较少。

本文以霍氏肠杆菌为研究对象,测定苯乳酸对其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度,通过测定生长曲线、细胞凋亡率、细胞结构完整性、对 DNA 的影响、细菌运动能力、生物被膜生成量及其微观结构来分析苯乳酸对霍氏肠杆菌及其生物被膜的作用机制。

1 材料与方法

1.1 菌株与材料

霍氏肠杆菌,渤海大学食品科学与工程学院实验室-80 °C 冰箱保存;苯乳酸、二乙酸荧光素,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;LB 营养肉汤、LB 营养琼脂培养基:青岛高科园海博生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)、结晶紫溶液、碘化丙啶(Propidium iodide, PI)、吖啶橙染色液(Acridine orange, AO)、戊二

收稿日期:2023-11-10

基金项目:国家自然科学基金项目(32202141)

第一作者:孙家兴,男,硕士生

通信作者:李秋莹 E-mail: liqiuqing21@163.com

醛,北京索莱宝科技有限公司;抗荧光淬灭封片剂,生工生物工程(上海)股份有限公司;碱性磷酸酶(AKP)测试盒,南京建成生物工程研究所;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、GeneRed 核酸染料,天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD 型洁净工作台,苏景集团苏州安泰空气技术有限公司;LDZX-50L-I 型立式高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;LRH-150 型生化培养箱,昆山一恒仪器有限公司;MS105UD 型电子分析天平,瑞士梅特勒-托利仪器有限公司;THZ-D 型台式恒温振荡器,苏州培英实验室设备有限公司;Sorrvall Legend Micro21R 台式微量离心机,美国 Thermo Fisher 公司;全自动生长曲线分析仪,芬兰 Bioscreen 公司;Victor X3 型酶标仪,美国 Perkin Elmer 公司;Accuri C6 Plus 流式细胞仪,上海实维实验仪器技术有限公司;UV2550 型紫外-可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;F7000 荧光分光光度计,日本日立株式会社;GelDoc XR+全自动凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;TCS-SP5 II 激光共聚焦显微镜,德国徕卡仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备 将贮藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的霍氏肠杆菌取出解冻,接种于 LB 肉汤培养基中,分别在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 160 r/min 摇床中振荡培养 12 h 后,重新接种于新鲜 LB 肉汤培养基中培养至霍氏肠杆菌对数生长期,稀释至浓度为 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL,备用。

1.3.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定 采用微量肉汤二倍稀释法测定苯乳酸对霍氏肠杆菌的 MIC。使苯乳酸终质量浓度分别为 10.000,5.000,2.500,1.250,0.625,0.313,0.156,0.078 mg/mL。分别在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内静置培养 24 h,观察结果。以肉眼观察,无菌生长的最低质量浓度即为苯乳酸的 MIC。将无菌生长的孔中培养液吸出 $100\text{ }\mu\text{L}$ 涂布于 LB 营养琼脂培养基平板上,分别继续在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内静置培养 24 h,无菌落形成的浓度即为苯乳酸的 MBC。

1.3.3 霍氏肠杆菌生长曲线的测定 将苯乳酸溶

液加入到霍氏肠杆菌菌悬液中,使其终质量浓度为 $1/2\text{ MIC}$ 、 MIC 、 2 MIC ,以未添加苯乳酸的菌液为对照组,使用全自动生长曲线仪分别在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,每间隔 1 h 测定 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值,并绘制霍氏肠杆菌生长曲线。

1.3.4 流式细胞仪检测 分别取 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养的霍氏肠杆菌菌悬液,于 $4\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min,收集菌体。将菌体用 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.4$)清洗 2 次,重复上述离心,收集菌体,再用 PBS 稀释,使菌悬液 $\text{OD}_{595\text{nm}}\approx 0.5$ 。将苯乳酸添加到菌悬液中,使其终质量浓度为 0 、 $1/2\text{ MIC}$ 、 MIC 、 2 MIC ,以未添加苯乳酸的菌液为对照组,分别于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养(160 r/min)24 h。取一定量的培养液离心收集菌体,将菌体用 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.4$)清洗 2 次后,使用 1 mL PI 染液染色并混合均匀,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光静置 30 min 后使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况^[13]。

1.3.5 碱性磷酸酶(AKP)的测定 取一定量在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养的霍氏肠杆菌悬液,于 $4\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min,收集菌体。将菌体用 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.4$)清洗 2 次,重复上述离心,收集菌体,再用 PBS 稀释,使菌悬液 $\text{OD}_{595\text{nm}}\approx 0.5$ 。将苯乳酸添加到菌悬液中,使其终质量浓度为 0 、 $1/2\text{ MIC}$ 、 MIC 、 2 MIC ,置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养(160 r/min)。分别于 24 h 和 48 h 取一定量的培养液离心收集菌体,将菌体用 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.4$)清洗 2 次后,用超声波破碎仪破碎菌体,使用碱性磷酸酶(AKP)试剂盒测定菌体 AKP 含量^[14]。

1.3.6 细胞膜完整性的测定 前处理参考 1.3.5 节方法,置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养(160 r/min)24 h。取一定量的培养液离心收集菌体,将菌体用 0.1 mol/L PBS($\text{pH}=7.4$)清洗 2 次后,使用 $250\text{ }\mu\text{L}$ 二乙酸荧光素-丙酮溶液(2 mg/mL)进行染色后静置 15 min,用 PBS 清洗并重悬后,在激发波长和发射波长分别为 297 nm 和 527 nm 时,使用荧光分光光度计测定平均荧光强度。

