

水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜及其毒力因子的影响

Effects of silymarin on *S. aureus* ATCC25923 biofilm and its virulence factors

王嘉康 唐浩国 陈 静 司启贺 申茹晓

WANG Jiakang TANG Haoguo CHEN Jing SI Qihe SHEN Ruxiao

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023)

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:目的:探究水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜及其毒力因子的影响。方法:采用结晶紫染色法检测水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜形成的抑制及清除作用,MTT 染色法探究水飞蓟素对其生物膜代谢的影响,冻干血浆和无菌脱纤维羊血探究水飞蓟素对其凝固酶表达和溶血活性的影响,同时用光学显微镜观察不同浓度水飞蓟素对其生物膜影响及傅里叶红外分析细菌成分变化。结果:水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 的最小抑菌质量浓度(MIC)为 0.5 mg/mL, MIC 浓度下的水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制率达到 90%,清除率达到 89.2%,且低剂量的水飞蓟素能够显著抑制其溶血活性和凝固酶的表达。结论:水飞蓟素对金黄色葡萄球菌的生物膜形成具有很好的抑制以及清除作用,同时能够显著抑制其毒力因子的表达。

关键词:水飞蓟素;金黄色葡萄球菌;生物膜;毒力因子

Abstract: Objective: In this study, the effects of silymarin on the biofilm *S. aureus* ATCC25923 and its virulence factors were investigated. **Methods:** The inhibition and clearance of silymarin on *S. aureus* ATCC25923 biofilm formation were detected by crystal violet staining, the effects of silymarin on its biofilm metabolism were investigated by MTT staining, and the effects of silymarin on its coagulase expression and hemolytic activity were investigated by freeze-dried plasma and aseptic defibrinated sheep blood. In parallel, the effects of different concentrations of silymarin on its biofilm and Fourier transform were observed under an optical microscope. **Results:** The results showed that the

minimum inhibitory concentration (MIC) of silymarin against *S. aureus* ATCC25923 was 0.5 mg/mL, the inhibition rate of silymarin to *S. aureus* ATCC25923 biofilm at MIC concentration reached 90%, and the clearance rate reached 89.2%, and the low dose of silymarin could significantly inhibit its hemolytic activity and coagulase expression. **Conclusion:** The outcomes of the experiment demonstrate the great potential applications of silymarin in the areas of natural preservatives and food safety.

Keywords: silymarin; *Staphylococcus aureus*; biofilm; virulence factor

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为一种常见的食源性致病菌,可引起人类和动物的感染和食物性中毒^[1]。随着抗生素的使用,多重耐药性金黄色葡萄球菌的传播正在以惊人的速度增加^[2]。金葡菌生物膜能够帮助细菌抵御宿主免疫系统,更容易产生耐药菌株,甚至多重耐药菌株,这些耐药菌株是导致慢性感染的主要病原,给人类和家畜的生命健康和食品安全造成极大的危害^[3]。

生物膜由细菌群落和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)构成,是细菌黏附于物体的表面,通过分泌多糖、蛋白质、糖蛋白、糖脂和细胞外 DNA(eDNA)等形成的高度组织化的膜样聚合物^[4-5],具有极强的黏附性和抗逆性,能够帮助细菌很好地适应周围的环境^[6]。自然环境中大多数细菌都能以生物膜的形式存在,生物膜能够黏附在宿主的组织表面,一旦组织细胞受损,致病菌能够不断释放毒素引发感染,并且可能进入机体内随血液流动播散,导致全身性感染^[7]。

苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸、山梨酸钾、丙酸钙等化学防腐剂虽能够有效抑制食源性致病菌的生长,但它同时也对人体健康和环境造成一定威胁。因此,植物源天然

