

# 超声和绿原酸联用对杀鲑气单胞菌生物膜的协同杀菌作用

孙晋跃<sup>1</sup>, 刘芳<sup>1\*</sup>, 吴海虹<sup>1</sup>, 孙芝兰<sup>1</sup>, 孙远成<sup>2</sup>

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014) (2. 徐州荣炷食品有限公司, 江苏徐州 221624)

**摘要:** 为了探究超声联合绿原酸处理对杀鲑气单胞菌生物膜的杀菌效果及可能的作用机制, 分析了超声 (ultrasound, US)、绿原酸 (chlorogenic acid, CA, 0.5%、1%、2%) 以及超声联合绿原酸 (US+0.5% CA、US+1% CA、US+2% CA) 处理后的杀鲑气单胞菌生物膜。结果表明 US+1% CA 可在 60 min 内使得杀鲑气单胞菌生物膜细胞降低 8 logCFU/mL, 这与 2% CA 单独处理的杀菌效果一致。胞外多糖含量分析发现 US+1% CA 能使得生物膜内可溶性多糖与不可溶性多糖含量分别降低到 13.01 和 16.52 μg/mL, 扫描电镜、激光共聚焦电镜和胞外物质含量分析发现联合处理明显导致生物膜空间结构的瓦解, 造成了生物膜内菌体细胞的细胞膜通透性急剧增加, 导致胞外核酸和 ATP 的浓度显著高于对照组 ( $p<0.05$ )。此外, 联合处理显著降低了菌体细胞内呼吸链脱氢酶活性 ( $p<0.05$ )。综上可知, US+CA 处理能通过协同降低生物膜胞外多糖的含量, 破坏菌体细胞的完整性及胞内酶的活性来达到对杀鲑气单胞菌生物膜的控制效果。

**关键词:** 超声; 绿原酸; 杀鲑气单胞菌; 生物膜; 协同作用

文章编号: 1673-9078(2022)03-97-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0777

## Synergistic Bactericidal Effect of the Combined Use of Ultrasound and Chlorogenic Acid against *Aeromonas salmonicida* Biofilms

SUN Jinyue<sup>1</sup>, LIU Fang<sup>1\*</sup>, WU Haihong<sup>1</sup>, SUN Zhilan<sup>1</sup>, SUN Yuancheng<sup>2</sup>

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

(2. Xuzhou Rongji Food Co. Ltd., Xuzhou 221624, China)

**Abstract:** The bactericidal effect of ultrasound (US) combined with chlorogenic acid (CA) on *Aeromonas salmonicida* biofilms was investigated, and the mechanism underlying the combined bactericidal effect was explored. *A. salmonicida* biofilms were treated with US, chlorogenic acid (0.5%, 1%, 2% CA), or US combined with chlorogenic acid (US plus 0.5% CA, US plus 1% CA, US plus 2% CA). Results showed that treatment with US combined with 1% CA for 60 min reduced the formation of *A. salmonicida* biofilms by approximately 8 logCFU/mL, similar to that in treatment using 2% CA alone. Analysis of the extracellular polysaccharide content revealed that the concentrations of soluble and insoluble polysaccharides in *A. salmonicida* biofilms were reduced to 13.01 and 16.52 μg/mL, respectively, after treatment with US combined with 1% CA. Analysis of extracellular contents using scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) revealed that the combined treatment resulted to a significant disintegration of the spatial structures of biofilms. Subsequently, membrane permeability of the bacterial cells in the biofilms sharply increased, resulting in significantly higher extracellular nucleic acid and ATP concentrations than the control group ( $p<0.05$ ). Moreover, combined treatment significantly lowered the activity of respiratory chain dehydrogenase (RCD) within the bacterial cells ( $p<0.05$ ). These results suggest that the combined use of US and CA exerted synergistic

引文格式:

孙晋跃,刘芳,吴海虹,等.超声和绿原酸联用对杀鲑气单胞菌生物膜的协同杀菌作用[J].现代食品科技,2022,38(3):97-104

SUN Jinyue, LIU Fang, WU Haihong, et al. Synergistic bactericidal effect of the combined use of ultrasound and chlorogenic acid against *Aeromonas salmonicida* biofilms [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 97-104

收稿日期: 2021-07-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371802); 江苏省苏北科技专项 (XZ-SZ202012)

作者简介: 孙晋跃 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜禽产品质量安全, E-mail: 2055163428@qq.com

通讯作者: 刘芳 (1982-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 畜禽产品质量安全, E-mail: fangliu82@163.com

bactericidal effects on biofilms by reducing extracellular polysaccharide content and intracellular enzymatic activity of biofilms and disrupting the bacterial cell integrity.

**Key words:** ultrasound; chlorogenic acid; *Aeromonas salmonicida*; biofilm; synergistic effect

杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 是革兰氏阴性条件致病菌, 它会感染虾类、鱼类以及家禽类等生物, 引发败血症、肺炎、胃肠炎等疾病<sup>[1-4]</sup>。已有研究报道杀鲑气单胞菌广泛存在于肉类产品中, 它可引起肉制品的腐败变质<sup>[2]</sup>。杀鲑气单胞菌会附着于食品加工机械的表面、裂缝、拐角以及一些遮蔽处, 形成一层肉眼可见的生物膜, 有研究报道了杀鲑气单胞菌具有很强的生物膜形成能力<sup>[5,6]</sup>。生物膜的存在会给食品的加工、储藏以及运输过程造成二次污染, 缩短食品的货架期, 给企业带来巨大的经济损失, 甚至引发食品安全问题。因此, 鉴于杀鲑气单胞菌生物膜对食品工业的危害, 采用合理的方法抑制杀鲑气单胞菌生物膜的生长成为目前食品行业的亟待解决的问题。

