

研究报告

藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制作用

余生玲, 申光辉*, 黄廷, 杨露, 张志清, 侯晓艳, 陈安均, 黎杉珊

四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014

余生玲, 申光辉, 黄廷, 杨露, 张志清, 侯晓艳, 陈安均, 黎杉珊. 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2135-2151

Yu Shengling, Shen Guanghui, Huang Ting, Yang Lu, Zhang Zhiqing, Hou Xiaoyan, Chen Anjun, Li Shanshan. Antibiofilm effect of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil against spoilage *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2135-2151

摘要:【背景】芽孢杆菌是豆制品的重要腐败菌, 在气液界面形成生物膜, 对产品生产带来持续污染。【目的】探讨藤椒精油(*Zanthoxylum armatum* DC. essential oil, ZA-EO)对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 菌体及生物被膜的抑制作用与机制。【方法】采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)分析藤椒精油主要成分与相对含量, 通过二倍稀释法测定藤椒精油对菌株的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC), 并分析精油对腐败菌胞外蛋白酶活性、腐败菌生物被膜形成抑制及成熟生物被膜的清除作用, 采用扫描电镜结合三维光学显微镜分析生物被膜形貌结构变化, 测定生物被膜胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)多糖与蛋白质含量变化; 并通过细菌运动能力、细胞黏附及自聚集能力、细胞表面疏水性和 Zeta 电位来初步探讨藤椒精油对生物被膜的抑制机理。【结果】藤椒精油主要含有芳樟醇、D-柠檬烯和桉烯, 它们的相对含量分别为 52.37%、21.81%和 10.94%。藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 的 MIC 和 MBC 分别为 3.2 $\mu\text{L/mL}$ 和 12.8 $\mu\text{L/mL}$ 。MIC 浓度藤椒精油可完全抑制腐败菌胞外蛋白酶的产生及生物被膜的形成, 对成熟生物被膜的清除率为 25.79%。形貌分析表明, 藤椒精油可减小生物被膜厚度和粗糙度, 显著降低生物被膜 EPS 多糖和蛋白质含量, 抑制细菌泳动、丛集、黏附及自聚集能力, 增强细胞表面疏水性, 降低细胞表面电荷。【结论】藤椒精油可抑制腐败解淀粉芽孢杆菌及其生物被膜的形成,

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2021YFN0016); 四川省教育厅川菜发展研究中心项目(CC20Z22); 四川省大学生创新训练项目(202010626047)

Supported by: Program of Sichuan Provincial Science and Technology Department (2021YFN0016); Fund of Sichuan Cuisine Development and Research Center (CC20Z22); Sichuan College Students' Innovation Training Program (202010626047)

*Corresponding author: E-mail: shenghuishen@163.com

Received: 2021-09-27; Accepted: 2021-11-21; Published online: 2022-01-28

并具有一定的生物被膜清除活性。藤椒精油可通过干扰细菌运动和自聚集能力,改变细胞表面特性,降低菌体初始黏附,干扰胞外多糖和蛋白合成而抑制或延缓生物被膜的形成。

关键词: 藤椒精油; 解淀粉芽孢杆菌; 生物被膜; 运动性; 细胞表面特性

Antibiofilm effect of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil against spoilage *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a

YU Shengling, SHEN Guanghui*, HUANG Ting, YANG Lu, ZHANG Zhiqing, HOU Xiaoyan, CHEN Anjun, LI Shanshan

College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China

Abstract: [Background] *Bacillus* spp. are major aerobic bacteria associated with the spoilage of soy products. They form biofilms at the air-liquid interface to bring about constant microbial contamination to soy food processing line. [Objective] To examine the activity of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil (ZA-EO) against the growth and biofilm formation of a spoilage bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a isolated from soy products. [Methods] Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used for the chemical characterization of ZA-EO. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ZA-EO against DY1a were determined by the microdilution method. The inhibitory effect on extracellular protease activity and biofilm formation and the eradication of preformed biofilm by ZA-EO were evaluated. Scanning electron microscope coupled with 3D optical microscope was used to observe the surface topography and structure changes of the biofilm treated with ZA-EO. Besides, the content of exopolysaccharide and protein in the extracellular polymeric substance (EPS) were measured. The anti-biofilm mechanism of ZA-EO was explored from swimming and swarming motility, cell adhesion and auto-aggregation, cell surface hydrophobicity, and Zeta potential. [Results] ZA-EO mainly contained linalool (52.37%), D-limonene (21.81%), and sabinene (10.94%). The MIC and MBC of ZA-EO against spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a were 3.2 $\mu\text{L/mL}$ and 12.8 $\mu\text{L/mL}$, respectively. Additionally, 3.2 $\mu\text{L/mL}$ ZA-EO inhibited the secretion of extracellular protease and the biofilm formation, and showed the eradication efficiency of 25.79% for the preformed biofilm. Moreover, ZA-EO decreased the thickness and surface roughness of the biofilm as well as the content of exopolysaccharide and protein in EPS. Furthermore, ZA-EO treatment significantly weakened the swimming and swarming motility, inhibited cell adhesion and auto-aggregation, enhanced the cell surface hydrophobicity, and reduced the surface charge of DY1a. [Conclusion] ZA-EO had activity against the growth and biofilm formation of *B. amyloliquefaciens* DY1a and exhibited promising eradication of preformed biofilm. The activity of ZA-EO against the biofilm formation of *B. amyloliquefaciens* can be attributed to the interruption against cell motility, changing of cell surface characteristics, and inhibition on cell adhesion and auto-aggregation during the early stage, as well as the reduction of exopolysaccharide and protein content in EPS.

Keywords: *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil; *Bacillus amyloliquefaciens*; biofilm; motility; cell surface properties

生物被膜是细菌在生物或者非生物表面生长并附着一定时间后,被自身分泌的细胞基质紧密包裹所形成的高度组织化的膜状聚合物^[1]。不同环境和培养条件会形成不同类型的生物被膜,包括固体培养基平板表面形成的菌落型生物被膜(colony biofilm)、液体静置培养过程中固液界面形成的潜底型生物被膜(submerged biofilm)及气液界面形成的表皮型生物被膜(pellicle biofilm)^[2-3]。在食品工业中,大部分食源性致病菌或腐败菌均可黏附于加工设备、器具、管道^[4]及果蔬^[5]、肉类^[6]等食品的表面,形成较难彻底清除的生物被膜。作为细菌的天然庇护场所,生物被膜可增强细菌对外界物理、化学和生物等胁迫因子的抵抗能力,大大降低了物理热杀菌和添加化学防腐剂等杀菌手段的实际效果,给食品工业有害细菌的控制带来了严峻的挑战。

芽孢杆菌(*Bacillus*)属于兼性厌氧革兰氏阳性细菌,可形成耐热性强的内生孢子(芽孢),有氧条件下在气液界面具有很强的生物被膜形成能力,导致持续性污染,对食品安全生产构成严重威胁^[7]。已有研究发现,芽孢杆菌是导致老陈醋^[8]、蔬菜^[9]、面包^[10]、豆制品^[11]、肉制品^[12]等食品腐败变质的主要细菌。本研究前期对腐败真空包装豆杆产品中优势腐败菌进行分离鉴定,发现一株腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 具有很强的致腐能力^[13],而且该菌株可在含豆浆的胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soy broth with soybean milk, TSBS)培养基气液界面快速形成生物被膜,易残留于加工设备死角及豆杆产品中,带来严重的食品腐败和安全风险。

植物精油作为细菌生物被膜控制的潜在活性物质,具有使用方便、绿色无残留、不易产生耐药性等优势,受到国内外研究者的广泛关注^[14]。花椒是芸香科花椒属植物果实,

花椒果皮提取的花椒精油具有良好的抑菌、杀菌活性^[15]。藤椒即竹叶花椒(*Zanthoxylum armatum* DC.),是我国川渝地区近年来推广栽培的特色花椒品种,富含挥发性精油^[16]。目前,藤椒精油对腐败芽孢杆菌生物被膜抑制作用的研究鲜见报道。本文主要考察藤椒精油(*Zanthoxylum armatum* DC. essential oil, ZA-EO)对一株来源于豆制品中的优势腐败菌解淀粉芽孢杆菌 DY1a 菌体生长和气液界面生物被膜的抑制和清除效果,并从细菌运动能力、细胞表面特性和胞外基质组分变化等方面探讨藤椒精油对腐败菌生物被膜的抑制作用机制,以期食品工业中芽孢杆菌污染的控制提供新的天然抗菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 菌株保存于四川农业大学食品学院。藤椒由四川省圣菲伦食品有限公司提供。