1.3.7 核酸泄漏的测定 前处理参考 1.3.5 节方法,置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养(160 r/min)24 h 和 48 h,离心收集上清液用紫外分光光度计在 260 nm 下测定 OD 值^[15]。

1.3.8 蛋白质泄漏的测定 前处理参考 1.3.5 节

方法,置于28℃振荡培养(160 r/min)24 h和48 h,离心收集上清液用紫外分光光度计在280 nm下测定OD值。

1.3.9 核酸凝胶电泳 前处理参考1.3.5节方法,置于28℃振荡培养(160 r/min)24 h。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取DNA,进行DNA琼脂糖凝胶电泳(100 V、60 min),凝胶成像系统拍照并分析。

1.3.10 运动能力的测定 为测定霍氏肠杆菌的运动能力,配制群集琼脂培养基(10 g/L蛋白胨、5 g/L氯化钠、5 g/L琼脂和5 g/L果糖),并将苯乳酸溶于培养基中,使其终质量浓度为0、1/2 MIC、MIC、2 MIC,取2 μL菌悬液接种于群集琼脂平板表面中心处,在28℃培养箱内静置培养24 h。测定细菌扩散圈的直径。

1.3.11 生物被膜形成量测定 取1 mL含不同质量浓度苯乳酸(0、1/2 MIC、MIC、2 MIC)的菌悬液至1.5 mL离心管中,混匀后在28℃培养箱内静置培养48 h和72 h。弃掉液体培养基,0.1 mol/L PBS(pH = 7.4)清洗2次,无菌风干燥30 min,加入1 g/L结晶紫溶液染色15 min,PBS清洗2次,最后,使用33%冰乙酸溶解附着在生物膜上的结晶紫,用酶标仪测定OD_{595nm}处的吸光度^[16]。

1.3.12 激光共聚焦显微镜观察 取1 mL含不同质量浓度苯乳酸(0、1/2 MIC、MIC、2 MIC)的菌悬液至无菌共聚焦玻底培养皿中,混匀后在28℃培养箱内静置培养72 h。弃掉液体培养基,0.1 mol/L PBS(pH = 7.4)清洗2次,无菌风干燥30 min,用1 mL 2.5%的戊二醛4℃下固定30 min,用1 mL 0.1 mg/mL的AO染色液室温避光条件下染色30 min,吸出染料,PBS冲洗后待其表面干燥,加入1滴抗荧光淬灭封片剂。使用激光共聚焦显微镜

进行观察(激发波长488 nm,阻断滤光片波长515 nm)^[17-18]。

1.3.13 分子对接 从Protein Data Bank(<http://www.rcsb.org/>)下载DNA的三级结构(ID:3CLC),在对接前对DNA和苯乳酸进行前处理,使用工具AutoGrid4, AutoDock4和MGL tool 1.5.6进行苯乳酸和DNA相互作用的分子对接,最后使用PyMol对结果渲染并输出。

1.3.14 统计分析 数据为重复3次的平均值,采用SPSS 18.0进行ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异显著。采用Excel和Origin 2019b软件处理数据和绘制图表。

2 结果与分析

2.1 苯乳酸对霍氏肠杆菌抑制活性的测定

MIC是评价物质抑菌能力的主要指标之一。由表1可知,当苯乳酸的稀释的质量浓度最小达到1.25 mg/mL时,不同培养温度下96孔板中均无菌生长,因此确定苯乳酸对霍氏肠杆菌的MIC为1.25 mg/mL。当苯乳酸质量浓度为1.25 mg/mL时,继续在LB营养琼脂培养基平板培养24 h上仍有少量菌落,而当质量浓度升至2.5 mg/mL时无菌落生长,因此确定MBC为2.5 mg/mL。结果表明,较低质量浓度的苯乳酸可抑制霍氏肠杆菌的生长,且存在质量浓度依赖性。有文献报道苯乳酸对大肠杆菌O157:H7(*E. coli* O157:H7)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的MIC分别是1.25、1.25、1.5和2.5 mg/mL,说明苯乳酸对霍氏肠杆菌的抑菌活性高于金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌,而与大肠杆菌O157:H7和荧光假单胞菌基本相同^[9]。

表1 不同温度下苯乳酸对霍氏肠杆菌的MIC测定结果

Table 1 Measure results of MIC of phenyllactic acid for *E. hormaechei* at different temperatures

测试项目	苯乳酸质量浓度/(mg/mL)							
	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625	0.313	0.156	0.078
MIC(28℃)	—	—	—	—	+	+	+	+
MIC(37℃)	—	—	—	—	+	+	+	+

注:“+”表示观察到细菌明显生长,“—”表示细菌无明显生长。

2.2 苯乳酸对霍氏肠杆菌的生长抑制作用

微生物生长曲线能有效反映微生物数量随时

间变化。由28℃培养下霍氏肠杆菌的生长曲线可知(图1a),本试验中对照组霍氏肠杆菌在5 h时

开始进入对数生长期, 而加入 1/2 MIC 苯乳酸后其进入对数生长期时间延后 1 h。在培养过程中, 1/2 MIC 组 OD 值相较于对照组偏小, 而最终进入稳定期时与对照组最大生物量基本一致, 说明该质量浓度下的苯乳酸无法完全抑制霍氏肠杆菌的生长能力。图 1b 显示 37 °C 培养下的生长曲线在 3 h 时开始进入对数生长期, 在整个培养过程中,

1/2 MIC 的 OD 值一直小于对照组。然而, 2 个培养温度下 MIC 与 2 MIC 组中, OD 值在整个培养过程中未增加, 表明此时霍氏肠杆菌的生长被完全抑制。37 °C 培养的霍氏肠杆菌较 28 °C 培养能更快速进入对数生长期及稳定期, 生长速率更快, 而最大生物量无显著差异。