绿原酸是一种多酚物质, 广泛存在于果树的绿叶、水果以及蔬菜中, 具有很强的抑菌和抗病毒能力<sup>[7,8]</sup>。苏萌萌等<sup>[9]</sup>研究发现绿原酸对荧光假单胞菌和腐生型葡萄球菌的最小抑菌质量浓度、最小杀菌质量浓度为 5 mg/mL。刘冬梅等<sup>[10]</sup>报道了杀菌肽 LL-37 联合绿原酸可以有效的抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成。慈颖等<sup>[11]</sup>研究了一种由槐果碱、绿原酸、金银花提取物等配制而成的植物消毒剂, 研究发现该种消毒剂可显著控制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的生长 ( $p < 0.05$ )。因此, 绿原酸对于食品工业具有较高的应用潜力。

近年来, 关于超声杀菌在食品工业中的应用受到了广泛的关注。但当单独使用超声灭菌时灭菌效果并不明显, 即使使用较高频率的超声也难以达到理想的灭菌效果<sup>[12]</sup>。因此, 许多研究人员研究了超声协同杀菌技术在食品工业中的应用, 既能保证有效的杀菌效果, 又能保证食品的感官品质不遭受破坏。Cichoski 等<sup>[13]</sup>研究发现超声联合酸性电解水可有效控制鸡肉中致肠杆菌、中温菌、乳酸菌和嗜冷细菌的活菌数。Seo 等<sup>[14]</sup>研究发现超声联合乙醇处理, 可有效控制鸡皮肤上的鼠伤寒沙门氏菌的数量。Yoon 等<sup>[15]</sup>研究发现超声联合有机酸和乳酸链球菌肽处理 20~30 min, 可使得牡蛎菇上的单核细胞增生李斯特氏菌的数量降低到检测水平以下。然而, 关于超声联合绿原酸联合处理对生物膜的影响机理以及该技术在食品工业中的应用还未见报道。因此, 本实验主要研究超声联合绿原酸处理对杀鲑气单胞菌生物膜的杀菌作用, 并进一步研究这种联合杀菌方式的抗生物膜机制, 为其在鸡

肉保鲜中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 由本实验室从鲜肉中分离并保存。

BHI脑心浸液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI), BHI脑心浸液固体培养基 (brain heart infusion agar, BHI), 青岛海博生物科技有限公司; 绿原酸, 陕西慧科植物开发有限公司; 增强型ATP检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

Ultra View VOX 转盘式激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM), 美国珀金埃尔默股份有限公司; EVO-LS10 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM), 德国卡尔蔡司股份公司; KQ-800KD 超声清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; UV-6100 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 酶标仪, 美国BioTek Instruments有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株及培养

每次实验前, 将保存在-80 °C 冰箱中的杀鲑气单胞菌菌液取出, 解冻后按照 1:100 的比例接种于 BHI 脑心浸液肉汤中, 并在 28 °C 条件下振荡培养至对数期 (12 h)。然后将对数期的菌液按照 1:100 的比例再次接种于 BHI 脑心浸液肉汤中, 28 °C 条件下振荡培养至对数期 (12 h), 4 °C 条件下保存备用<sup>[16,17]</sup>。

#### 1.3.2 绿原酸的制备及超声设备

将绿原酸粉末溶解于无菌去离子水中, 制备成浓度为 0.5%、1% 和 2% (*m/V*) 绿原酸溶液。此外, 超声功率设置为 400 W (频率 50 kHz)。所有的实验分为四组: 对照组, 超声单独处理组 (US), 绿原酸单独处理组 (0.5% CA、1% CA 和 2% CA), 超声联合绿原酸处理组 (US+0.5% CA、US+1% CA 和 US+2% CA)。

#### 1.3.3 杀鲑气单胞菌生物膜的培养及灭菌处理

将对数期的杀鲑气单胞菌液按照 1% 的接种量接

种于BHI脑心浸液肉汤中,然后按照每孔1 mL规格加入到24孔聚氯乙烯培养板中,共培养3 d,每天需要更换一次培养基。培养3 d后,将培养基吸出,并用0.01 mol/L无菌PBS缓冲液洗涤杀鲑气单胞菌生物膜三次。对照组和超声单独处理组的生物膜中加入1 mL 0.01 mol/L无菌PBS缓冲液的生理盐水,绿原酸单独处理组和超声联合绿原酸处理组的生物膜中加入1 mL浓度为0.5%、1%和2%的绿原酸溶液。所有处理组均设置三个平行样本,杀菌时间设置为5、10、20、30、60 min<sup>[18,19]</sup>。

### 1.3.4 菌落计数

将处理组与未处理组的杀鲑气单胞菌生物膜1 mL加入到9.0 mL 0.1 mol/L 无菌 PBS 缓冲液中,终止反应。然后将溶液混匀,采用0.85%的生理盐水进行十倍梯度稀释,最后选取合适的稀释浓度1 mL加入到平板中,然后加入温度约为47 °C的BHI固体培养基15~18 mL。待培养基凝固后,将平板放入28 °C培养箱,培养24 h,然后选取菌落数在30~300之间的平板进行菌落计数<sup>[19,20]</sup>。