作者简介:王嘉康,男,河南科技大学在读硕士研究生。

通信作者:唐浩国(1968—),男,河南科技大学教授,博士。

E-mail: tanghaoguo@126.com

收稿日期:2023-05-30 改回日期:2023-12-21

防腐剂的开发和应用成为当下研究的热点之一^[8-10]。水飞蓟素是从水飞蓟果实及种子中提取的一类二氢黄酮醇与苯丙素衍生物缩合而成的黄酮木脂素类成分,因其安全无毒、无刺激性且具有抗炎保肝、抗氧化等优点^[11-12],在食品保健^[13-15]、医药^[16]、化妆品^[17]等行业得到广泛应用。研究拟探究水飞蓟素对金黄色葡萄球菌生物膜的影响,以期为植物源活性物质的进一步利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

水飞蓟素:纯度 80%,西安云悦生物科技有限公司;

二甲基亚砜(DMSO)、结晶紫:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

胰酪大豆胨琼脂培养基、胰蛋白胨大豆肉汤培养基:北京奥博星生物技术有限责任公司;

脑心浸出液肉汤(BHI):青岛海博生物技术有限公司;

噻唑蓝(MTT):纯度 $\geq 98\%$,北京索莱宝科技有限公司;

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923, ATCC29213, ATCC6538):中国普通微生物菌种保藏管理中心;

紫外—可见分光光度计:UV2400 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

离心机:TDZ5-WS 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

真空冷冻干燥机:ALPHA 1-2 LD plus 型,德国 Christ 公司;

傅立叶变换中远红外光谱仪:IFS 125HR,德国 Bruker 公司;

多功能酶标仪:Infinite E Plex 型,上海 Tecan 实验器材有限公司。

1.2 最小抑菌质量浓度(MIC)的测定

采用 Fei 等^[18]的方法, MIC 为肉眼看不见细菌菌落生长的最低浓度,所有试验平行 3 次。

1.3 *S. aureus* ATCC25923 产膜能力鉴定

采用 Tremblay 等^[19]的方法,结晶紫染色生物膜后,使用酶标仪于 OD_{490 nm} 测 OD 值;判断标准:以 OD_{490 nm} < 0.11 为阴性株, 0.11 < OD_{490 nm} < 0.50 为弱产膜菌株, OD_{490 nm} > 1.50 为强产膜菌株。

1.4 结晶紫染色研究水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制及清除作用

1.4.1 对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制作用 将制备好的含有不同浓度水飞蓟素的菌悬液分别加入到 96 孔板中,每孔 200 μ L,以对应浓度的含有水飞蓟素的无菌

培养液作为阴性对照。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后用酶标仪测定 630 nm 处的吸光度。移除菌悬液, PBS 轻柔漂洗 3 次,在 60 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 20 min。在每个孔中加入 250 μ L 质量分数为 1% 的结晶紫溶液, 37 $^{\circ}$ C 下染色 5 min,用蒸馏水轻柔漂洗 3 次,在 60 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 20 min。加入 250 μ L 体积分数为 33% 的醋酸溶液溶解生物膜上结合的结晶紫染料, 5 min 后在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度,所有试验平行 3 次。相对生物膜形成能力以生物膜形成指数表示^[20],生物膜形成指数按式(1)计算。

$$B = (S - C_1) / (G - C_2), \quad (1)$$

式中:

B——生物膜形成指数;

S——染色后 OD_{570 nm} 值;

C₁——染色后空白对照 OD_{570 nm} 值;

G——培养后 OD_{630 nm} 值;

C₂——培养后空白对照 OD_{630 nm} 值。

1.4.2 对 *S. aureus* ATCC25923 成熟生物膜的清除作用 于 96 孔板上每孔加入 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液 200 μ L,静置培养 24 h 形成成熟生物膜后弃去培养液,注入新的培养液与不同浓度的水飞蓟素药液。阴性对照组依旧使用培养液进行处理。37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h 后, PBS 洗去浮菌,使用结晶紫定量染色法观察生物膜的剩余量,所有试验平行 3 次。按式(2)计算生物膜清除率^[21]。

$$B = \left(1 - \frac{C_1}{C_2}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