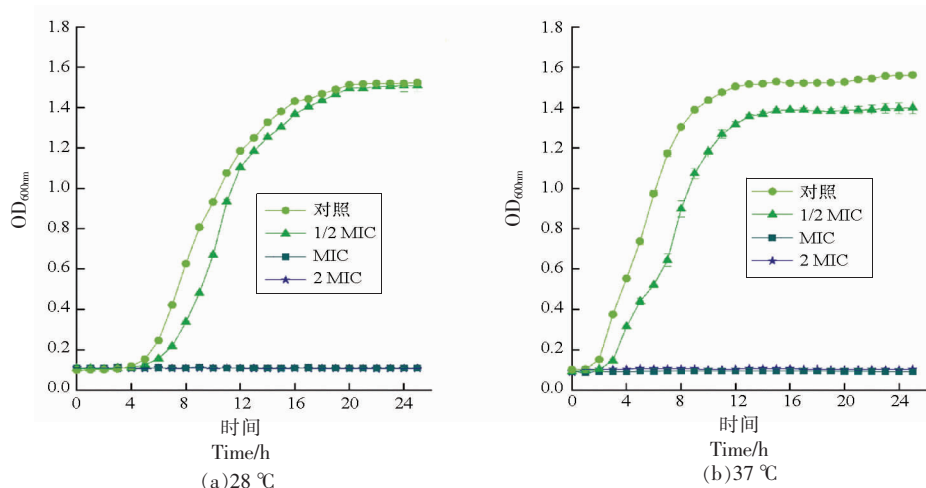


图 1 苯乳酸对霍氏肠杆菌生长曲线的影响

Fig.1 Effects of phenyllactic acid on the growth curves of *E. hormaechei*

2.3 苯乳酸对霍氏肠杆菌细胞凋亡的影响

碘化丙啶(PI)可以透过死亡或破损的细胞对 DNA 进行染色, 通过流式细胞仪检测苯乳酸对霍氏肠杆菌细胞凋亡的影响。流式细胞图的 4 个区域分别为存活细胞(左下)、早期凋亡(右下)、晚期凋亡(右上)和细胞坏死(左上)。由图 2 可知, 在 28 °C 培养振荡培养 24 h, 对照、1/2 MIC、MIC、2 MIC 组的细胞存活率分别为 94.6%, 93.7%, 90.2%, 81.8%, 在 37 °C 培养下, 对照、1/2 MIC、MIC、2 MIC 的细胞存活率分别为 93.3%, 88.7%, 90.0%, 80.1%, 表明苯乳酸 1/2 MIC 和 MIC 处理不会显著导致细胞凋亡和坏死, 而在 2 MIC 处理时, 细胞坏死率分别达到 11.4% 和 11.8%, 说明高质量浓度下的苯乳酸会显著造成细胞坏死。在 28 °C 和 37 °C 培养下的苯乳酸对菌的生长曲线和细胞凋亡率没有明显差异, 因此以 28 °C 为培养条件进行下列抗菌机制的研究。

2.4 苯乳酸对霍氏肠杆菌细胞结构完整性的影响

细胞壁和细胞膜作为细胞重要的结构, 其完

整性在维持细胞正常生长中至关重要, 也是许多抑菌物质的重要靶点^[20]。碱性磷酸酶(AKP)位于细胞壁和细胞膜之间, 当细胞壁受损时, AKP 会泄漏到细菌细胞外介质中, 造成胞内酶含量降低, 常用于反应细胞壁完整性的变化。由图 3a 可知, AKP 酶活力随着时间和苯乳酸质量浓度的增加而显著减少 ($P < 0.05$), 在 48 h, 2 MIC 时降至最低。结果表明, 苯乳酸在一定程度上破坏了霍氏肠杆菌的细胞壁, 并且受到作用时间和苯乳酸质量浓度的影响。

通过测定二乙酸荧光素(FDA)的荧光强度可以反映细胞膜完整性的变化。只有活细胞根据酶活性可将非荧光 FDA 主动转化为绿色荧光化合物, 当细胞膜完整时, 可以在细胞内检测出 FDA 荧光, 而当细胞膜遭到破坏, FDA 会从细胞内流出, 无法被检测到^[21]。如图 3b 所示, 1/2 MIC、MIC、2 MIC 处理组荧光强度相较于对照组显著降低 ($P < 0.05$), 且苯乳酸质量浓度越高, 荧光强度下降幅度越大。2 MIC 组荧光强度约是对照组的 1/2 倍,