LB 培养基(g/L): 酵母浸出粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。

脱脂乳琼脂培养基: A 液: 脱脂奶粉 50.0 g/L, 溶于水中; B 液: 琼脂 20.0 g/L, 溶于水中。灭菌 A 液和灭菌 B 液等体积混合。

泳动、丛集培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS) (g/L): NaCl 8.0, KCl 0.2, KH₂PO₄ 0.24, K₂HPO₄ 1.8; pH 7.4。PUM 缓冲液(g/L): K₂HPO₄·3H₂O 22.2, KH₂PO₄ 7.26, MgSO₄ 0.2, 尿素 1.8; pH 7.1。

恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 三维光学显微镜, Bruker 公司; 扫描电镜, 卡尔蔡司公司; 激光粒度电位仪, 马

尔文帕纳科公司。

1.2 方法

1.2.1 藤椒精油的提取和成分分析

精油提取采用水蒸气蒸馏法^[17]并做适当的修改：称取过 40 目筛的干燥藤椒粉 10.00 g，放入 500 mL 的烧瓶中，加水 250 mL 后浸提 4 h，收集挥发油并用无水硫酸钠进行干燥处理，-20 °C 下保存备用。本实验提取的藤椒精油提取得率为 0.124 mL/g。

采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)分析精油成分^[17]：色谱柱：HP-5MS 柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)；升温程序：60 °C 保持 4 min，以 10 °C/min 升至 300 °C，保持 30 min；N₂载气流速 1.2 mL/min，压力 2.4 kPa，进样量 0.5 μL；分流比 20:1。质谱条件：EI 离子源温度 300 °C，四极杆温度 270 °C，扫描范围：20–800 amu。

化合物定性采用 NIST 标准谱库 11.1 检索比对，匹配度>700 的化合物予以确认，并通过峰面积归一化法计算各组分的相对含量。

1.2.2 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)与最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)测定

采用二倍稀释法测定 MIC：将腐败菌接种于 LB 液体培养基，37 °C、160 r/min 振荡培养 24 h，4 °C、4 000 r/min 离心 10 min，菌体沉淀使用无菌生理盐水洗涤 3 次，并调节菌悬液浓度至 10⁶ CFU/mL。取 1.0 mL 藤椒精油溶于 20 μL 的 10% DMSO，加入到 1 mL 灭菌的 LB 液体培养基中，依次二倍稀释分别获得浓度为 12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 μL/mL 的含精油 LB 液体培养基，再接入 1 mL 10⁶ CFU/mL 菌悬液，混匀，37 °C、160 r/min 振荡培养 24 h，通过培养前后 600 nm 吸光度差值 ΔOD_{600} ，以 $\Delta OD_{600} < 0.01$ 的最低精油添加浓度确定为

1 MIC。从 1 MIC 的浓度起分别取 3.2、6.4、12.8 μL/mL 精油添加浓度的培养液 10 μL，涂布于 PCA 平板，37 °C 培养 24 h，无菌落生长的最低精油添加浓度确定为 MBC。

1.2.3 腐败菌胞外蛋白酶活力测定

分别取 2 MIC、1 MIC、1/2 MIC 精油，按 1.2.2 方法用 10% DMSO 溶解，与 5 mL 灭菌 LB 培养基混匀，再接种 5 mL 浓度为 10⁶ CFU/mL 的菌悬液，37 °C、160 r/min 振荡培养 24 h。取 1 mL 培养液 10 000 r/min 离心 10 min，取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，得到胞外蛋白酶粗提液。将灭菌牛津杯(直径 7 mm)均匀放置于灭菌培养皿中，倒入 20 mL 灭菌牛奶琼脂培养基，冷却凝固后取出牛津杯，向每个孔加入 150 μL 胞外蛋白酶粗提液，37 °C 培养箱静置 24 h，观察并采用十字交叉法测定牛奶琼脂平板上水解圈直径^[18]。

1.2.4 生物被膜抑制作用分析

按照 1.2.2 方法向 20 mL 灭菌 TSBS 液体加入不同体积藤椒精油，混匀后获得精油添加浓度分别为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、0 MIC 的含精油 TSBS 液体，并将其转移至 50 mL 灭菌烧杯中，再接入 20 mL 菌体浓度为 10⁶ CFU/mL 的菌悬液，向烧杯中垂直放置 7.57 cm×2.58 cm 的无菌载玻片，用灭菌封口膜密封烧杯口，37 °C 静置培养 48 h，每 24 h 观察记录气液界面生物被膜生长情况。

生物被膜内细菌数量的测定^[19]：用无菌生理盐水将浸没在气液界面下区域大小为 1.91 cm×2.56 cm 的载玻片上附着的培养 24 h 后形成的生物被膜轻轻冲去表面浮游菌体，并将生物被膜黏附于无菌棉签头，转移至 2.5 mL 无菌水试管中，300 W 超声分散处理 30 min，涡旋振荡 20 s，再用无菌水进行梯度稀释，取 20 μL 不同梯度稀释液于 PCA 计数平板，涂布

均匀, 37 °C 培养 24 h 后计数。

1.2.5 成熟生物被膜的清除率、代谢活性及活菌数测定

(1) 成熟生物被膜的培养与藤椒精油处理

向 24 孔细胞培养板加入 1.5 mL TSBS 培养基, 接入 1.5 mL 浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 37 °C 培养 24 h, 弃去液体培养基, 添加 2.0 mL 不同浓度的藤椒精油, 37 °C 静置处理 24 h, 收集处理后的生物被膜并转移至 2 mL EP 管中, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀被膜用 PBS (pH 7.4) 清洗 3 次除去游离菌体。

(2) 生物被膜清除率测定

采用结晶紫染色法^[20]测定生物被膜清除率, 向经过不同处理的生物被膜加入 1 mL 甲醇固定 15 min, 弃去甲醇后加入 1 mL 0.01 mol/L 结晶紫溶液染色 20 min, 弃去结晶紫溶液, 再加入 1 mL 浓度为 33% 的冰乙酸, 1 h 后测定样品 OD_{600} 值, 每个样品重复 3 次。以未添加精油的生物被膜为对照组, 参照公式(1)计算生物被膜清除率。

$$\text{生物被膜清除率(\%)} = \frac{A_0 - A_{EO}}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为对照组吸光度值; A_{EO} 为精油处理组吸光度值。

(3) 生物被膜代谢活性测定

采用 TTC 还原法^[21]测定不同浓度藤椒精油对成熟生物被膜代谢活性的影响。向经过不同处理的生物被膜加入 2 mL 1.0 mg/mL TTC 溶液, 置于 37 °C 环境中避光反应 3 h, 测定 490 nm 吸光度值。

(4) 生物被膜内活菌数测定

按照 1.2.4 方法测定经过不同处理生物被膜内的活菌数。

1.2.6 生物被膜三维形貌观察和表面粗糙度测定

配制不同浓度(1 MIC、1/2 MIC)的含藤椒

精油 TSBS 培养基, 以未添加精油培养基作为对照, 各自分装 20 mL 于 50 mL 烧杯中, 接入 20 mL 菌悬液(10^6 CFU/mL), 将无菌载玻片斜放入烧杯中, 37 °C 静置培养 24 h, 轻轻取出载玻片, 用无菌 PBS 轻轻冲洗去除表面浮游菌体, 室温自然晾干后, 将附着有生物被膜的载玻片裁成 1 cm×1 cm 小片, 干燥喷金, 扫描电镜观察并拍照^[22]。用三维光学显微镜采集载玻片表面附着的生物膜表面三维形貌数据, 使用 Mountains Maps[®] 7 分析处理得到的表面形貌照片, 自动计算表面粗糙度 Ra (轮廓算术平均偏差), 样品扫描区域大小为 459 μm ×626 μm , 连续选取 3 个不同区域, 取平均值。

1.2.7 生物被膜基质中胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)组成分析

按 1.2.4 方法培养生物被膜, 24 h 后将培养基气液界面形成的生物被膜转移至 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 含 2% NaCl 的 2% EDTA 溶液^[23], 37 °C、160 r/min 振荡提取 40 h, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 即为 EPS 提取液。分别采用苯酚-硫酸法和 Bradford 法^[24]测定 EPS 提取液中的多糖和蛋白质浓度, 分别按照公式(2)计算单位面积生物被膜 EPS 基质中多糖和蛋白质含量。

$$\text{多糖/蛋白含量}(\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \frac{C \times V}{S} \quad (2)$$

式中: C 为提取液多糖或蛋白浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V 为 EPS 提取液体积, mL; S 为生物被膜面积, cm^2 。

1.2.8 细菌泳动与丛集能力测定

(1) 泳动能力测定

参照泳动培养基平板制备方法, 分别制备藤椒精油添加浓度为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的泳动培养基^[18], 并以未添加精油的平板作为对照。吸取 5 μL 细胞浓度为 10^6 CFU/mL 菌液滴加于培养皿中央, 待渗透入培养基内后, 置于 37 °C 培养 24 h, 并用十字交叉法测量细菌