B——生物膜清除率, %;

c₁——各处理组 OD_{570 nm} 值;

c₂——对照组 OD_{570 nm} 值。

1.5 MTT 染色法检测水飞蓟素对生物膜代谢的影响

参照 Jadhav 等^[22]的方法,使用 MTT 染色法检测水飞蓟素对生物膜代谢的影响。所有试验平行 3 次。

1.6 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 毒力因子的影响

1.6.1 对 *S. aureus* ATCC25923 溶血活性的影响 参照徐云凤^{[23]37-41}的方法测定水飞蓟素对金黄色葡萄球菌溶血活性的影响。溶剂组为阳性对照,无菌液组为阴性对照,所有试验平行 3 次。

1.6.2 对 *S. aureus* ATCC25923 凝固酶效价的影响 参照徐云凤^{[23]37-41}的方法测定水飞蓟素对金黄色葡萄球菌凝固酶效价的影响。使用冻干血浆测定细菌凝固酶效价, 6 h 内间隔 0.5 h 观察一次结果,若出现凝固现象,即为阳性,否则为阴性。所有试验平行 3 次。

1.7 光学显微镜观察水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的影响

取不同浓度水飞蓟素处理的菌悬液 1 mL 加入 6 孔

板中,同时放入已灭菌的盖玻片,置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h。采用结晶紫染色法在光学显微镜下观察水飞蓟素对生物膜的影响。所有试验平行 3 次。

1.8 傅里叶红外光谱分析

参照 Padmavathi 等^[24]的方法并稍作修改,采用傅里叶红外光谱法(fourier transform infrared spectrometry, FT-IR)对水飞蓟素处理的金黄色葡萄球菌成分变化进行测定。

1.9 数据处理

所有试验重复 3 次,试验结果使用 SPSS 19.0 统计软件分析和处理数据,采用 Tukey 法进行差异显著性检验, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 产膜能力的鉴定

结晶紫染色后, *S. aureus* ATCC25923 生物膜在 490 nm 处的 OD 值为 1.704 ± 0.133 , 大于 1.5, 根据 Tremblay 等^[19]的判断标准,试验采用的菌株为高产膜菌株。

2.2 MIC 的测定

如表 1 所示,对照组均有菌落生长,但在水飞蓟素质量浓度为 0.5 ~ 1.0 mg/mL 的培养基上, *S. aureus* ATCC25923 均无菌落生长,证明水飞蓟素对 ATCC25923 的 MIC 为 0.5 mg/mL。与二氢杨梅素(MIC 为 1.25 mg/mL)和藤茶提取物(MIC 为 6.3 mg/mL)以及大蒜水提物(MIC 为 24.0 mg/mL)对金黄色葡萄球菌的抑菌活性相比^[25-26],水飞蓟素的抑菌能力具有明显优势。

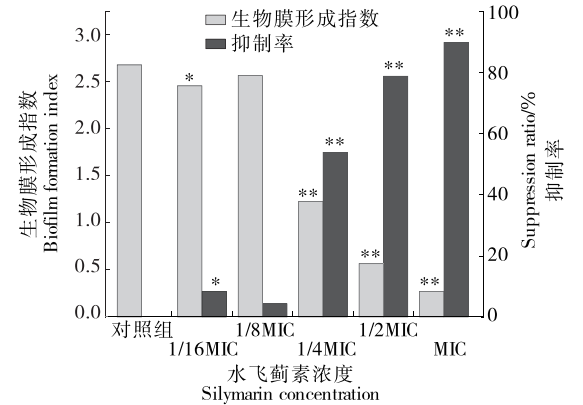
2.3 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制及清除作用

2.3.1 对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制作用 采用结晶紫染色法,使用多功能酶标仪检测水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制作用,结果如图 1 所示。

表 1 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 的最小抑菌浓度[†]
Table 1 Minimum inhibitory concentration of silymarin to *S. aureus* ATCC25923