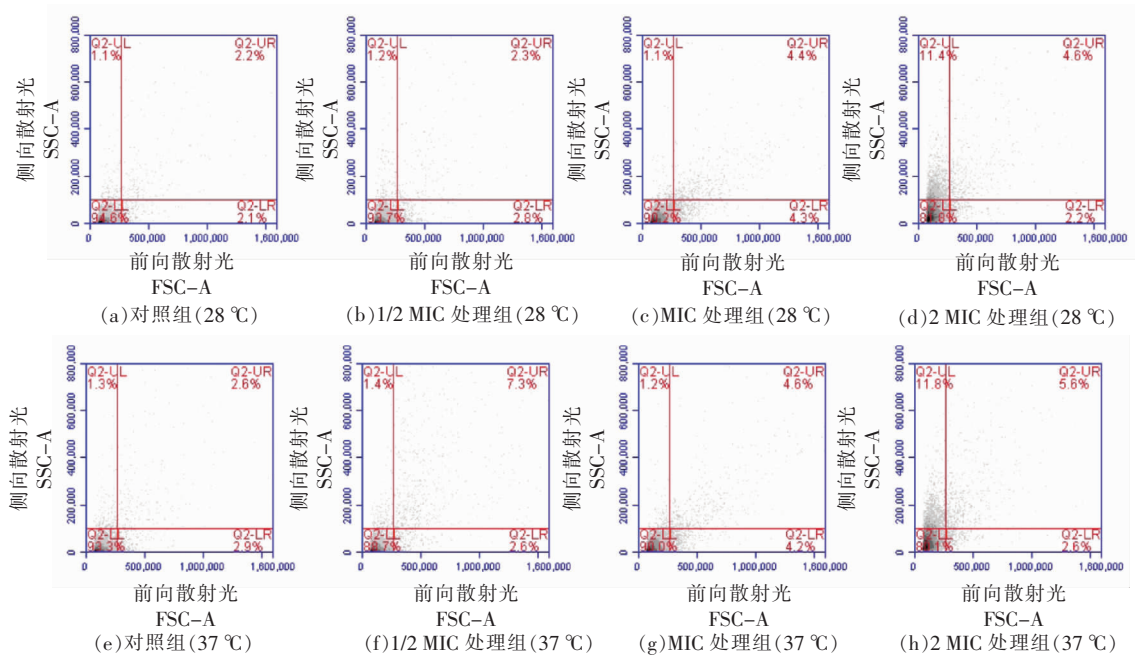


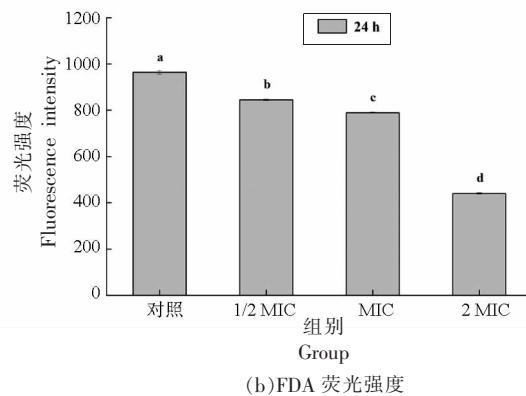
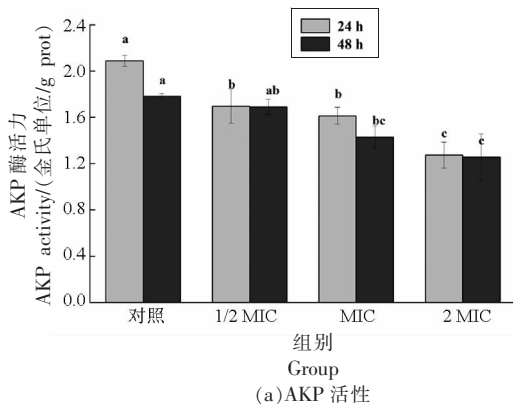
图 2 苯乳酸对霍氏肠杆菌细胞凋亡的影响

Fig.2 Effects of phenyllactic acid on apoptosis of *E. hormaechei*

表明此质量浓度下细胞膜被破坏的程度最严重。试验结果表明苯乳酸有效的破坏了细胞膜的完整性。

当细胞膜的完整性被破坏时,离子首先流出,然后是核酸和蛋白质等大分子物质^[22-23]。因此,通过测定在波长 260 nm 与 280 nm 波长处的吸光度来确定细胞中核酸与蛋白质等胞内物质的泄漏情况^[24]。由图 3c 可知,在波长 260 nm 处胞外吸光值随着苯乳酸处理质量浓度的增加而增加,且随着处理时间延长而增加。在 48 h,经 2 MIC 苯乳酸处理后的吸光度达到最高,约是处理组的 1.6 倍,表明苯乳酸处理导致霍氏肠杆菌核酸的泄漏。由

图 3d 可知,MIC 苯乳酸组在波长 280 nm 处的胞外吸光值显著高于对照组($P < 0.05$),且随着处理时间延长而显著增加,说明苯乳酸处理导致霍氏肠杆菌蛋白质的泄漏。值得注意的是,1/2 MIC 组吸光值与对照组相比差异不显著,而 2 MIC 组吸光值呈现了下降的趋势,其原因可能是随着苯乳酸处理质量浓度的增加,溶液酸度升高,pH 值改变引起上清液中的部分蛋白质发生沉降而导致含量降低^[25]。结果表明,苯乳酸处理破坏了霍氏肠杆菌细胞膜完整性,导致核酸与蛋白质等物质的泄漏,从而影响细胞的正常生理活动。