泳动圈直径, 并计算泳动圈面积。

$$\text{泳动能力抑制率(\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (3)$$

式中: A_1 为对照平板泳动圈面积; A_2 为添加精油平板泳动圈面积。

(2) 丛集能力测定

向冷却至约 50 °C 的 20 mL 灭菌丛集培养基中加入不同体积藤椒精油(溶解于 10% DMSO), 混匀凝固, 分别制备藤椒精油添加浓度为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的含精油丛集平板^[25], 以未添加精油的培养基平板作为对照。用无菌牙签挑取单菌落, 刺入丛集培养基中部, 37 °C 培养 24 h, 采用十字交叉法测量细菌丛集圈直径, 并计算丛集圈面积。

$$\text{丛集能力抑制率(\%)} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (4)$$

式中: A_1 为对照平板丛集圈面积; A_2 为添加精油平板丛集圈面积。

1.2.9 细菌初期黏附能力分析

参照 Hu 等^[26]的方法并稍做修改, 向精油浓度为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、0 MIC 含 1 mL TSBS 培养基的 24 孔板中, 加入 1 mL 细胞浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 密封后 37 °C 静置孵育 8 h 使其发生初始黏附。除去孔中的培养基, 用无菌 PBS 清洗除去表面浮游菌, 向各孔中加入 25% 的甲醛 2 mL 固定 20 min, 除去甲醛后, 用无菌 PBS 清洗并置于 60 °C 干燥 30 min。后加入 2 mL 的 1% 结晶紫室温染色 20 min, 无菌 PBS 清洗除去多余染料, 60 °C 干燥 30 min 后加入 100% 的乙醇, 37 °C 孵育 30 min 以溶解结晶紫, 测定各孔 OD_{600} , 并采用公式(5)计算初期黏附抑制率。

$$\text{初期黏附抑制率(\%)} = \frac{OD_{\text{处理}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100 \quad (5)$$

1.2.10 细菌自聚集能力测定

参照 Wang 等^[27]的方法并做一定修改, 向 15 mL 试管中分别加入 3 mL 菌细胞浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 再依次加入浓度为 1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC 的藤椒精油, 涡旋混匀后测定 OD_{600} 值(A_0), 37 °C 静置培养 4 h 后测定上层 1 cm 左右菌悬液 OD_{600} 值(A_t), 参照公式(6)计算自聚集率。

$$\text{自聚集率(\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

1.2.11 细菌表面疏水性测定

采用微生物黏着碳氢化合物法^[28]测定细菌表面疏水性。将腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 接种于 LB 培养基, 37 °C、160 r/min 活化 24 h (下同), 菌液于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体后, 用 PUM 缓冲液洗涤 3 次并重悬菌体, 使其 OD_{600} 值为 0.5。向藤椒精油浓度为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的 3 mL PUM 缓冲液中加入 3 mL 的菌悬液, 未添加精油作为对照组, 37 °C 静置 4 h 后取样。首先测定菌液的 OD_{600} 值(A_i), 再取 3 mL 上述菌液与 400 μ L 正十六烷混合, 涡旋振荡 1 min, 37 °C 静置 15 min 后取下层水相, 测定 OD_{600} 值(A_f)。按公式(7)计算表面疏水率。

$$\text{疏水率(\%)} = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100 \quad (7)$$

1.2.12 细菌表面 Zeta 电位的测定

参照 Sudagidan 等^[29]的方法并稍做修改测定电位值, 将活化好的菌液于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体后, 用无菌水洗涤并重悬, 使得最终菌液 OD_{600} 为 0.5, 向精油添加量为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC 的 2 mL 无菌水中加入 2 mL 上述菌悬液, 以未添加精油为对照, 37 °C、160 r/min 振荡培养 4 h 后取样, 使用激光粒度电位仪测定 Zeta 电位值。

1.3 数据处理与统计分析

所有试验均重复 3 次, 结果用平均值±标准差表示, 并使用 SPSS 19.0 软件、邓肯检验法进行差异显著性检验($P<0.05$), Origin 9.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 藤椒精油主要挥发性物质成分分析

图 1 为藤椒精油 GC-MS 分析结果的总离子流图, 由图 1 可知精油的主要化学成分。再通过计算主要成分在精油中的相对含量, 由表 1 可知, 藤椒精油的挥发性化合物中相对含量 10%以上的有 3 种, 主要为芳樟醇、D-柠檬烯和桉烯, 其中芳樟醇相对含量最高, 为 52.37%, 这与不少研究者对藤椒挥发物质的定性定量研究结果^[30-31]基本一致。本实验提取的藤椒精油挥发性物质种类较其他研究偏少, 可能与原料产地、采收方法、储存和精油提取时间等因素有关。

2.2 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC)

MIC 与 MBC 分别是评价抑菌物质抗菌和杀菌能力大小的评价指标^[32]。由图 2 可知, 藤椒精油添加浓度为 3.2 $\mu\text{L/mL}$ 时, $\Delta OD_{600}<0.01$, 所以藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 的最小抑菌浓度 MIC 为 3.2 $\mu\text{L/mL}$ 。

MIC 浓度及以上精油添加培养液涂布 PCA

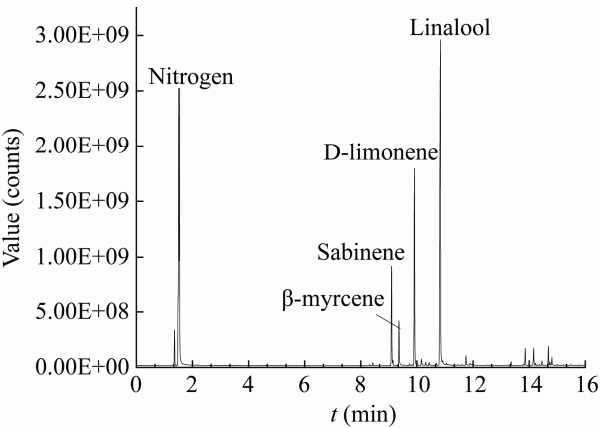


图 1 藤椒精油总离子流图
Figure 1 Total ionic chromatograms of *Z. armatum* essential oil.

平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 添加 12.8 $\mu\text{L/mL}$ 藤椒精油无菌落生长, 因此藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 的 MBC 为 12.8 $\mu\text{L/mL}$ 。

2.3 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 胞外蛋白酶活力的抑制作用

添加不同浓度藤椒精油对腐败菌胞外分泌蛋白酶能力的影响见图 3。由图 3A 可见, 腐败菌胞外蛋白酶的水解圈直径随着藤椒精油添加浓度的增加呈减小趋势, 添加 1 MIC 和 2 MIC 藤椒精油的发酵上清液均未产生蛋白水解圈。由图 3B 可知, 添加 1/2 MIC 浓度的藤椒精油对腐败菌胞外蛋白酶的分泌无显著影响($P>0.05$), 而添加 1 MIC 浓度藤椒精油可抑制腐败菌胞外蛋白酶的分泌, 其抑制率可达 92.25%。

表 1 GC-MS 鉴定的藤椒精油主要成分及含量

Table 1 Chemical constituents of *Z. armatum* essential oil identified by GC-MS

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	分子式 Molecular formula	化合物名称 Compounds	CAS 号 CAS No.	相对含量 Relative content (%)
1	9.10	C ₁₀ H ₁₆	Sabinene	3387-41-5	10.94
2	9.36	C ₁₀ H ₁₆	β -myrcene	123-35-3	4.57
3	9.92	C ₁₀ H ₁₆	D-limonene	5989-27-5	21.81
4	10.84	C ₁₀ H ₁₈ O	Linalool	78-70-6	52.37
5	13.86	C ₁₅ H ₂₄	(-)- β -elemene	515-13-9	1.55
6	14.16	C ₁₅ H ₂₄	β -caryophyllene	87-44-5	1.76

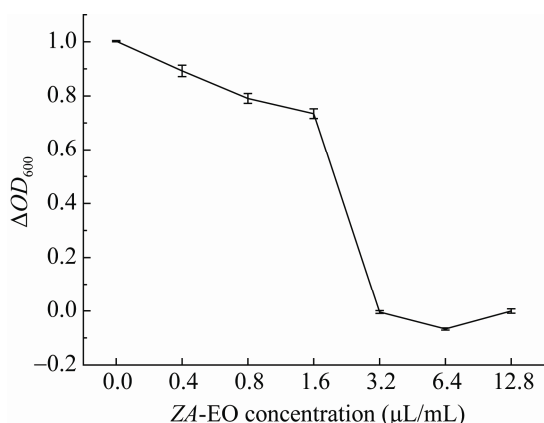


图 2 不同浓度藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生长的抑菌作用

Figure 2 Inhibitory effect of ZA-EO against spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a.