### 1.3.5 生物膜胞外多糖含量

杀鲑气单胞菌生物膜可溶性多糖与不可溶性多糖含量的测定根据Liu等<sup>[21]</sup>和Dubois等<sup>[22]</sup>描述的方法进行,并稍作修改。生物膜的培养和处理方法参考1.3.3,将经US、0.5% CA、1% CA、2% CA、US+0.5% CA、US+1% CA和US+2% CA处理30 min后杀鲑气单胞菌生物膜收集至离心管中,离心(4 °C, 6000 r/min, 30 min)后收集上清液用于测定可溶性多糖的含量,沉淀用于测定不可溶性多糖的含量。将离心后的上清液1 mL与0.5 mL 0.9%苯酚,以及5 mL的浓硫酸混合,然后置于100 °C水浴中反应15 min,冷却后测量490 nm处吸光值,然后对比标准曲线测定出可溶性多糖的浓度。此外,离心后的菌泥重悬于0.85%的生理盐水(含0.22%的甲醛)中,并置于80 °C水浴中反应30 min,然后离心(4 °C, 12000 r/min, 30 min)取上清用于测定不可溶性多糖,操作步骤参考可溶性多糖的操作步骤。

### 1.3.6 细胞膜通透性与完整性分析

#### 1.3.6.1 扫描电子显微镜(SEM)

扫描电子显微镜(SEM)用于观察超声,绿原酸,超声联合绿原酸处理对杀鲑气单胞菌生物膜细胞的菌体形态结构的影响。生物膜的培养方法同1.3.3。将杀鲑气单胞菌生物膜用US、2% CA和US+2% CA处理30 min后,吸出抑菌剂,并用0.1 mol/L 无菌 PBS 缓冲液洗涤三次后在室温下晾干,然后将生物膜细胞用2.5% (V/V) 戊二醛在4 °C条件下固定12 h。最后,

经连续脱水和喷金处理后用EVO-LS10扫描电子显微镜观察生物膜细胞形态结构<sup>[21]</sup>。

#### 1.3.6.2 激光共聚焦电镜(CLSM)

激光共聚焦电镜(CLSM)用于分析不同处理对杀鲑气单胞菌生物膜细胞的细胞膜的通透性和完整性的影响。将约为7 logCFU/mL的杀鲑气单胞菌400  $\mu$ L添加到8孔Nunc™ Lab-Tek™ 8孔腔室载玻片中培养3 d,每天需要更换一次培养基,然后将培养基吸出,并用0.01 mol/L无菌PBS缓冲液洗涤三次。将杀鲑气单胞菌生物膜用US、2% CA和US+2% CA处理30 min,晾干后用LIVE/DEAD Bac Light™试剂盒染色30 min。染色结束后,将染色剂吸出并用2.5% (V/V) 戊二醛在室温下固定30 min,然后去除隔板,并将适量的BacLight™ Mounting Oil滴加到生物膜的表面<sup>[19]</sup>。

#### 1.3.6.3 胞外ATP与核酸浓度

生物膜的培养和处理方法参考1.3.3。将经US、0.5% CA、1% CA、2% CA、US+0.5% CA、US+1% CA和US+2% CA处理30 min后的杀鲑气单胞菌生物膜收集至离心管中,离心(4 °C, 3000 r/min, 10 min)后取上清液用UV-VIS紫外分光光度计测量其在260 nm处的吸光值来表示核酸的释放浓度。胞外ATP的浓度,测定方法根据碧云天增强型ATP试剂盒上的操作步骤来进行操作<sup>[19,20]</sup>。

#### 1.3.7 呼吸链脱氢酶活性

参考林祎等<sup>[23]</sup>的方法,采用三苯基四氯唑(TTC)试验来测定超声,绿原酸,以及超声联合绿原酸处理对杀鲑气单胞菌生物膜细胞呼吸链脱氢酶的活性的影响。将经US、0.5% CA、1% CA、2% CA、US+0.5% CA、US+1% CA和US+2% CA处理30 min后杀鲑气单胞菌生物膜1 mL与2 mL浓度为0.05 mol/L HCl缓冲液(pH=8.6),2 mL浓度为0.1 mol/L葡萄糖溶液,2 mL浓度为1 mg/mL TTC溶液混匀,然后在37 °C条件下反应5 h。最后,将溶液与5 mL的油醚混匀后萃取1 h,然后测定有机相在490 nm处的吸光值。

## 1.4 数据统计与分析

采用SPSS 26.0对所有数据进行显著性分析, $p < 0.05$ 为差异显著,并采用Origin 2019软件进行作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 超声联合绿原酸处理对杀鲑气单胞菌生物膜细胞的杀菌结果

表 1 不同处理对杀鲑气单胞菌生物膜的杀菌效果

Table 1 Inactivation of *A. salmonicida* biofilm cells by different treatments

处理方式	杀鲑气单胞菌生物膜内活菌残留数/(log CFU/mL)				
	5	10	20	30	60
对照	8.94±0.04 <sup>A</sup>	8.86±0.05 <sup>A</sup>	8.88±0.04 <sup>A</sup>	8.87±0.04 <sup>A</sup>	8.82±0.02 <sup>A</sup>
US	8.83±0.06 <sup>B</sup>	8.74±0.02 <sup>A</sup>	8.70±0.03 <sup>B</sup>	8.67±0.02 <sup>B</sup>	8.59±0.05 <sup>B</sup>
0.5% CA	8.51±0.05 <sup>C</sup>	8.27±0.09 <sup>B</sup>	7.67±0.01 <sup>C</sup>	7.21±0.06 <sup>C</sup>	6.43±0.30 <sup>C</sup>
1% CA	8.43±0.03 <sup>C</sup>	8.16±0.02 <sup>B</sup>	6.96±0.07 <sup>E</sup>	6.10±0.13 <sup>D</sup>	3.00±0.07 <sup>E</sup>
2% CA	7.75±0.03 <sup>E</sup>	7.25±0.06 <sup>C</sup>	3.12±0.07 <sup>G</sup>	2.89±0.10 <sup>E</sup>	≤1.4
US+0.5% CA	8.17±0.07 <sup>D</sup>	7.21±0.15 <sup>C</sup>	7.09±0.05 <sup>D</sup>	6.08±0.10 <sup>D</sup>	5.02±0.08 <sup>D</sup>
US+1% CA	7.58±0.07 <sup>F</sup>	6.93±0.06 <sup>D</sup>	4.75±0.11 <sup>F</sup>	2.92±0.08 <sup>E</sup>	≤1.4
US+2% CA	7.54±0.13 <sup>F</sup>	6.19±0.08 <sup>E</sup>	2.95±0.14 <sup>G</sup>	≤1.4	-