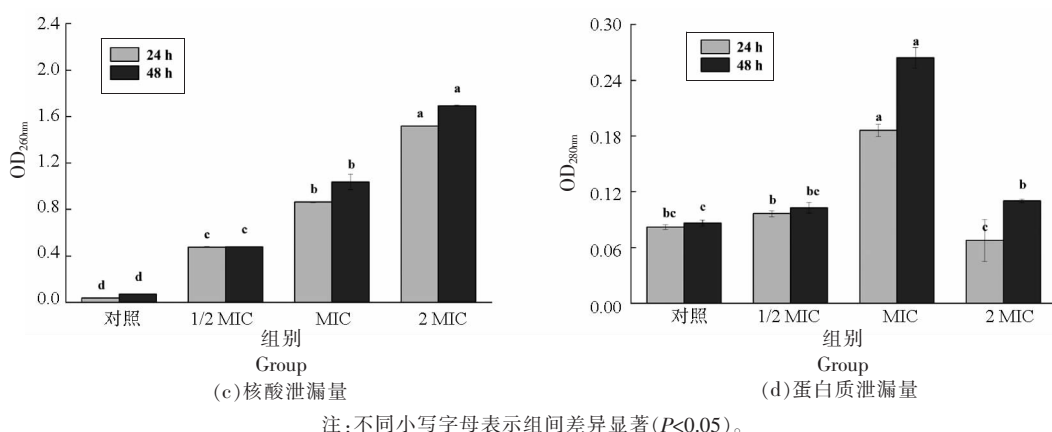


图 3 苯乳酸对霍氏肠杆菌细胞结构完整性的影响

Fig.3 Effect of phenyllactic acid on cell structure integrity of *E. hormaechei*

2.5 苯乳酸对霍氏肠杆菌 DNA 的影响

除细胞膜靶机制外, 部分抑菌剂也可通过影响细胞内靶点而产生抗菌能力, 如抑制 DNA、RNA 和蛋白质合成, 破坏其它胞内生物合成过程等^[26]。本研究通过琼脂糖凝胶电泳及分子对接研究了苯乳酸对霍氏肠杆菌基因组 DNA 的靶向作用。图 4a 为琼脂糖凝胶电泳结果。与对照组相比, 1/2 MIC 和 MIC 组 DNA 条带亮度变化较小, 而 2 MIC 的条带亮度几乎消失。结果表明, 低质量浓度的苯乳酸对霍氏肠杆菌 DNA 靶向作用较弱, 几乎不会影响胞内 DNA 含量, 也未破坏 DNA 片段完整性。然而, 随着苯乳酸质量浓度升高, 造成了胞内 DNA 含量降低, 这会干扰胞内基因的转录和翻译, 影响细胞的正常生理功能。宁亚维等^[27]的研究

结果表明苯乳酸与醋酸联用可与单核细胞增生李斯特氏菌 (*L. monocytogenes*) DNA 结合, 从而扰乱细胞正常生理代谢活动。宁亚维等^[28]的研究还发现苯乳酸可以破坏荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 的 DNA 结构, 与本研究结果相似, 说明 DNA 可能是苯乳酸抑菌的主要靶点之一。由图 4b 箭头所指向的局部放大图可以看出, 苯乳酸可以与 DNA 的腺嘌呤和鸟嘌呤形成 6 个氢键, 键距分别为 2.0, 2.3, 2.3, 2.3, 2.6, 2.7, 结合能为 -14.48 kJ/mol (-3.46 kcal/mol), 表明苯乳酸与 DNA 存在相互作用。Fang 等^[12]发现苯乳酸与副溶血弧菌 DNA 的腺嘌呤和鸟嘌呤形成 7 个氢键, 结合能为 -21.46 kJ/mol (-5.13 kcal/mol), 与本研究结果相似。

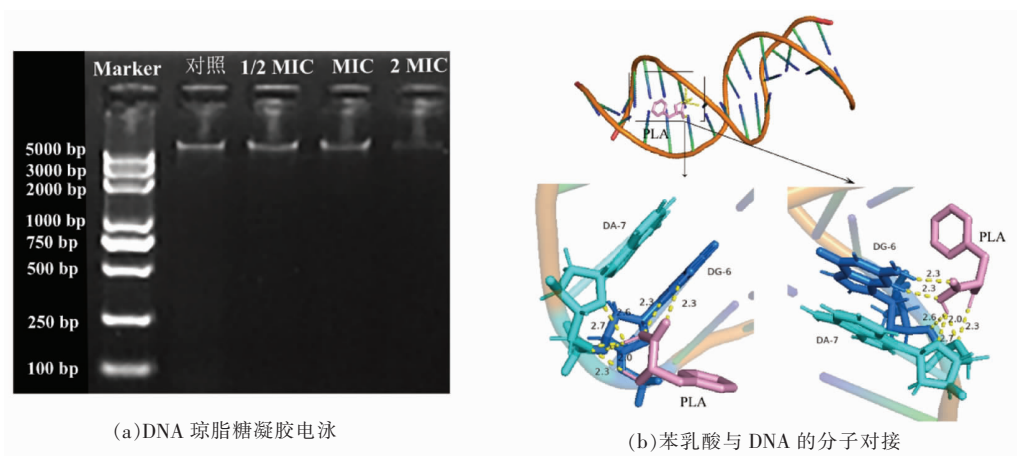


图 4 苯乳酸与霍氏肠杆菌 DNA 的相互作用

Fig.4 Interaction of phenyllactic acid with *E. hormaechei* DNA

2.6 苯乳酸对霍氏肠杆菌运动性的影响

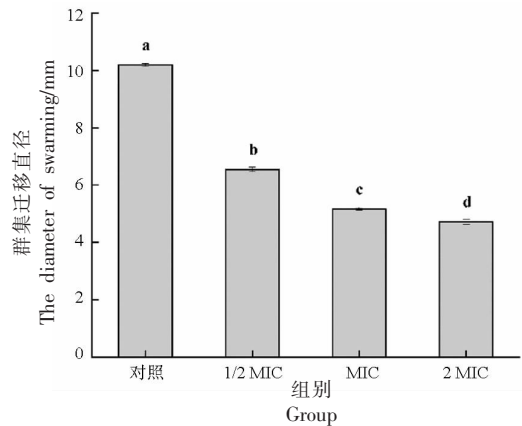
细菌运动能力在生物被膜形成的初始阶段发挥至关重要的作用,细胞运动性的丧失可能会导致霍氏肠杆菌在既定表面黏附,从而影响生物被膜的形成^[29]。图5显示了不同质量浓度苯乳酸处理的霍氏肠杆菌群集迁移直径的变化。经不同质量浓度的苯乳酸处理后的霍氏肠杆菌的群集能力均显著低于对照组($P < 0.05$),且随着苯乳酸质量浓度的增加呈现逐渐降低趋势,说明苯乳酸对霍氏肠杆菌的群集能力具有显著抑制作用。值得注意的是在亚抑菌浓度下这种抑制作用也是十分显著的,细菌运动性的降低对抑制其生物被膜的形成起到重要作用。