2.4 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜形成的抑制、清除作用及代谢活性的影响

2.4.1 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制及成熟生物被膜的清除作用

由图 4A 可见, 培养 24 h 后, 添加 1 MIC

浓度藤椒精油的培养基气液界面无生物被膜形成, 对照及添加其他浓度藤椒精油培养基气液界面形成了肉眼可见的生物被膜; 培养至 48 h 时, 添加 1 MIC 浓度精油的培养基气液界面仍未形成生物被膜, 说明添加 1 MIC 浓度的精油可对腐败菌的生物被膜产生持续的抑制作用; 添加亚抑菌浓度精油(<1 MIC)的培养基界面产生生物被膜厚度和强度随着培养时间逐渐增加, 表明亚抑菌浓度的精油可延缓生物被膜的形成, 但不能产生显著的抑制效果; 同时发现, 与对照培养基界面形成的生物被膜相比, 两组亚抑菌浓度精油的添加明显改变了生物膜表面形貌, 所形成的生物被膜较为疏松、表面褶皱宽大, 而对照组形成的生物被膜相对更加浓厚紧密。

由图 4B 可见, 未添加精油的培养基气液界面形成的生物被膜中活菌数量达到 $8.93 \lg (\text{CFU}/\text{cm}^2)$, 添加 1/4 MIC 精油形成的生物被膜内细菌数量与未添加精油的对照无显著性差异, 表明较低精油浓度难以抑制生物被膜的产生; 当精油

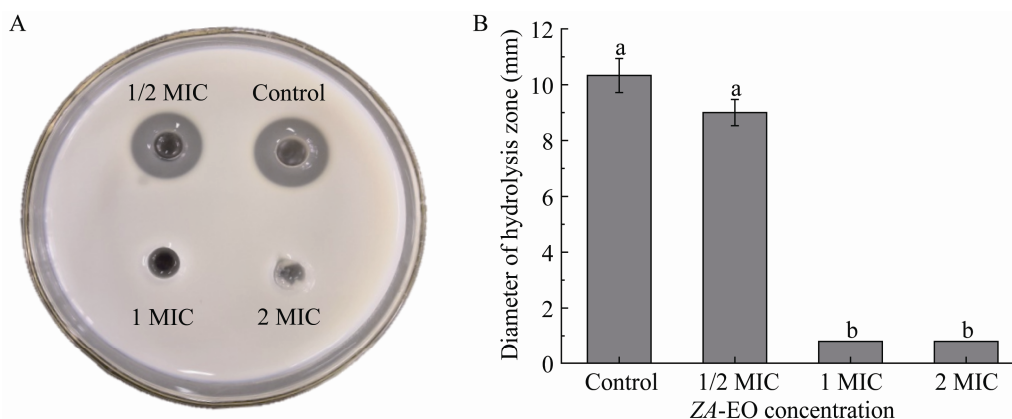


图 3 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 胞外蛋白酶活力的影响 A: 不同浓度藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 分泌蛋白酶的影响; B: 不同浓度藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 分泌胞外蛋白酶的抑制率, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 3 Effect of extracellular proteases secreted by spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a in presence of different concentration of ZA-EO. A: The effect of different concentrations of ZA-EO on the protease secretion of spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a. B: The inhibition rate of different concentrations of ZA-EO on the extracellular protease secreted by spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a; Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

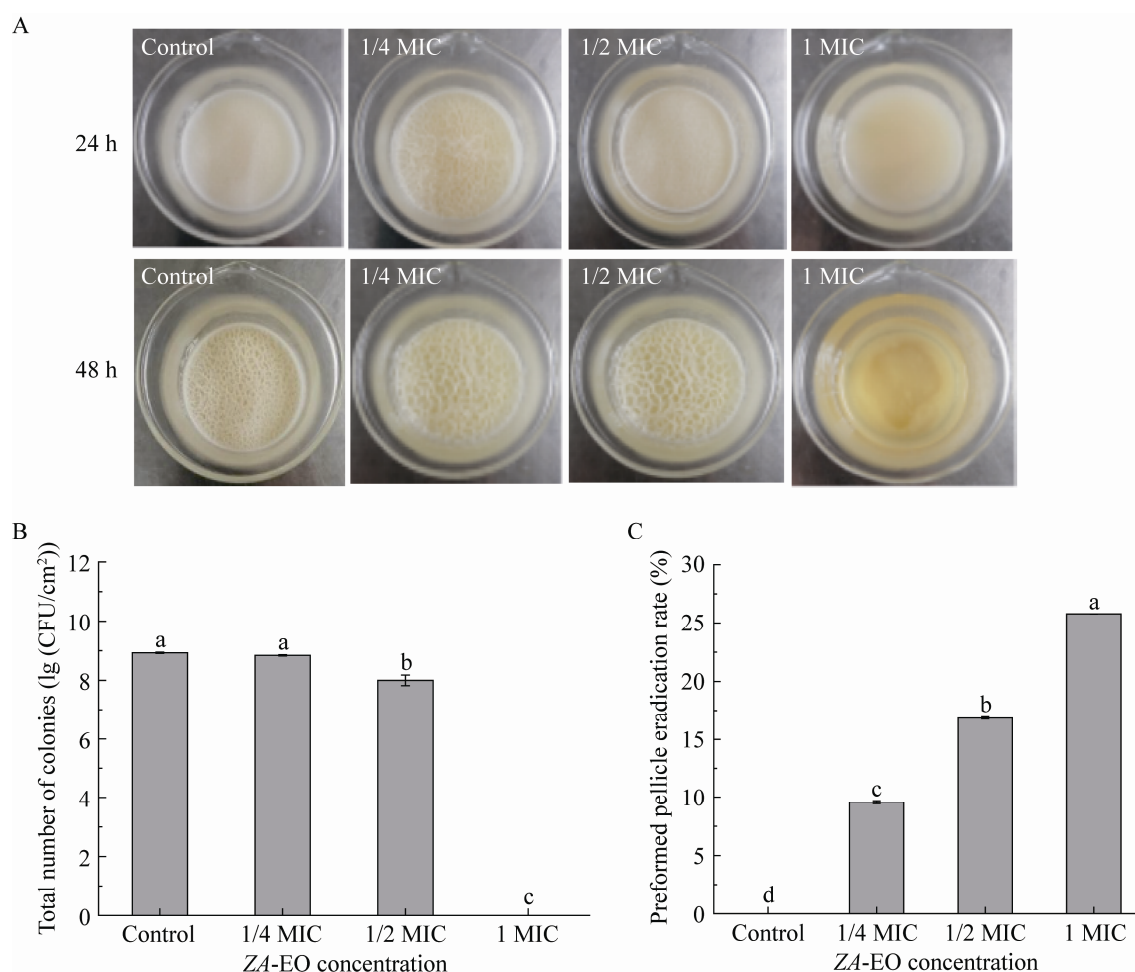


图 4 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制及成熟生物被膜清除活性 A: 24 h、48 h 生物被膜的生长情况; B: 精油对菌体数量的影响; C: 精油对成熟生物被膜的清除率; 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Inhibitory of ZA-EO on pellicle biofilm and its eradication effect on preformed biofilm of spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a. A: The growth of pellicle biofilm at 24 h and 48 h; B: The effect of EO on the number of bacteria; C: The clearance rate of mature pellicle biofilm by EO; Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

添加浓度增加至 1/2 MIC, 所形成的生物被膜中活菌数量开始显著减少。由于 1 MIC 浓度的藤椒精油抑制了 DY1a 生长, 因此培养基气液界面未形成生物被膜。