质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	抑菌效果	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	抑菌效果
0.0	+	0.6	—
0.1	+	0.7	—
0.2	+	0.8	—
0.3	+	0.9	—
0.4	+	1.0	—
0.5	—		

[†] “+”表示在相应区域有菌落生长;“—”表示未见菌落生长。



* 表示与对照组相比具有显著差异, $P<0.05$; ** 表示与对照组相比具有极显著差异, $P<0.01$

图 1 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的抑制作用
Figure 1 The inhibitory effect of silymarin on *S. aureus* ATCC25923 biofilm

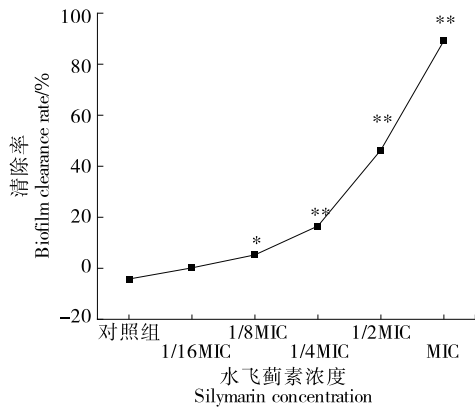
由图 1 可以看出,水飞蓟素可以显著抑制金黄色葡萄球菌 ATCC25923 生物膜的形成,且呈现一定的剂量依赖性,其中对照组的生物膜形成指数为 2.679,1/2MIC 和 MIC 浓度的生物膜形成指数为 0.566 和 0.271,相比于对照组分别下降了 78.9% 和 90.0%,具有极显著差异。而低浓度的水飞蓟素对生物膜形成的抑制作用较小。霍佳楠等^[27]研究发现,1/16MIC 浓度下的蒲公英水提物可诱导金黄色葡萄球菌生物膜的形成,使生物膜生成量增加,但高浓度的蒲公英水提物可显著抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成。崔海英等^[28]研究发现,0.1% 丁香精油对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制率达到 99.73%。与其他天然产物相比,水飞蓟素对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用较为显著。

2.3.2 对 *S. aureus* ATCC25923 成熟生物膜的清除作用 在细菌生物膜成熟之后,加入不同浓度的水飞蓟素处理,结晶紫染色后,使用酶标仪测定其对生物膜的清除能力,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,较高浓度的水飞蓟素对成熟生物膜具有良好的清除作用,其中 1/4MIC、1/2MIC 和 MIC 浓度的生物膜清除率分别为 16.6%, 46.4%, 89.2%, 而 1/16MIC 浓度的清除率仅有 0.16%, 与对照组相比差异不显著。在李虹^[29]的研究中,最小生物膜抑制浓度(MBIC)下的环二肽处理金黄色葡萄球菌 8 h,其生物膜清除率达到 59.17%。试验结果说明水飞蓟素具有较好的生物膜清除作用,且呈现一定的剂量依赖性。

2.4 水飞蓟素对生物膜内细菌代谢的抑制作用

MTT 可作用于活细胞线粒体中的呼吸链,在琥珀酸脱氢酶和细胞色素 C 的作用下,外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。



* 表示与对照组相比具有显著差异, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比具有极显著差异, $P < 0.01$

图2 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的清除作用

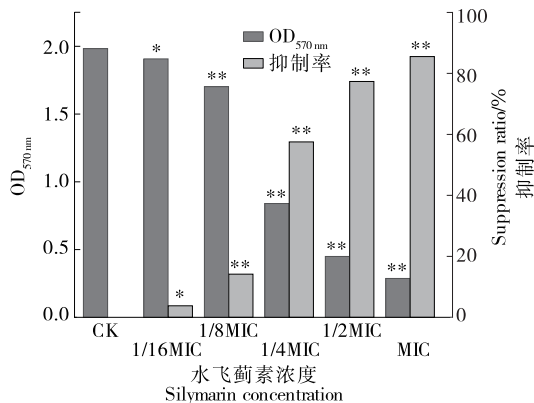
Figure 2 The scavenging effect of silymarin on *S. aureus* ATCC25923 biofilm