2.7 苯乳酸对霍氏肠杆菌生物被膜的抑制作用

生物被膜是细菌的重要保护屏障,被包裹在生物被膜中的细菌细胞对抗生素和抑菌剂更具耐受性,因此抑制生物被膜的形成至关重要^[30-31]。由图6可以看出,1/2 MIC 苯乳酸处理组与对照组相比生物被膜的形成被显著抑制($P < 0.05$),而72 h 生物被膜生成量显著高于48 h,表明此质量浓度苯乳酸处理霍氏肠杆菌仍能形成生物被膜。在经过MIC与2 MIC的苯乳酸处理后,生物被膜的形成受到强烈抑制,72 h 生物被膜生成量与48 h 无显著差异,表明此质量浓度下几乎没有生物被膜形成。综上,生物膜的形成量与时间呈正相关关系,苯乳酸对霍氏肠杆菌的生物被膜形成有较强的抑制作用,与Jiang等^[32]的研究结果相似。

2.8 激光共聚焦扫描显微镜观察生物被膜

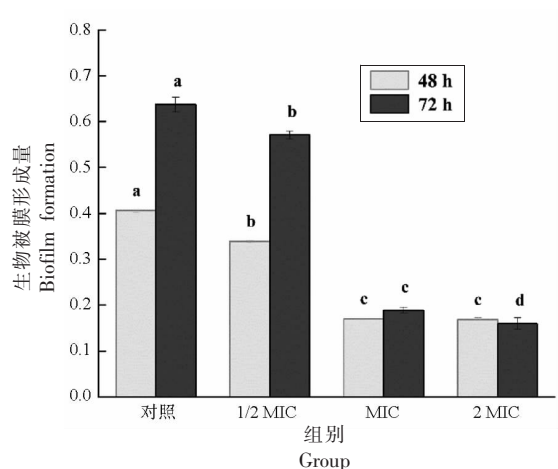
观察生物被膜的结构对于了解苯乳酸的抑制生物被膜作用至关重要。用荧光染料对形成生物被膜的活细胞进行染色,通过CLSM观察生物被膜荧光变化。图7是对照组与苯乳酸处理组霍氏肠杆菌生物被膜的激光共聚焦显微立体图像。对



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图5 苯乳酸对霍氏肠杆菌群集运动的影响

Fig.5 Effects of phenyllactic acid on swarming motility of *E. hormaechei*

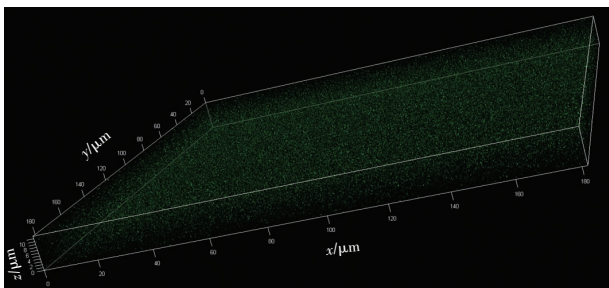


注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

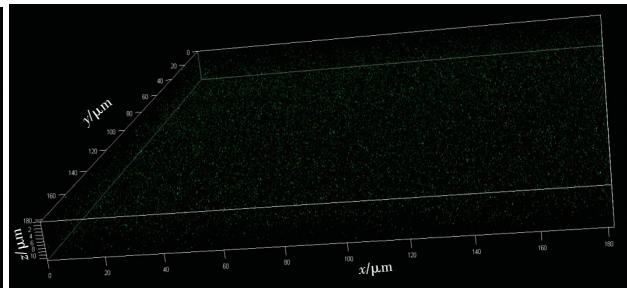
图6 苯乳酸对霍氏肠杆菌生物被膜形成的影响

Fig.6 Effects of phenyllactic acid on biofilm formation of *E. hormaechei*

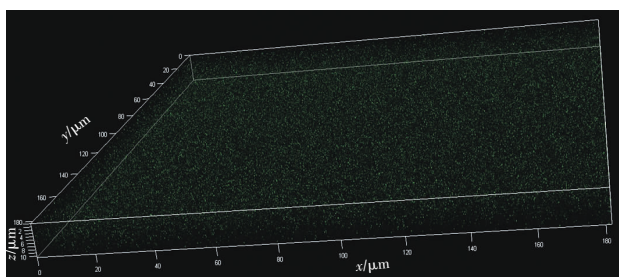
照组的生物被膜较厚,活菌数多,细菌较为密集,表明霍氏肠杆菌具有较强的生物被膜形成能力。随着苯乳酸质量浓度的增加,细胞的生物膜逐渐