由图 4C 可知, 随着藤椒精油添加量的增加, 对生物被膜的清除能力逐渐增高。添加藤椒精油浓度为 1/4 MIC 时, 生物被膜清除率为 9.56%,

1 MIC 浓度的精油对腐败菌生物被膜的清除率提高至 25.79%, 表明藤椒精油对成熟生物被膜具有一定的清除能力。

2.4.2 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 成熟生物被膜代谢活性及膜内活菌数的影响

由图 5A 可知, 随着精油添加浓度的提高, 生物被膜代谢活性呈逐渐降低趋势, 添加 1 MIC

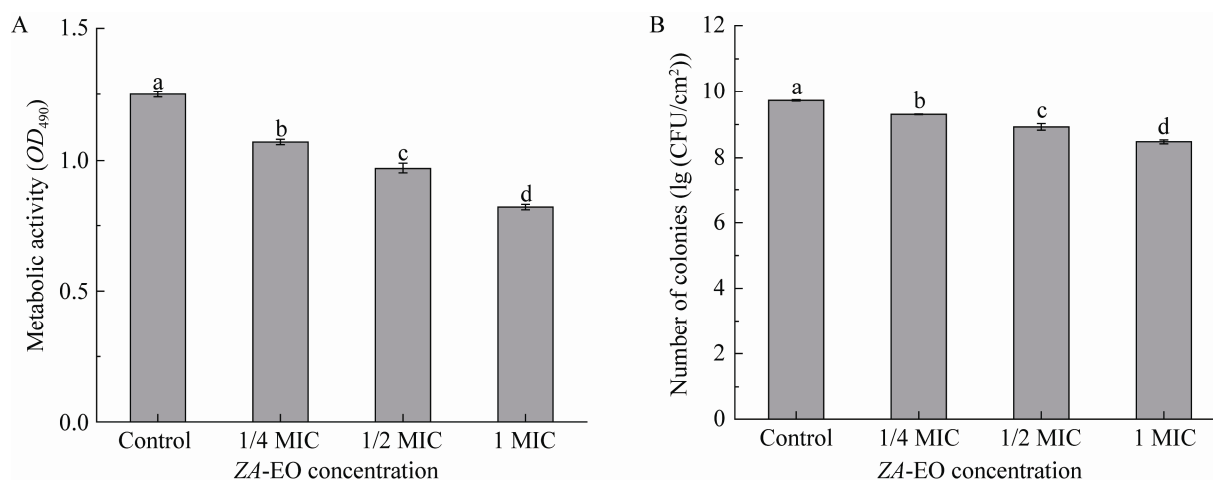


图5 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 成熟生物被膜代谢活性及活菌数量的影响 A: 藤椒精油对成熟生物被膜代谢活性的影响; B: 藤椒精油对成熟生物被膜内活菌数的影响; 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Inhibitory of Z4-EO on metabolic activity of preformed biofilm and viable counts of living bacteria embedded in preformed biofilm of spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a. A: The metabolic activity of preformed pellicle biofilm added with different Z4-EO; B: Living bacteria counts embedded in preformed biofilm; Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

浓度的精油处理使生物被膜代谢活性值降低了0.43, 较对照减小34.72%。由图5B可知, 活菌数也随着处理精油浓度的提高而呈减少趋势, 其中1 MIC浓度精油处理生物被膜活菌数较对照减少了1.25 lg(CFU/cm²)。

2.5 解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 生物被膜三维结构分析

由图6A可知, 未添加精油的培养基气液界面形成的生物被膜表面可见大量菌体聚集, 并形成了较为致密的褶皱。随着精油浓度的增加, 生物膜表面的褶皱开始逐渐变平(图6B、6C), 添加1 MIC浓度精油的载玻片表面(图6C)无明显的菌体聚集, 可见的少许颗粒是培养基中大豆蛋白聚集体。三维轮廓扫描结果(图6D–6F)显示, 添加1/2 MIC浓度精油时, 生物被膜表面褶皱变稀疏(图6E), 粗糙度Ra值显著降低(图6G); 添加1 MIC浓度精油时, 生物被膜褶皱明显骤减, 表面相对光滑(图6F), 表面粗糙度达到最低

值, 为0.36 μm(图6G)。

2.6 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 生物被膜基质组成的影响

胞外聚合物(EPS)是细菌生物被膜基质的大分子聚合体, 可为细菌细胞提供保护以免受外界不利生存因子的影响^[33]。胞外多糖与蛋白质约占EPS干物质的75%左右, 是形成生物被膜的骨架成分。由图7可见, 生物被膜中的蛋白质含量低于多糖含量, 但二者的含量均随着藤椒精油添加浓度的增加而降低; 当精油添加浓度为1/2 MIC时, 生物被膜基质多糖和蛋白质含量较对照分别降低了52.43%和85.48%。

2.7 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 运动能力的抑制作用

泳动是由鞭毛细菌易位所产生的一种细菌运动现象, 对细菌的初始附着和生物被膜形成具有重要影响^[34]。腐败菌解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 在不同浓度藤椒精油下的泳动结果见图8A: 添

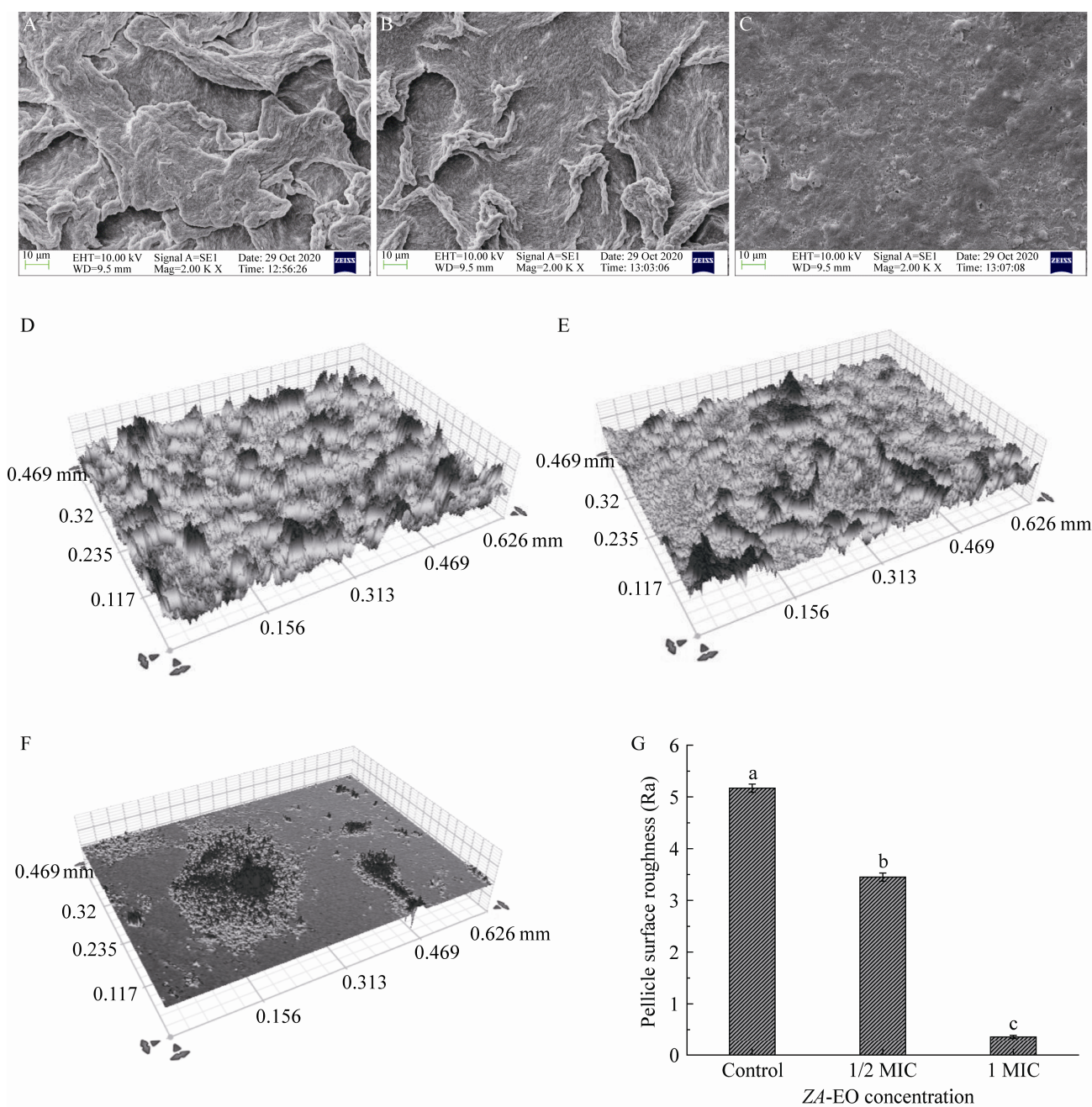


图 6 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜表面微观结构、3D 表面形貌及粗糙度的影响 A-C: SEM 结果图; D-E: 三维形貌结果图; G: 生物被膜表面粗糙度; 其中图 A 和 D、图 B 和 E、图 C 和 F 的精油添加浓度分别为 0 MIC、1/2 MIC、1 MIC; 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 6 Effect of ZA-EO addition on surface topography and roughness of pellicle formed by spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a. A-C: SEM images; D-E: Three-dimensional topography images; G: Surface roughness of pellicle biofilm; The concentration of essential oil added in Figure A and D, Figure B and E and Figure C and F are 0 MIC, 1/2 MIC, and 1 MIC; Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