注: US: 超声单独处理组; CA: 绿原酸单独处理组; US+CA: 超声联合绿原酸处理组; 右肩不同的大写字母表示同列差异显著; ≤1.4 表示无法检测水平。

从表 1 可知, 杀鲑气单胞菌生物膜细胞的初始菌数约为 9 log CFU/mL, US 单独处理 30 min, 仅仅使得杀鲑气单胞菌生物膜细胞的活菌数降低了 0.2 log CFU/mL, 而 0.5% CA、1% CA 和 2% CA 单独处理 30 min, 可使得杀鲑气单胞菌生物膜的活菌数分别降低 1.66、2.87 和 5.98 log CFU/mL, 这说明与超声单独处理相比绿原酸可以有效的的灭活杀鲑气单胞菌生物膜的活菌数, 相同处理时间, 即使较低浓度的绿原酸也比超声单独处理的杀菌效果要好的多 ( $p < 0.05$ )。此外, US+0.5% CA、US+1% CA 和 US+2% CA 处理 30 min, 可使得杀鲑气单胞菌生物膜的活菌数分别降低 2.79、5.95 和 9 log CFU/mL。这说明与单独处理相比, 超声联合绿原酸处理具有明显的协同杀菌作用, 联合处理的杀菌值明显大于二者单独处理的杀菌值之和 ( $p < 0.05$ )。此外, 超声联合较低浓度的绿原酸的杀菌效果可以达到较高浓度的绿原酸单独处理的杀菌效果。这种协同效应主要归因于超声可以破坏细菌的细胞膜, 这可以促进抑菌剂更好的进入细胞, 从而达到迅速杀死细菌的目的<sup>[24]</sup>。这与 Guo 等<sup>[25]</sup>研究结果一致, 超声联合 30 mg/L 的次氯酸钠处理大肠杆菌 30 min, 可以达到 50 mg/L 的次氯酸钠单独处理的杀菌效果。这表明, 低浓度的抑菌剂联合超声处理的杀菌效果可以达到高浓度的抑菌剂单独处理的杀菌效果。此外, Li 等<sup>[26]</sup>研究发现超声和热处理具有明显的协同作用, 超声功率为 600 W 处理 7 min, 仅仅使得金黄色葡萄球菌的活菌数降低了 0.13 log CFU/mL, 55 °C 中温热处理可使得金黄色葡萄球菌的活菌数降低 0.97 log CFU/mL, 而超声联合热处理可使得金黄色葡萄球菌的活菌数降低 3.58 log CFU/mL。王振帅等<sup>[27]</sup>研究发现超声联合微波处理可显著降低火龙果上的微生物的菌落总数, 且不会对火龙果的感官形态以及营养成分产生

影响。Yu 等<sup>[24]</sup>研究发现超声联合二氧化氯对金黄色葡萄球菌生物膜的灭活具有明显的协同作用, 当超声 (20 kHz、60 W) 联合 4 mg/L 的二氧化氯处理 10 min, 可使得金黄色葡萄球菌生物膜中的活菌数减少 99.03%。

## 2.2 生物膜胞外多糖含量分析

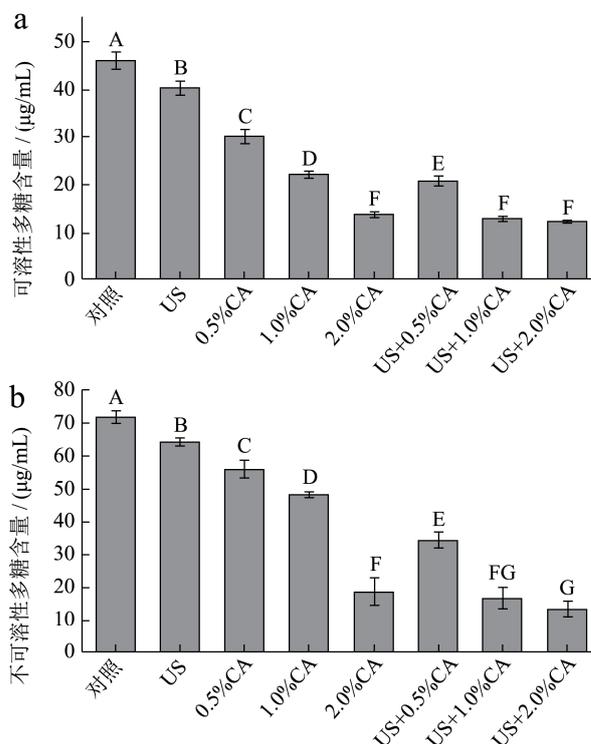


图 1 不同处理后杀鲑气单胞菌生物膜的可溶性多糖(a)与不可溶性多糖(b)含量

Fig.1 The soluble (a) and insoluble (b) polysaccharide contents in *A. salmonicida* biofilms after different treatments