二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的蓝紫色结晶,用多功能酶标仪在 570 nm 处测定其光吸收值,可间接反映活细胞代谢情况。如图 3 所示,当水飞蓟素浓度达到 1/4MIC 时就能显著抑制生物膜内细菌的代谢,随着水飞蓟素浓度的增加,抑制作用逐渐增强,MIC 浓度的抑制率达到 85.5%。此试验结果与结晶紫染色法测定水飞蓟素对生物膜形成的抑制作用有较高的一致性。

2.5 光学显微镜观察水飞蓟素对生物膜的抑制作用

将盖玻片用结晶紫染色后,放在光学显微镜下观察,结果如图 4、图 5 所示。

低浓度的水飞蓟素对生物膜的抑制作用较弱,高浓度的水飞蓟素能够显著抑制 *S. aureus* ATCC25923 生物



* 表示与对照组相比具有显著差异, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比具有极显著差异, $P < 0.01$

图3 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜内细菌代谢的影响

Figure 3 Effects of silymarin on bacterial metabolism in *S. aureus* ATCC25923 biofilm

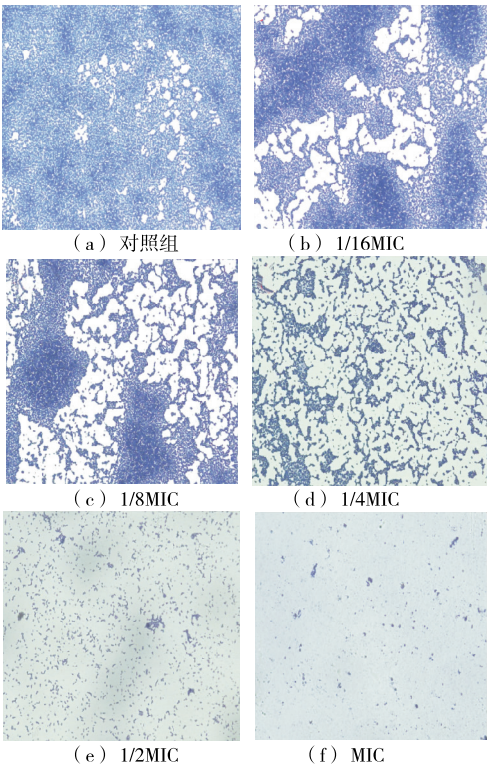
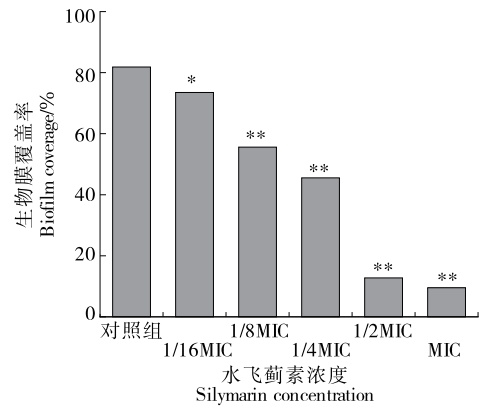


图4 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的影响

Figure 4 Effects of silymarin on *S. aureus* ATCC25923 biofilm ($\times 1000$)



* 表示与对照组相比具有显著差异, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比具有极显著差异, $P < 0.01$

图5 生物膜覆盖率

Figure 5 Biofilm coverage

膜的生长,在 MIC 浓度下仅有极少量的生物膜形成,生物膜覆盖率仅为 9.5%。这与结晶紫法检测结果高度一致。

2.6 对溶血活性的影响

金黄色葡萄球菌溶血因子已被证明可影响多种人类细胞类型,包括上皮细胞、内皮细胞、T 细胞、单核细胞和巨噬细胞,同时还可裂解哺乳动物的红细胞和中性粒细胞(PMN)^[30], β -溶血素还可以通过内皮细胞抑制白细胞