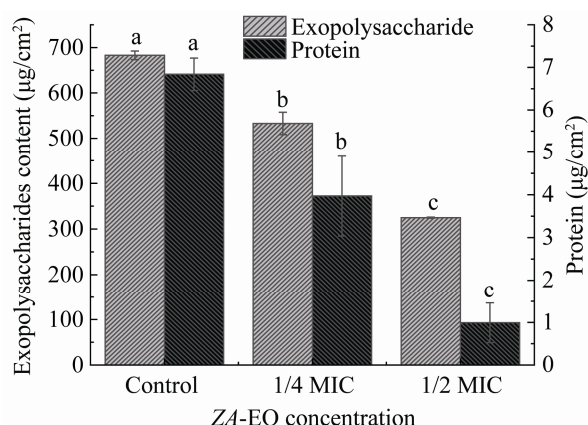


图 7 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 生物被膜胞外聚合物多糖与蛋白质含量的影响 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 7 Exopolysaccharides and protein content within pellicle EPS matrix of spoilage *B. amyloliquefaciens* *DY1a* in the presence of ZA-EO. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

加不同浓度的藤椒精油可明显抑制细菌的泳动能力,精油对细菌泳动能力的抑制随着精油浓度的增加而提高,当藤椒精油添加浓度为 1 MIC 时无泳动圈的产生,腐败菌的泳动现象被完全抑制,抑制率可达 100% (图 8B)。

细菌的丛集运动主要依赖于鞭毛细菌的表面易位,可使得培养介质表面细菌聚集而形成微菌落^[21]。较强的丛集运动能力有助于细菌生物被膜的形成。腐败解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 在不同浓度藤椒精油下的丛集试验结果见图 8A 所示:随着藤椒精油浓度的增加,丛集圈直径逐渐减小,表明藤椒精油对细菌丛集运动具有强烈的抑制作用,而且抑制作用呈浓度依赖性。如图 8C 所示,当添加 1/2 MIC 浓度的藤椒精油时,对丛集运动的抑制率达 $67.34\%\pm0.44\%$,当添加浓度为 1 MIC 时则完全被抑制。

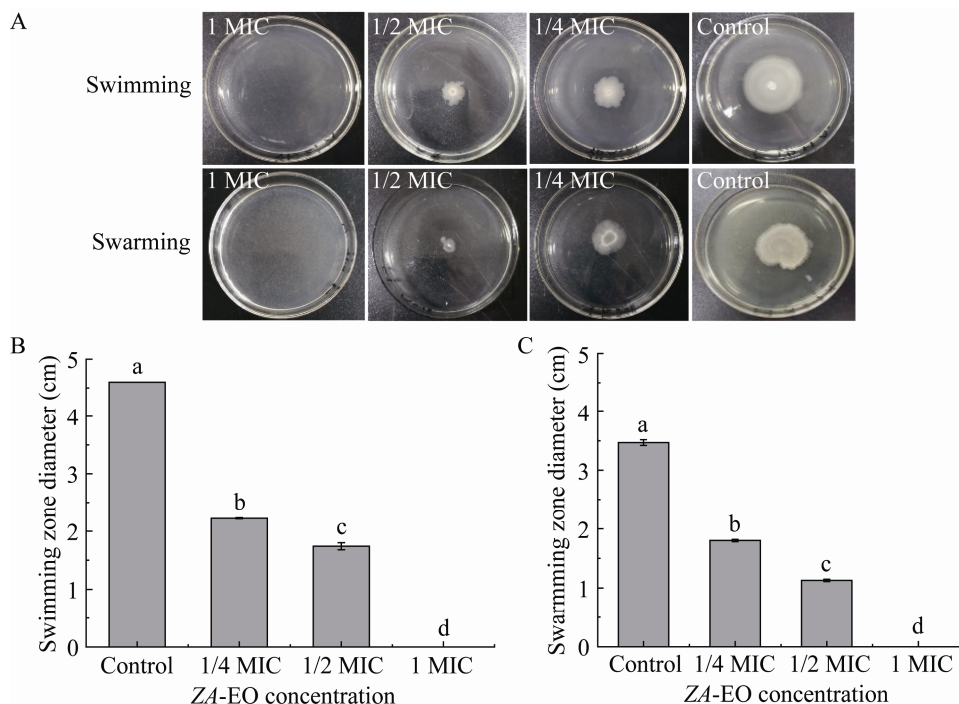


图 8 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 *DY1a* 泳动和丛集能力的抑制作用 A: 细菌泳动、丛集结果图; B、C: 精油对泳动能力、丛集能力影响的结果图,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 8 Inhibitory effects of ZA-EO on the swimming and swarming motilities of spoilage *B. amyloliquefaciens* *DY1a*. A: Denotes swimming and swarming on plate. B and C: Swimming and swarming zone diameter results; Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.8 藤椒精油对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 细胞黏附、自聚集及表面特性的影响

菌体细胞黏附在生物和非生物表面是生物被膜形成的第一步, 而细胞表面疏水性及电荷是影响这一复杂过程的重要因素^[35]。菌体细胞间的疏水相互作用是微生物在固体表面或成膜界面上黏附聚集并增殖的重要理化因素^[36]。由图 9A 和图 9B 可见, 随着精油浓度的提高, 细胞的相对黏附率和自聚集率均逐渐降低; 当达到 1 MIC 浓度时, 细胞相对黏附率和自聚集率分别降低了 28.63% 和 54.40%。由图 9C 可

见, 藤椒精油的添加增强了腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 细胞表面的疏水性, 而且疏水率的提高呈浓度依赖性, 添加 1 MIC 浓度的精油使细胞表面疏水率提高了 33.58%。由图 9D 可知, 腐败菌 DY1a 细胞表面呈负电位, 随着精油浓度的提高, 负电位强度逐渐降低, 1 MIC 尤为显著。

3 讨论

植物精油是一类具有良好杀菌抑菌及抗生物被膜活性的天然抑菌剂, 近年来备受国内外研究者的关注^[37-39]。本研究考察了藤椒精油对

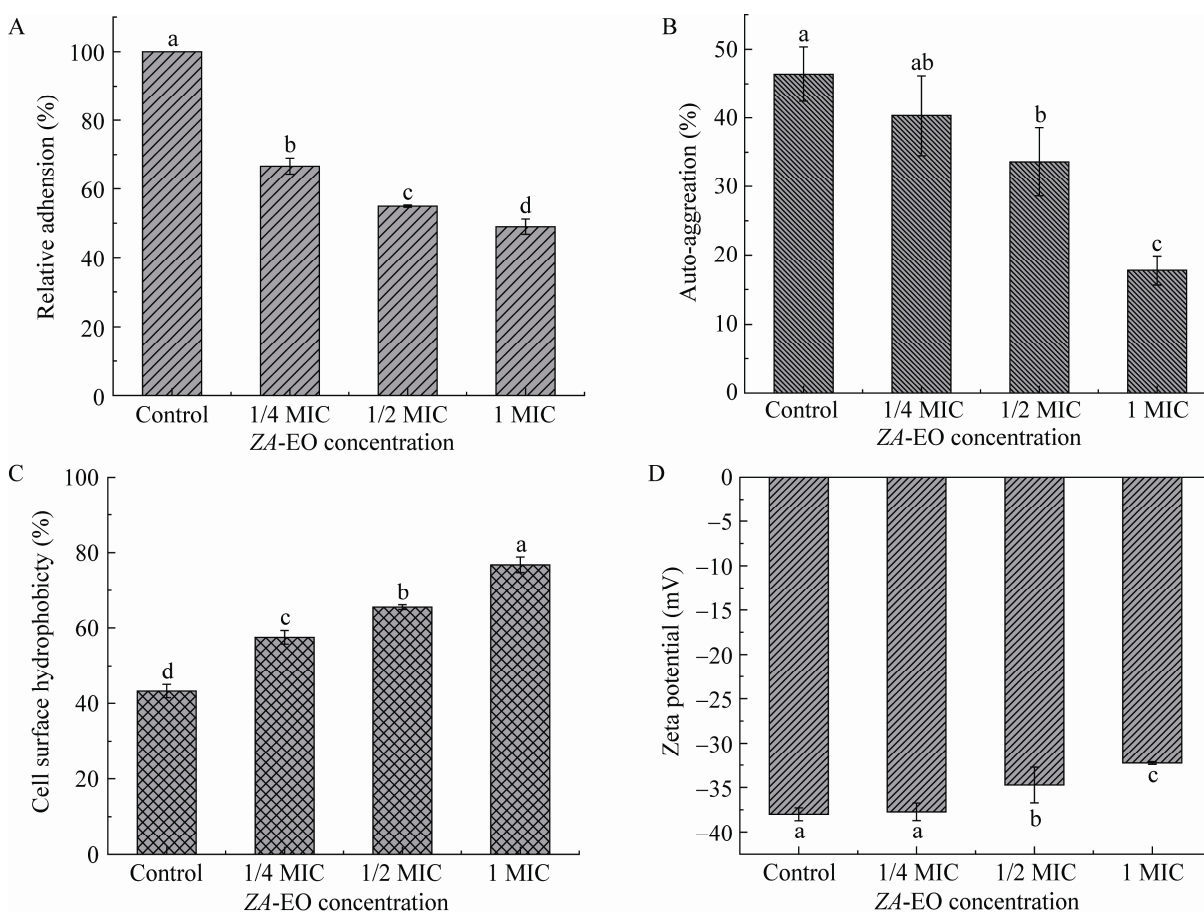


图 9 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 细胞黏附、自聚集及表面特性的影响 A-D: 精油对细胞相对黏附率、自聚集率、表面疏水性及细胞电荷的影响; 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 9 Effects of ZA-EO on cell adhesion, auto-aggregation and surface properties of spoilage *B. amyloliquefaciens* DY1a. A-D: The results of cell adhesion, auto-aggregation and cell surface, Zeta potential; Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