注: US: 超声单独处理组; CA: 绿原酸单独处理组; US+CA: 超声联合绿原酸处理组; 数据组间不同的大写字母表示同列差异显著 ( $p < 0.05$ )。图 4、5 同。

胞外多糖是生物膜结构的主要组成成分, 测量生物膜胞外多糖含量的变化可以反映出生物膜结构的变化<sup>[28]</sup>。如图 1 所示, 未处理的杀鲑气单胞菌生物膜胞外可溶性多糖与不可溶性多糖含量分别为 46.14 和 71.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。US、1% CA 和 US+1% CA 处理 30 min 后, 杀鲑气单胞菌生物膜胞外可溶性多糖与不可溶性多糖含量分别为 40.44、22.18、13.01、64.30、48.25 和 16.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这表明超声、绿原酸、超声联合绿原酸处理均显著降低了杀鲑气单胞菌生物膜胞外可溶性多糖与不可溶性多糖含量 ( $p<0.05$ )。但是, 与单一处理相比, 超声与绿原酸联合处理可以显著降低生物膜胞外多糖的含量 ( $p<0.05$ )。这主要归因于超声可以破坏生物膜外层基质, 这可以促进绿原酸进入细胞内部, 从而达到协同杀菌的目的<sup>[21]</sup>。Liu 等<sup>[21]</sup>研究发现酸性电解水联合苯乳酸处理可显著降低生物膜胞外可溶性多糖与不可溶性多糖的含量, 这主要归因于酸性电解水可以迅速破坏生物膜胞外基质, 这可以促进酸性电解水和苯乳酸可以迅速的进入生物膜, 从而导致生物膜胞外多糖的显著性地降低 ( $p<0.05$ )。

### 2.3 细胞膜通透性与完整性分析

#### 2.3.1 扫描电子显微镜 (SEM) 结果

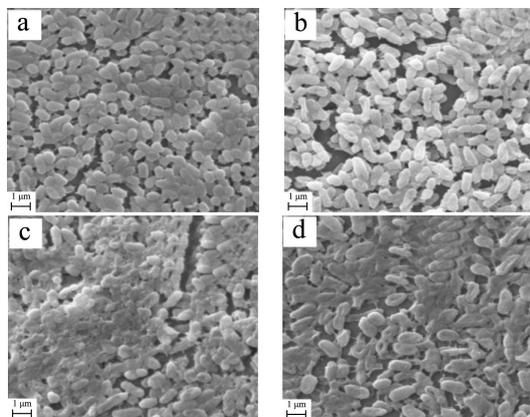


图 2 不同处理后杀鲑气单胞菌生物膜的扫描电镜结果

Fig.2 SEM images of different treatments on *A. salmonicida* biofilm cells

注: a: 对照; b: US, 超声单独处理组; c: 2% CA, 浓度为 2% 的绿原酸单独处理组; d: US+2% CA, 超声联合浓度为 2% 的绿原酸处理组。图 3 同。

图 2 显示了杀鲑气单胞菌生物膜经不同处理后的菌体形态结构变化。由图 2a 所示, 未经任何处理的杀鲑气单胞菌生物膜的菌体形态呈完整的杆状且细菌表面比较光滑, 无任何孔隙。US 单独处理 30 min 后, 细胞的表面开始出现孔隙和轻微的变形, 但细胞依然具有完整的细胞形态(图 2b)。经过 2% CA 处理 30 min 后, 由于 ATP 和大分子等物质的泄露导致生物膜细胞

开始粘连在一起, 细胞表面出现大量的褶皱, 细胞开始出现破裂<sup>[29]</sup>(图 2c)。如图 2d, US+2% CA 处理 30 min 后, 生物膜的胞外基质遭到破坏, 开始出现瓦解现象, 杀鲑气单胞菌生物膜细胞开始出现变形, (图 2d)。He 等<sup>[20]</sup>研究发现, 超声单独处理可破坏大肠杆菌的形态结构, 处理后的细胞表面开始出现孔隙, 从而导致大分子物质的泄露。宁亚维等<sup>[30]</sup>研究发现经苯乳酸与醋酸联合处理后的大肠杆菌, 细胞形态结构遭到严重破坏, 内容物大量泄露从而导致细胞粘连在一起。