介素-8(IL-8)的表达,这些有助于金黄色葡萄球菌的逃逸和诱导生物膜形成^[31]。试验采用无菌脱纤维羊血,使用多功能酶标仪检测 OD_{450 nm} 处吸光值来测定水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 溶血因子表达的影响,结果如图 6 所示。

由图 6 可以看出,水飞蓟素处理组的溶血活性与阳性对照组相比显著降低,当水飞蓟素浓度达到 1/8MIC 时可以显著抑制 *S. aureus* ATCC25923 溶血因子的表达,且浓度达到 1/4MIC 时的溶血活性与无菌空白对照组相当。

2.7 凝固酶效价的测定

金黄色葡萄球菌凝固酶能够与凝血酶原以及其他几种血浆蛋白结合,形成血纤蛋白凝块,触发血纤蛋白原向血纤蛋白转化,进而增加金黄色葡萄球菌细胞表面的血纤维蛋白凝块,抑制吞噬作用^[32]。试验采用冻干兔血浆来测定金黄色葡萄球菌凝固酶的表达,结果如表 2 所示。

表 2 对凝固酶表达的影响[†]
Table 2 Coagulase assay

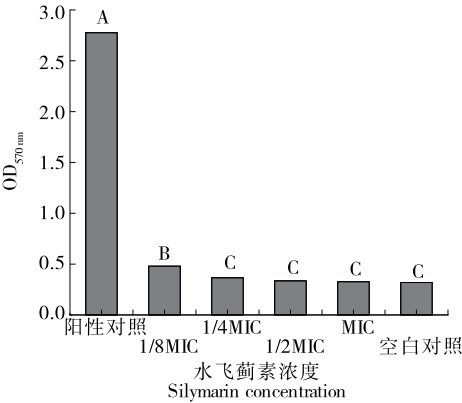
组别	时间/h											
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
对照组	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1/8MIC	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	++	++
1/4MIC	—	—	—	—	+	+	+	++	++	++	++	++
1/2MIC	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
MIC	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
空白对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

† —表示未凝固;+表示半凝固状态;++表示完全凝固。

由表 2 可知,对照组在 0.5 h 后出现凝固现象,1 h 后完全凝固,1/8MIC 组在 5.5 h 后完全凝固,而 1/4MIC 组在 4 h 后已完全凝固,1/2MIC 以及 MIC 组分别在 2.5 h 和 4 h 开始出现凝固现象,且一直处于半凝固状态。说明水飞蓟素可以显著抑制 *S. aureus* ATCC25923 凝固酶的表达,但未表现出明显的剂量依赖性。

2.8 FT-IR 分析

如图 7 所示,3 700~3 200 cm⁻¹是水的一OH 伸缩振动产生的吸收峰,代表细菌的水合作用,3 000 ~ 2 800 cm⁻¹的谱峰属于—CH₃和—CH₂反对称伸缩振动产生的吸收峰,对应着细菌细胞膜上的脂肪酸,1 650 cm⁻¹附近的谱峰由 C=O 的伸缩振动产生,1 550 cm⁻¹附近的谱峰由 N—H 弯曲振动和 C—H 的伸缩振动产生,这两处吸收峰分别代表细菌细胞中的蛋白质和多肽的酰胺带^[33]。由图 7 可知,对照组与水飞蓟素处理组相比,在上述几处区域内的吸收峰强度明显减弱,说明细菌的水合作用、脂肪酸、蛋白质的合成受到严重影



不同大写字母表示组间具有显著差异($P<0.05$)