导致豆制品腐败的解淀粉芽孢杆菌 DY1a 菌体生长繁殖及生物被膜的抑制和清除效果,结果表明藤椒精油对该腐败菌具有较强的抑菌和杀菌作用,同时对气液界面生物被膜的形成具有良好的抑制效果,而且对成熟稳定的生物被膜内活菌具有一定的清除效果,降低了成熟生物被膜的代谢活性及其活菌数。此外,藤椒精油对腐败菌致腐因子——胞外蛋白酶具有较强的抑制作用。上述结果表明,藤椒精油在减少豆制品中腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 的生长繁殖,以及抑制或清除生物被膜方面具有一定的应用潜力。

芽孢杆菌在气液界面形成生物被膜的过程与固定界面表面形成潜底型生物被膜不同。芽孢杆菌在气液界面形成的浮游生物被膜的途径包括两种不同方式:(1)细菌通过趋氧趋化运动至培养器皿、液体培养基和空气的三相界面环并产生不可逆黏附,进一步通过分泌的胞外多糖黏接更多的菌体细胞,不断向气液界面中间部位延伸聚集^[40];(2)液体培养基中远离器皿壁的运动细胞群通过鞭毛产生群集旋涡式向上运动,并在负责专门产生胞外多糖细胞产生的胞外多糖基质的协同下,在气液界面中间部位构建生物被膜^[41]。在这两种生物被膜形成方式中,由鞭毛介导的细菌运动对生物被膜的形成均具有重要影响^[42-43]。本实验通过细菌运动能力分析发现,藤椒精油可显著抑制菌体泳动与丛集能力,干扰菌体在两种不同成膜界面的聚集与黏附,从而抑制气液界面生物被膜的形成。

细菌生物被膜的形成是一个十分复杂的过程,除细菌本身的运动能力外,细菌表面特性也是影响菌体界面黏附和聚集能力的一类重要因素。国内外大部分研究认为,较高的细胞表面疏水性有助于菌体在界面的黏附和聚集,促

进生物被膜的形成^[30,44]。然而也有部分研究发现,精油抑制细菌生物被膜形成的同时,并未降低细胞表面疏水性,而是增强了表面疏水性^[45-46]。本研究表明,藤椒精油抑制细菌黏附、自聚集能力的同时,增强了腐败菌 DY1a 的细胞表面疏水性,与大部分研究结论并不一致。精油可能增强了细胞壁和细胞膜的通透性,使胞内蛋白质、脂质等物质不断泄漏至胞外,并作为表面活性剂来降低界面与微生物细胞之间的表面和界面张力,最终改变了细胞的黏附性^[47]。此外,细胞表面疏水性还与菌株自身的特性、相关疏水蛋白基因的表达等有关^[48-49]。Wang 等^[27]通过相关性分析研究认为,细胞表面疏水性与自聚集并无显著相关性。不少有关细菌表面疏水性、电位与生物膜形成能力之间的相关性研究获得的结论并不完全一致^[29,34,50]。因此,不同抗生物被膜活性物质对细菌表面疏水特性的影响差异可能与菌株特性、活性物质如 O-抗原及培养基环境等多种复杂因素有关。

胞外多糖与蛋白质是细菌生物被膜基质中主要的骨架大分子,对细胞初始黏附聚集、生物被膜的成熟及其结构的稳定性具有重要作用。柏梅^[24]研究发现,山苍子精油可抑制金黄色葡萄球菌生物被膜中胞外多糖的合成。本实验表明,藤椒精油显著抑制了生物被膜中多糖与蛋白质的合成,进而抑制或延缓腐败菌生物被膜的形成和成熟过程。细菌鞭毛组装和运动调控,以及生物被膜基质胞外多糖和蛋白的合成分泌表达对生物被膜形成的不同阶段具有重要影响。研究将通过转录组测序技术,分析藤椒精油关键活性组分对鞭毛组装、胞外多糖和被膜蛋白(如 TasA、BslA 等)等基质分子的基因表达与调控的影响,进一步阐明藤椒精油的抗芽孢杆菌生物被膜分子机理。此外,藤椒精油

在豆杆制品防腐保鲜的实际应用效果有待进一步考察评价。

4 结论

藤椒精油主要含有芳樟醇、D-柠檬烯和桉烯等活性成分,对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 菌体生长及生物被膜形成均具有良好的抑制效果,最低抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 3.2 $\mu\text{L/mL}$ 和 12.8 $\mu\text{L/mL}$ 。藤椒精油可抑制腐败菌胞外蛋白酶的产生和生物被膜的形成,对成熟生物被膜具有一定的清除能力。藤椒精油的添加改变了生物被膜形貌,降低了生物被膜表面粗糙度,减少了基质多糖和蛋白合成。藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜形成的抑制主要是通过减弱细菌运动能力、改变细胞表面疏水性、降低自聚集能力及干扰细菌生物被膜中多糖和蛋白质的合成来实现的。

REFERENCES

- [1] Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick[J]. Scientific American, 1978, 238(1): 86-95
- [2] Brand T, Wohanka W. Importance and characterization of the biological component in slow filters[J]. Acta Horticulturae, 2001(554): 313-322
- [3] Vlamakis H, Chai YR, Beauregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(3): 157-168
- [4] Camargo AC, Woodward JJ, Call DR, Nero LA. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2017, 14(11): 623-636
- [5] Zhang CH, Li CZ, Abdel-Samie MA, Cui HY, Lin L. Unraveling the inhibitory mechanism of clove essential oil against *Listeria monocytogenes* biofilm and applying it to vegetable surfaces[J]. LWT, 2020, 134: 110210
- [6] Wang HH, Wu N, Jiang Y, Ye KP, Xu XL, Zhou GH. Response of long-term acid stress to biofilm formation of meat-related *Salmonella enteritidis*[J]. Food Control, 2016, 69: 214-220
- [7] 谭秀山, 赵兴, 黄现青. 低温等离子体及防腐剂对解淀粉芽孢杆菌芽孢灭活效果的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 31-34
- Tan XS, Zhao X, Huang XQ. Effects of low temperature plasma and preservatives on inactivation of *Bacillus amyloidosis* spores[J]. China Brewing, 2019, 38(10): 31-34 (in Chinese)
- [8] 李盈颖, 高雯, 周幅萍. 山西老陈醋样品的污染微生物分析[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 226-231
- Li YY, Gao W, Zhou GP. Case analysis of contaminated Shanxi aged vinegar[J]. Food Science, 2016, 37(12): 226-231 (in Chinese)
- [9] Kim JB, Choi OK, Kwon SM, Cho SH, Park BJ, Jin NY, Yu YM, Oh DH. Prevalence and toxin characteristics of *Bacillus thuringiensis* isolated from organic vegetables[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(8): 1449-1456
- [10] Li Z, Siepmann FB, RojasTovar LE, Chen XY, Gänzle MG. Effect of copy number of the *spoVA*^{2mob} operon, sourdough and reutericyclin on rory bread spoilage caused by *Bacillus* spp.[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103507
- [11] Shen GH, Zheng LJ, Li SS, Wu HJ, Li ML, Luo QY, Yu GZ, Chen AJ, Zhang ZQ. The role of soy protein degradation caused by spoilage *Bacillus amyloliquefaciens* in texture deterioration of yuba, a soy product[J]. LWT, 2020, 123: 109108
- [12] Duskaev G, Rakhmatullin S, Kvan O. Effects of *Bacillus cereus* and coumarin on growth performance, blood biochemical parameters, and meat quality in broilers[J]. Veterinary World, 2020, 13(11): 2484-2492
- [13] 郑丽君, 申光辉, 张志清, 李辰凤, 陈安均, 黎杉珊, 吴贺君, 罗松明. 真空包装免泡豆杆优势腐败细菌分离鉴定及其致病能力分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 177-184
- Zheng LJ, Shen GH, Zhang ZQ, Li CF, Chen AJ, Li SS, Wu HJ, Luo SM. Isolation, identification and evaluation of dominant spoilage bacteria from vacuum-packaged nonrehydrated dougan, a Chinese traditional rod-shaped soybean product prepared with protein-lipid film[J]. Food Science, 2018, 39(2): 177-184 (in Chinese)
- [14] Rossi C, Chaves-López C, Serio A, Casaccia M, Maggio F, Paparella A. Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: an updated review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 62(8): 2172-2191