#### 2.3.2 激光共聚焦电镜 (CLSM) 结果

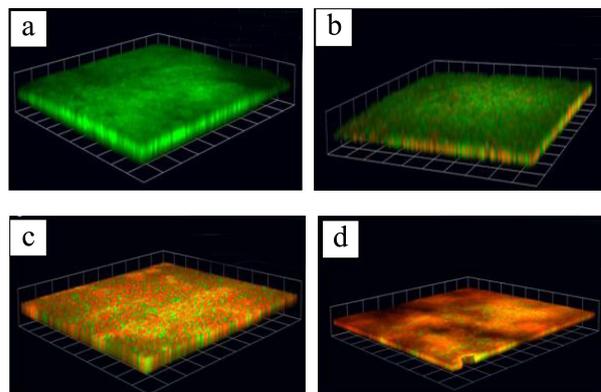


图 3 不同处理后杀鲑气单胞菌生物膜在 CLSM 下的形态变化

Fig.3 CLSM images of different treatments on *A. salmonicida* biofilm cells

分别用两种核酸荧光探针 cFDA 和 PI 对杀鲑气单胞菌生物膜进行染色。完整的细胞被 cFDA 探针染成绿色, 破损的细胞则被 PI 探针染成红色<sup>[29]</sup>。如图 3a, 未经任何处理杀鲑气单胞菌生物膜细胞的全被染成绿色荧光, 这表明所有的细胞具有完整的细胞膜, 并且细胞膜的通透性未发生改变。经 US 单独处理 30 min 后, 极少部分的生物膜细胞被染成了红色荧光, 这表明超声单独处理对生物膜细胞的细胞膜的完整性和通透性影响比较小(图 3b)。经 2% CA 单独处理 30 min 后, 生物膜被染成红色荧光的比例比较高, 绿色荧光的比例相对较低, 这表明与超声单独处理相比, 绿原酸对杀鲑气单胞菌生物膜细胞的细胞膜的损伤比较明显(图 3c)。此外, 超声联合绿原酸处理后生物膜细胞几乎全被染成了红色, 这表明联合处理组可显著破坏生物膜细胞的细胞膜的完整性以及引起细胞膜通透性的急剧增加(图 3d)。宁亚维等<sup>[29]</sup>研究发现苯乳酸与醋酸联用可显著破坏单核细胞增生李斯特氏菌细胞膜的完整性, 经二者联合处理后的细胞被染成红色荧光比例明显高于单一处理组。Guo 等<sup>[31]</sup>研究发现超声联合百里香精油纳米乳液可以迅速破坏大肠杆菌细胞膜的完整性和引起细胞膜的通透性急剧增加。

### 2.3.3 胞外 ATP 与核酸的浓度分析

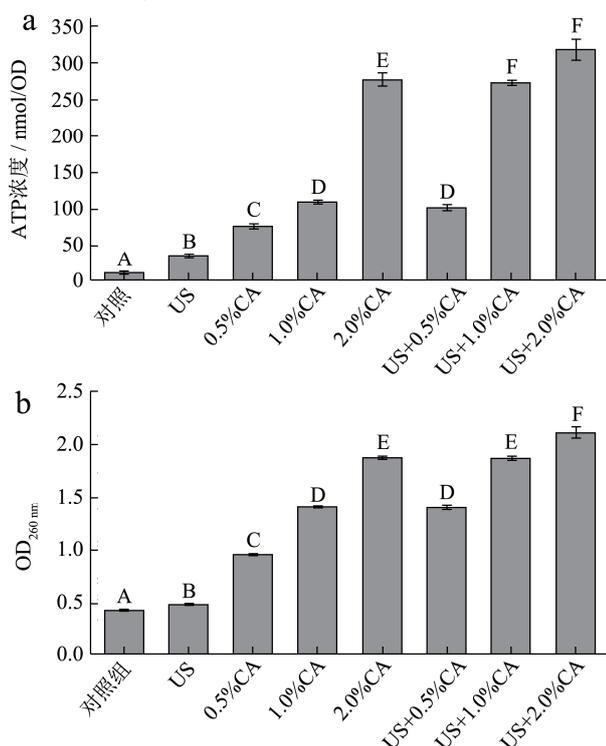


图4 不同处理后杀鲑气单胞菌生物膜的胞外 ATP 与核酸的浓度

Fig.4 The release of ATP and nucleic acids in *A. salmonicida* biofilm cells after different treatments

从图4可以看出,对照组的杀鲑气单胞菌生物膜的胞外 ATP 浓度为 12.75 nmol/OD,经 US、1% CA 和 US+1% CA 处理 30 min 后,杀鲑气单胞菌生物膜胞外 ATP 的浓度变为 35.88、105.76 和 273.35 nmol/OD。此外,对照组的杀鲑气单胞菌生物膜 OD<sub>260nm</sub> 处的吸光值为 0.43,经 US、1% CA 和 US+1% CA 处理 30 min 后,杀鲑气单胞菌物膜 OD<sub>260nm</sub> 处的吸光值分别为 0.49、1.41 和 1.87。这表明,与对照组相比,超声,绿原酸,超声联合绿原酸处理均可以使得杀鲑气单胞菌生物膜胞外 ATP 和核酸的浓度显著增加 ( $p<0.05$ ),且超声联合绿原酸处理后的生物膜胞外 ATP 和核酸浓度明显高于单一处理组。这主要是因为超声可以破坏细菌的细胞膜,这可以促进绿原酸更好的进入细胞,从而使得杀鲑气单胞菌生物膜细胞的细胞膜的完整性受到严重的破坏以及导致细胞膜通透性急剧增加,从而导致胞内 ATP 和核酸释放到细胞外<sup>[21]</sup>。因此超声联合绿原酸处理组的 ATP 和核酸浓度明显高于单一处理组。这与 Guo 等<sup>[31]</sup>研究超声联合百里香精油纳米乳液相似,超声联合百里香精油纳米乳液可以迅速破坏大肠杆菌的细胞膜,引起细胞膜的通透性发生改变,从而导致细胞内大分子物质的泄露量增加。此外,周倩倩等<sup>[32]</sup>报道了丁香酚处理后的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌,核酸和蛋白浓度释放量显著

增加。

### 2.4 呼吸链脱氢酶活性分析

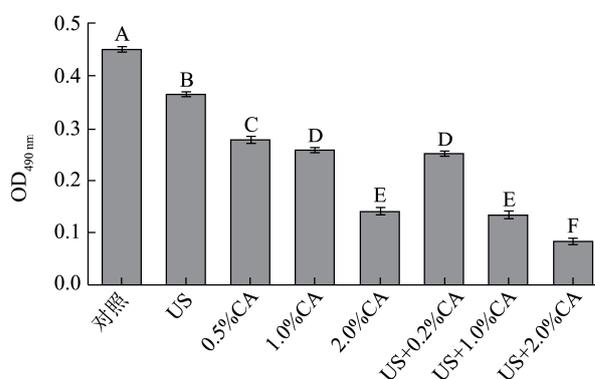


图5 不同处理后杀鲑气单胞菌生物膜的呼吸链脱氢酶活性

Fig.5 The activity of RCD in *A. salmonicida* biofilms after different treatments