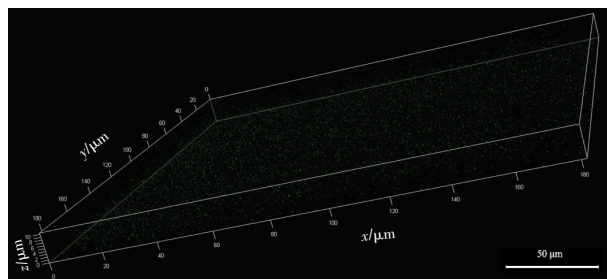
(a) 对照组



(b) 1/2 MIC 处理组



(c)MIC 处理组



(d)2 MIC 处理组

图 7 生物被膜的激光共聚焦显微镜图

Fig.7 Confocal laser scanning microscopy of the biofilm

变薄,活菌数减少,细菌变得更加分散。结合苯乳酸对霍氏肠杆菌运动能力及生物被膜生成量的影响结果,表明苯乳酸可有效抑制了霍氏肠杆菌生物被膜的形成。

3 结论

苯乳酸作为一种天然无毒且具有广谱抑菌作用的新型生物防腐剂,对霍氏肠杆菌具有较好的抗菌活性。苯乳酸对霍氏肠杆菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别是 1.25 mg/mL 和 2.5 mg/mL,苯乳酸通过破坏细胞结构完整性,导致细胞内容物泄漏,造成细胞坏死,并破坏菌体 DNA,影响基因表达。此外,苯乳酸抑制霍氏肠杆菌的运动能力及生物被膜的形成。本研究可为苯乳酸的抑菌及其生物被膜的机制的深入研究提供一定的理论参考。

参 考 文 献

- [1] QIAN W D, YANG M, WANG T, et al. Antibacterial mechanism of vanillic acid on physiological, morphological and biofilm properties of carbapenem-resistant *Enterobacter hormaechei*[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(4): 576-583.
- [2] LIU S X, CHEN L Q, WANG L B, et al. Cluster differences in antibiotic resistance, biofilm formation, mobility, and virulence of clinical *Enterobacter cloacae* complex[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 6(13): 814831.
- [3] ZHU Y L, LI C Z, CUI H Y, et al. Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99(2): 142-151.
- [4] 程传松, 闫晓彤, 李长城, 等. 食品接触表面食源性致病菌生物膜形成及控制研究进展[J]. 包装工程, 2021, 42(13): 1-8.
CHENG C S, YAN X T, LI C C, et al. Research progress in biofilm formation and control of foodborne pathogens on food contact surfaces[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(13): 1-8.
- [5] LI Q, LIU L, GUO A L, et al. Formation of multi-species biofilms and their resistance to disinfectants in food processing environments: A review[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(12): 2071-2083.
- [6] LIU F, JIN P P, SUN Z L, et al. Carvacrol oil inhibits biofilm formation and exopolysaccharide production of *Enterobacter cloacae* [J]. Food Control, 2021, 119(1): 107473.
- [7] 李波, 郑凯茜, 皇甫露露, 等. 苯乳酸在食品保鲜中的应用研究进展[J]. 包装工程, 2022, 43(15): 129-136.
LI B, ZHENG K X, HUANGPU L L, et al. Application and research progress of phenyllactic acid in food preservation[J]. Packaging Engineering, 2022, 43(15): 129-136.
- [8] 于晓倩, 张成林, 李晴, 等. 苯乳酸纳米粒保鲜膜对冷藏鲟鱼保鲜效果研究[J]. 包装工程, 2020, 41(9): 17-22.
YU X Q, ZHANG C L, LI Q, et al. Effect of G-C-NanoPLA films on the preservation of froze sturgeon[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(9): 17-22.
- [9] RAJANIKAR R V, NATARAJ B H, NAITHANI H, et al. Phenyllactic acid: A green compound for food biopreservation[J]. Food Control, 2021, 128: 108184.
- [10] LIU F, SUN Z L, WANG F T, et al. Inhibition of