- [15] Diao WR, Hu QP, Feng SS, Li WQ, Xu JG. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against selected foodborne pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(25): 6044-6049
- [16] 徐丹萍, 蒲彪, 叶萌, 王春霞, 付本宁, 蔡沁玥, 文秋萍. 藤椒冷榨油饼粕中多酚的纯化及体外抗氧化活性[J]. 西北农业学报, 2018, 27(11): 1690-1700
Xu DP, Pu B, Ye M, Wang CX, Fu BN, Cai QY, Wen QP. Study on extraction, purification and antioxidant activity of polyphenols in cold pressed oil residue of *Zanthoxylum armatum*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(11): 1690-1700 (in Chinese)
- [17] 课净璇, 瞿瑗, 黎杉珊, 申光辉, 罗擎英, 吴贺君, 陈安均, 蒲彪, 叶萌, 张志清. 基于GC-MS建立花椒挥发油指纹图谱及在汉源红花椒鉴定中的应用[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(11): 116-126
Ke JX, Qu Y, Li SS, Shen GH, Luo QY, Wu HJ, Chen AJ, Pu B, Ye M, Zhang ZQ. Establishment of GC-MS fingerprint based on essential oil components in *Zanthoxylum* and application on Hanyaun *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(11): 116-126 (in Chinese)
- [18] 代博仁, 申光辉, 刘海娜, 张丽丹, 何春桥, 葛润邱. 大蒜有机硫化物对解淀粉芽孢杆菌的抑菌作用及机理[J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 95-103
Dai BR, Shen GH, Liu HN, Zhang LD, He CQ, Ge RQ. Antibacterial activity and mechanism of garlic organic sulfide against *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 95-103 (in Chinese)
- [19] Jha PK, Dallagi H, Richard E, Benezech T, Faille C. Formation and resistance to cleaning of biofilms at air-liquid-wall interface. Influence of bacterial strain and material[J]. Food Control, 2020, 118: 107384
- [20] Ghaderi L, Aliahmadi A, Ebrahimi SN, Rafati H. Effective inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by *Satureja khuzistanica* essential oil nanoemulsion[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021, 61: 102260
- [21] Sabaeifard P, Abdi-Ali A, Soudi MR, Dinarvand R. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 105: 134-140
- [22] Kim YJ, Yu HH, Song YJ, Park YJ, Lee NK, Paik HD. Anti-biofilm effect of the cell-free supernatant of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2021, 121: 107667
- [23] Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 882-894
- [24] 柏梅. 山苍子精油对金黄色葡萄球菌及其生物膜的抑制机制研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2019
Bai M. Inhibition mechanism of *Litsea cubeba* essential oil on *Staphylococcus aureus* and its biofilm[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2019 (in Chinese)
- [25] Cong YG, Wang J, Chen ZJ, Xiong K, Xu QW, Hu FQ. Characterization of swarming motility in *Citrobacter freundii*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 317(2): 160-171
- [26] Hu WS, Nam DM, Choi JY, Kim JS, Koo OK. Anti-attachment, anti-biofilm, and antioxidant properties of *Brassicaceae* extracts on *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(6): 1881-1890
- [27] Wang Y, Samaranayake LP, Dykes GA. Tea extracts modulate oral biofilm development by altering bacterial hydrophobicity and aggregation[J]. Archives of Oral Biology, 2021, 122: 105032
- [28] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity[J]. FEMS Microbiology Letters, 1980, 9(1): 29-33
- [29] Sudagidan M, Ozalp VC, Öztürk O, Yurt MNZ, Yavuz O, Tasbasi BB, Ucak S, Mavili ZS, Coban A, Aydin A. Bacterial surface, biofilm and virulence properties of *Listeria monocytogenes* strains isolated from smoked salmon and fish food contact surfaces[J]. Food Bioscience, 2021, 41: 101021
- [30] Li T, Chen MY, Ren GX, Hua GD, Mi J, Jiang D, Liu CS. Antifungal activity of essential oil from *Zanthoxylum armatum* DC. on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored platycladi semen[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 633714
- [31] Liu YP, Li QR, Yang WX, Sun BG, Zhou Y, Zheng Y, Huang MQ, Yang WJ. Characterization of the potent odorants in *Zanthoxylum armatum* DC Prodr. pericarp oil by application of gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry and odor activity value[J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126564

- [32] 许美秋. 冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[D]. 洛阳: 河南科技大学硕士学位论文, 2017
- Xu MQ. Effect on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* by *Rabdosia rubescens* extract[D]. Luoyang: Master's Thesis of Henan University of Science and Technology, 2017 (in Chinese)
- [33] Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. *Molecules*, 2009, 14(7): 2535-2554
- [34] Harshey RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57(1): 249-273
- [35] Czerwonka G, Guzy A, Kałuža K, Grosicka M, Dańczuk M, Lechowicz Ł, Gmiller D, Kowalczyk P, Kaca W. The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(9): 877-884
- [36] Sedláčková P, Čeřovský M, Horsáková I, Voldřich M. Cell surface characteristic of *Asaia bogorensis*-spoilage microorganism of bottled water[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, 29(4): 457-461
- [37] Phuyal N, Jha PK, Prasad Raturi P, Rajbhandary S. *Zanthoxylum armatum* DC.: current knowledge, gaps and opportunities in Nepal[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 229: 326-341
- [38] Arasu MV, Viayaraghavan P, Ilavenil S, Al-Dhabi NA, Choi KC. Essential oil of four medicinal plants and protective properties in plum fruits against the spoilage bacteria and fungi[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 133: 54-62
- [39] Ji Y, Li SM, Ho CT. Chemical composition, sensory properties and application of Sichuan pepper (*Zanthoxylum* genus)[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2019, 8(2): 115-125
- [40] Kobayashi K. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(13): 4920-4931
- [41] Steinberg N, Rosenberg G, Keren-Paz A, Kolodkin-Gal I. Collective Vortex-like movement of *Bacillus subtilis* facilitates the generation of floating biofilms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 4272-4281
- [42] Du B, Gu Y, Chen GW, Wang G, Liu L. Flagellar motility mediates early-stage biofilm formation in oligotrophic aquatic environment[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 194: 110340
- [43] Atkinson S, Chang CY, Sockett RE, Cámara M, Williams P. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(4): 1451-1461
- [44] 张晨, 刘雅丽, 陈思佳, 张向宇. 柠檬精油、柠檬烯、茶多酚对变形链球菌表面疏水性及黏附的影响[J]. *实用口腔医学杂志*, 2016, 32(4): 471-474
- Zhang C, Liu YL, Chen SJ, Zhang XY. The effects of lemon essential oil, limonene and tea polyphenols on cell surface hydrophobicity and adherence of *Streptococcus mutans*[J]. *Journal of Practical Stomatology*, 2016, 32(4): 471-474 (in Chinese)
- [45] Liu T, Kang JM, Liu L. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm[J]. *LWT*, 2021, 136: 110354
- [46] 郭彦君, 郑召君, 叶展, 刘元法. 鸚鵡油的抑菌活性及机理研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(12): 25-31
- Guo YJ, Zheng ZJ, Ye Z, Liu YF. Antibacterial activity and mechanism of emu oil[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(12): 25-31 (in Chinese)
- [47] Subbiahdoss G, Reimhult E. Biofilm formation at oil-water interfaces is not a simple function of bacterial hydrophobicity[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2020, 194: 111163
- [48] Li J, Fang DY, Ye RM, Zhou CF, Li PF. The released polysaccharide inhibits cell aggregation and biofilm formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *European Journal of Phycology*, 2021, 56(2): 119-128
- [49] Nakagawa Y, Toda Y, Yamamura H, Hayakawa M, Imura Y. FLO11 is essential for pellicle formation by wild pellicle-forming yeasts isolated from contaminated wines[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111(1): 7-9
- [50] Rzhapishevskaya O, Limanska N, Galkin M, Lacoma A, Lundquist M, Sokol D, Hakobyan S, Sjöstedt A, Prat C, Ramstedt M. Characterization of clinically relevant model bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* for anti-biofilm testing of materials[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 76: 99-107