图5显示了不同处理后杀鲑气单胞菌生物膜细胞呼吸链脱氢酶的活性的变化。未经任何处理的杀鲑气单胞菌生物膜细胞在 490 nm 处的吸光值为 0.449,经 US、1% CA、US+1% CA、2% CA 处理 30 min 后,杀鲑气单胞菌生物膜细胞在 490 nm 处的吸光值分别为 0.366、0.256、0.134 和 0.141。这表明,与对照组相比,三种杀菌方式均能使杀鲑气单胞菌生物膜内呼吸链脱氢酶活性显著降低 ( $p<0.05$ )。且相同的处理时间,超声联合绿原酸处理后的生物膜呼吸链脱氢酶活性下降的最多。这进一步表明超声联合绿原酸处理具有明显的协同作用,它可以显著降低杀鲑气单胞菌生物膜细胞呼吸链脱氢酶的活性。这与林祎等<sup>[23]</sup>研究的结果一致,热处理,以及超声联合热处理可使得沙门氏菌细胞内呼吸链脱氢酶的活性分别降低 36.59%和 70.19%。这表明与单独处理相比,联合处理能明显降低菌体内呼吸链脱氢酶的活性。

### 3 结论

本文研究了超声联合绿原酸处理对杀鲑气单胞菌生物膜的联合杀菌作用。结果发现,超声联合绿原酸处理具有明显的协同杀菌作用。经二者联合处理后,杀鲑气单胞菌生物膜胞外可溶性多糖与不可溶性多糖含量显著降低,生物膜细胞的形态结构以及细胞膜完整性遭到严重的破坏,细胞膜通透性急剧增加,核酸和 ATP 等大分子物质的泄露量显著增加,生物膜细胞内呼吸链脱氢酶活性显著降低 ( $p<0.05$ )。因此,超声联合绿原酸处理主要通过降低生物膜胞外多糖的含量,破坏生物膜细胞的细胞膜完整性,引起生物膜细胞的细胞膜通透性的增加,从而导致大分子物质泄露和呼吸链脱氢酶活性降低来发挥协同杀菌作用。

## 参考文献

- [1] 刁菁,李乐,王晓璐,等.纳米锌对杀鲑气单胞菌的灭活效果及其细胞毒性[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2019,49(3):146-154  
DIAO Jing, LI Le, WANG Xiaolu, et al. Bacteriociding effectiveness of nanometer zinc to *Aeromonas salmonicida* and its cytotoxicity [J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(3): 146-154
- [2] 蔡教英,王小玉,姚丽锋,等.冰鲜鸽肉贮藏过程中的微生物菌群多样性[J].肉类研究,2018,32(9):41-46  
CAI Jiaoying, WANG Xiaoyu, YAO Lifeng, et al. Diversity of microbial flora of chilled pigeon meat during storage [J]. Meat Research, 2018, 32(9): 41-46
- [3] 胡骞,胡瑞雪,金玉立,等.克氏原螯虾源维氏气单胞菌的分离鉴定及组织病理学观察[J].水生生物学报,2020,44(4):811-817  
HU Qian, HU Ruixue, JIN Yuli, et al. Isolation, identification and pathohistological observation of *Aeromonas veronii* from *Procambarus clarkii* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 811-817
- [4] 毕伟伟,冯立芳,石双妮,等.波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌致病性及 TorA 还原酶差异比较[J].水产学报,2020,44(3):495-504  
BI Weiwei, FENG Lifang, SHI Shuangni, et al. Comparison of spoilage potential and TorA protein between *Shewanella baltica* and *Aeromonas salmonicida* [J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(3): 495-504
- [5] Liu L, Yan Y P, Feng L F, et al. Quorum sensing asal mutants affect spoilage phenotypes, motility, and biofilm formation in a marine fish isolate of *Aeromonas salmonicida* [J]. Food Microbiology, 2018, 76: 40-51
- [6] Dias C, Borges A, Saavedra M J, et al. Biofilm formation and multidrug resistant *Aeromonas* spp. from wild animals [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2018, 12: 227-234
- [7] Zhang D F, Bi W, Kai K, et al. Effect of chlorogenic acid on controlling kiwifruit postharvest decay caused by *Diaporthe* sp [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 132: 109805
- [8] Li Y, Yang D, Jia Y, et al. Research note: anti-inflammatory effects and antiviral activities of baicalein and chlorogenic acid against infectious bursal disease virus in embryonic eggs [J]. Poultry Science, 2021, 100(4): 100987
- [9] 苏萌萌,孙芝兰,刘芳,等.绿原酸对鸡肉腐败菌的抑菌机理[J].江苏农业学报,2018,34(6):1386-1391  
SU Mengmeng, SUN Zhilan, LIU Fang, et al. Antimicrobial mechanism of chlorogenic acid against chicken spoilage bacteria [J]. Jiangsu J of AgrSci, 2018, 34(6): 1386-1391
- [10] 刘冬梅,孔晋亮,罗劲,等.人杀菌肽 LL-37 联合绿原酸对铜绿假单胞菌生物被膜的体外作用[J].中国现代医药,2020,22(10):1-4  
LIU Dongmei, KONG Jinliang, LUO Jing, et al. *In vitro* effect of human bactericidal peptide LL-37 combined with chlorogenic acid on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. Modern Medicine Journal of China, 2020, 22(10): 1-4
- [11] 慈颖,郭美荣,杨燕,等.新型复方植物消毒剂杀菌效果及稳定性评价[J].中国国境卫生检疫杂志,2020,43(5):311-313  
CI Ying, GUO Meirong, YANG Yan, et al. Evaluation of sterilization effect and stability of a novel herbal compound disinfectant [J]. Chinese Frontier Health Quarantine, 2020, 43(5): 311-313
- [12] 孙晋跃,孙芝兰,吴海虹,等.非热杀菌技术在低温鸡肉制品致病菌控制中的应用研究进展[J].肉类研究,2020,34(8):84-90  
SUN Jinyue, SUN Zhilan, WU Haihong, et al. Advances in application of non-thermal sterilization technologies to control pathogens in low temperature chicken products [J]. Meat Research, 2020, 34(8): 84-90
- [13] Cichoski A J, Flores D, Menezes C, et al. Ultrasound and slightly acid electrolyzed water application: an efficient combination to reduce the bacterial counts of chicken breast during pre-chilling [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 301: 27-33
- [14] Seo M K, Jeong H L, Han S H, et al. Impact of ethanol and ultrasound treatment on mesophilic aerobic bacteria, coliforms, and *Salmonella Typhimurium* on chicken skin [J]. Poultry Science, 2019, 98(12): 6954-6963
- [15] Yoon J H, Do-young J, Su-bin L, et al. Decontamination of *Listeria monocytogenes* in king oyster mushrooms (*Pleurotus eryngii*) by combined treatments with organic acids, nisin, and ultrasound [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 144: 111207
- [16] 王凤婷,孙芝兰,吴海虹,等.乳酸对阴沟肠杆菌的抑菌作用及其机制分析[J].食品科学,2018,39(6):95-100  
WANG Fengting, SUN Zhilan, WU haihong, et al. Antimicrobial activity and mechanism of lactic acid on *Enterobacter cloacae* [J]. Food Science, 2018, 39(6): 95-100
- [17] 刘亚文,靳盼盼,许晓曦,等.乳酸对阴沟肠杆菌生物膜形成的抑制作用[J].食品科学,2020,41(7):1-7