- biofilm formation and exopolysaccharide synthesis of *Enterococcus faecalis* by phenyllactic acid[J]. Food Microbiology, 2019, 86: 103344.
- [11] ZHENG R S, ZHAO T, HUNG Y C, et al. Evaluation of bactericidal effects of phenyllactic acid on *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef meat[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(12): 2016–2022.
- [12] FANG M M, WANG R F, AGUEKUMWAA A K, et al. Antibacterial effect of phenyllactic acid against *Vibrio parahaemolyticus* and its application on raw salmon fillets[J]. LWT—Food Science and Technology, 2022, 154: 112586.
- [13] MESTRUM S G C, HOPMAN A H N, RAMAEKERS F C S, et al. The potential of proliferative and apoptotic parameters in clinical flow cytometry of myeloid malignancies[J]. Blood Advances, 2021, 5(7): 2040–2052.
- [14] 肖小年, 盛丹梅, 周洁, 等. 大蒜油自微乳的抑菌作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(12): 73–80.
XIAO X N, SHENG D M, ZHOU J, et al. Inhibitory effect of garlic oil self-microemulsion on bacteria[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(12): 73–80.
- [15] LI Q Y, ZHOU W X, ZHANG J Y, et al. Synergistic effects of ϵ -polylysine hydrochloride and gallic acid on *Shewanella putrefaciens* and quality of refrigerated sea bass fillets[J]. Food Control, 2022, 139: 109070.
- [16] 刘哲, 郝倩, 王金泽, 等. 乳酸菌细菌素 plantaricin YKX 对大肠杆菌生物被膜的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(11): 29–36.
LIU Z, HAO Q, WANG J Z, et al. Inhibitory effect of plantaricin YKX on the biofilm of *Escherichia coli*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(11): 29–36.
- [17] SUN J Y, WANG D B, SUN Z L, et al. The combination of ultrasound and chlorogenic acid to inactivate *Staphylococcus aureus* under planktonic, biofilm, and food systems[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 80: 105801.
- [18] SEO H J, KANG S S. Inhibitory effect of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* on the biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium[J]. Food Control, 2020, 117: 107361.
- [19] 袁景环, 贡汉生, 孟祥晨. 苯乳酸的抗菌作用及其抗菌机理的初步研究[J]. 食品工业, 2009, 30(5): 14–17.
YUAN J H, GONG H S, MENG X C. Antimicrobial activity and antibacterial mechanism of the phenyllactic acid[J]. Food Industry, 2009, 30(5): 14–17.
- [20] ZHANG N N, LAN W Q, WANG Q, et al. Antibacterial mechanism of Ginkgo biloba leaf extract when applied to *Shewanella putrefaciens* and *Saprophytic staphylococcus* [J]. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(4): 163–169.
- [21] KANADE S, NATARAJ G, UBALE M, et al. Fluorescein diacetate vital staining for detecting viability of acid-fast bacilli in patients on antituberculosis treatment[J]. International Journal of Mycobacteriology, 2016, 5(3): 294–298.
- [22] LENG W J, WU X Y, XIONG Z Y, et al. Study on antibacterial properties of mucus extract of snakehead (*Channa argus*) against *Escherichia coli* and its application in chilled fish fillets preservation [J]. LWT, 2022, 167: 113840.
- [23] XU D F, SUN L J, LI C H, et al. Inhibitory effect of glucose oxidase from *Bacillus* sp. CAMT22370 on the quality deterioration of Pacific white shrimp during cold storage[J]. LWT—Food Science and Technology, 2018, 92: 339–346.
- [24] GUO F Y, LIANG Q, ZHANG M, et al. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Shewanella putrefaciens*[J]. Molecules, 2021, 26(1): 245.
- [25] 孔祥丽, 马岩石, 吴昕雨, 等. 苯乳酸对具核梭杆菌的抑菌效果及机制[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 38–44.
KONG X L, MA Y S, WU X Y, et al. Antibacterial effect and mechanism of phenyllactic acid on *Fusobacterium nucleatum*[J]. Food Science, 2022, 43(7): 38–44.
- [26] CEN Q W, WANG Z Y, TANG Z X, et al. Initial purification of antimicrobial fermentation metabolites from *Paecilomyces cicadae* and its antimicrobial mechanism[J]. LWT—Food Science and Technology, 2021, 148: 111785.
- [27] 宁亚维, 付浴男, 何建卓, 等. 苯乳酸和醋酸联用对单核细胞增生李斯特菌的协同抑菌机理[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 70–76.
NING Y W, FU Y N, HE J Z, et al. Synergistic

- antibacterial mechanism of phenyllactic acid combined with acetic acid against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Science, 2020, 41(23): 70–76.
- [28] 宁亚维, 侯琳琳, 李明蕊, 等. 苯乳酸对荧光假单胞菌基于细胞膜损伤和 DNA 破坏的双靶位抑菌机制[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 60–67.
- NING Y W, HOU L L, LI M R, et al. Dual-target antibacterial mechanism of phenyllactic acid against *Pseudomonas fluorescens* based on cell membrane and DNA damage[J]. Food Science, 2021, 42(7): 60–67.
- [29] ZHU W X, GAO J Z, LIU H L, et al. Antibiofilm effect of sodium butyrate against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Control, 2022, 131: 108422.
- [30] SMET C, GOVAERT M, KYRYLENKO A, et al. Inactivation of single strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* planktonic cells biofilms with plasma activated liquids[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1539.
- [31] SWEIDAN A, SMIDA I, CHOLLET-KRUGLER M, et al. Lichen butyrolactone derivatives disrupt oral bacterial membrane[J]. Fitoterapia, 2019, 137: 104274.
- [32] JIANG X B, JIANG C Y, YU T, et al. Phenyllactic acid application to control *Listeria monocytogenes* biofilms and its growth in milk and spiced beef[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 381: 109910.

Inhibitory Effects of Phenyllactic Acid on *Enterobacter hormaechei* and Its Biofilm

Sun Jiaying^{1,2}, Li Qiuying^{1,2*}, Cui Fangchao^{1,2}, Tan Xiqian^{1,2}, Sun Tong^{1,2}

(¹College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract Objective: The inhibitory effects of phenyllactic acid on *Enterobacter hormaechei* and its biofilm was explored. Method: The inhibitory effect of PLA on *E. hormaechei* and its biofilm was assessed through various experimental techniques, including measurement of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), growth curve, flow cytometry, alkaline phosphatase (AKP) activity, cell membrane integrity, DNA content, motility test, biofilm formation and confocal laser scanning microscopy observation. Results: The MIC and MBC of PLA to *E. hormaechei* was 1.25 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively, which could completely inhibit the growth of *E. hormaechei*. Flow cytometry results showed that 1/2 MIC and MIC phenyllactic acid could not cause apoptosis and necrosis, while 2 MIC PLA could cause cell death. The lag phase of growth curve of *E. hormaechei* cultured at 28 °C was nearly 1 h longer than that at 37 °C, but the maximum biomass of *E. hormaechei* was not affected, and the apoptosis rate was not significantly different. PLA damaged the structural integrity of cells, resulting in decreased intracellular AKP activity and leakage of nucleic acids and proteins. 2 MIC PLA could significantly reduce the content of bacterial DNA. PLA treatment resulted in decreased motor capacity and biofilm production of *E. hormaechei*. Conclusion: PLA had a strong inhibitory effect on *E. hormaechei* and its biofilm.

Keywords phenyllactic acid; *Enterobacter hormaechei*; antibacterial; biofilm