- LIU Yawen, JIN Panpan, XU Xiaoxi, et al. Inhibitory effect of lactic acid on biofilm formation of *Enterobacter cloacae* [J]. Food Science, 2020, 41(7): 1-7
- [18] 蔡林林,胡海静,衣晓坤,等.酸性电解水对肉源性荧光假单胞菌的致死效应[J].中国农业科学,2019,52(9):1614-1623  
CAI Linlin, HU Haijing, YI Xiaokun, et al. Lethal effect of meat-borne *Pseudomonas fluorescens* to acidic electrolyzed water [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(9): 1614-1623
- [19] Liu F, Wang F T, Du L H, et al. Antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid against *Enterobacter cloacae* [J]. Food Control, 2018, 84: 442-448
- [20] He Q, Liu D H, Ashokkumar M, et al. Antibacterial mechanism of ultrasound against *Escherichia coli*: alterations in membrane microstructures and properties [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 73(1): 105509
- [21] Liu F, Tang C, Wang D B, et al. The synergistic effects of phenyllactic acid and slightly acid electrolyzed water to effectively inactivate *Klebsiella oxytoca* planktonic and biofilm cells [J]. Food Control, 2020, 20: 107804
- [22] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356
- [23] 林祎.声热复合处理对液态乳中致病菌的杀菌效果与理化特性影响研究[D].杭州:浙江大学,2018:36-37  
LIN yi. Effect of thermo-sonication treatment on pathogenesis inactivation and physicochemical properties of liquid milk [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018: 36-37
- [24] Yu H, Liu Y, Yang F W, et al. Synergistic efficacy of high-intensity ultrasound and chlorine dioxide combination for *Staphylococcus aureus* biofilm control [J]. Food Control, 2021, 122: 107822
- [25] Guo L P, Sun Y C, Zhu Y L, et al. The antibacterial mechanism of ultrasound in combination with sodium hypochlorite in the control of *Escherichia coli* [J]. Food Research International, 2019, 129: 108887
- [26] Li J, Suo Y J, Liao X Y, et al. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 39: 101-110
- [27] 王振帅,曾秋烦,信思悦,等.超声联合杀菌对火龙果汁品质及抗氧化性的影响[J].食品与发酵工业,2019,45(5):157-163  
WANG Zhenshuai, ZENG Qiufan, XIN Siyue, et al. Effects of ultrasonic combined with sterilization on quality and antioxidant capacity of pitaya juice [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(5): 157-163
- [28] 汤纯.小龙虾细菌污染情况调查及控制技术研究[D].扬州:扬州大学,2020  
TANG Chun. Investigation on bacterial contamination of red swamp crayfish and its control technology [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020
- [29] 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 Yawei, FU Yunan, HE Jianzhuo, et al. Synergistic antibacterial mechanism of phenyllactic acid combined with acetic acid against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Science, 2020, 41(23): 70-76
- [30] 宁亚维,付浴男,何建卓,等.苯乳酸和醋酸联用对大肠杆菌的抑菌机理[J].食品科学,2021,42(3):77-84  
NING Yawei, FU Yunan, HE Jianzhuo, et al. Antibacterial mechanism of phenyllactic acid combined with acetic acid on *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2021, 42(3): 77-84
- [31] Guo M M, Zhang L J, He Q, et al. Synergistic antibacterial effects of ultrasound and thyme essential oils nanoemulsion against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 66: 104988
- [32] 周倩倩,方士元,梅俊,等.丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理[J].食品科学,2020,41(9):1-6  
ZHOU Qianqian, FANG Shiyuan, MEI Jun, et al. Inhibitory mechanism of eugenol on *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens* [J]. Food Science, 2020, 41(9): 1-6