图 6 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 溶血活性的影响

Figure 6 Effects of silymarin on hemolytic activity of *S. aureus* ATCC25923

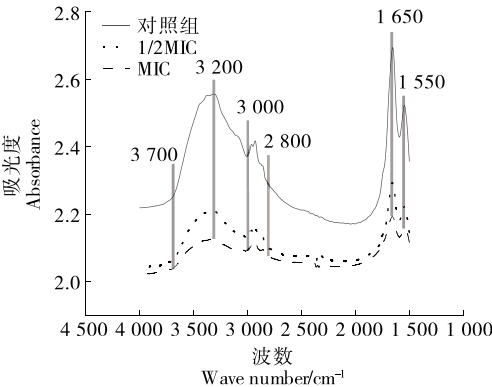


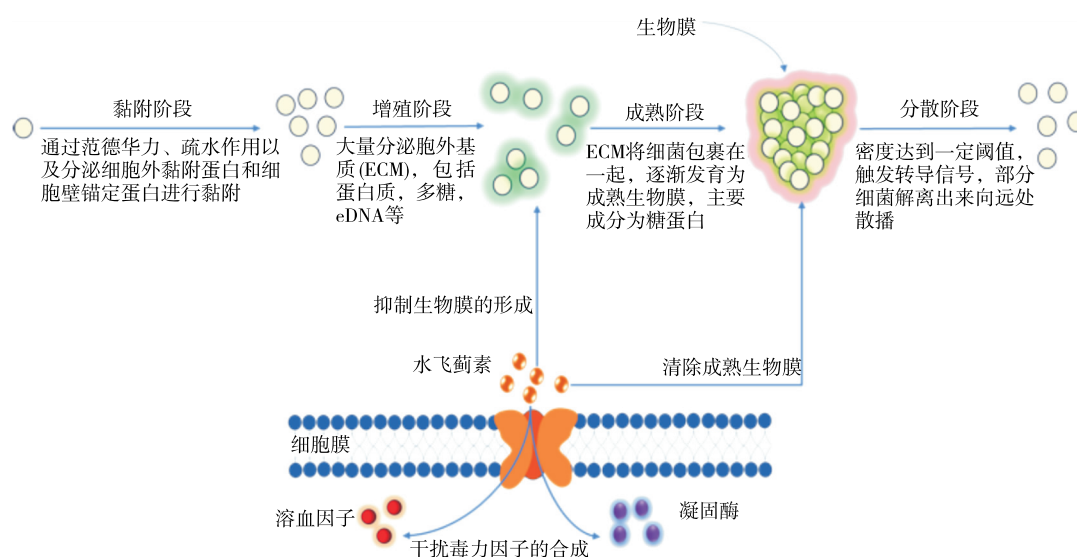
图 7 傅里叶红外分析

Figure 7 FT-IR analysis

响,而水合作用的减弱会影响细菌黏附性、疏水性以及生物膜的发育^[34]。

2.9 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜的作用机制

如图 8 所示,在金黄色葡萄球菌生物膜形成的 4 个

图8 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜及毒力因子影响机制Figure 8 Effect mechanism of silymarin on biofilm and virulence factors of *S. aureus* ATCC25923

阶段中,水飞蓟素可以作用于细菌增殖聚集阶段抑制初期生物膜的形成,也可作用于成熟生物膜形成阶段,清除已形成的生物膜。同时水飞蓟素还可在很大程度上抑制金黄色葡萄球菌溶血因子以及凝固酶等毒力因子的表达。

3 结论

采用结晶紫法探究了水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜形成的抑制以及对成熟生物膜的清除作用,0.5 倍和 1 倍最小抑菌质量浓度下的水飞蓟素处理对生物膜的抑制率分别达到 78.9% 和 90%,清除率分别达到 46.4% 和 89.2%。同时采用 MTT 染色法测定水飞蓟素对生物膜内活菌代谢的影响,结果显示亚抑制浓度下的水飞蓟素能够显著抑制生物膜内细菌的代谢能力。在 Jadhav 等^[22]的研究中,使用 MTT 染色法检测处薯蓣精油可以显著抑制单增李斯特菌生物膜内活菌的代谢能力。后续试验中,采用结晶紫染色在光学显微镜下进一步观察水飞蓟素对金黄色葡萄球菌生物膜的影响,以更直观地呈现水飞蓟素对细菌生物膜的影响。之后针对 *S. aureus* ATCC25923 溶血活性以及凝固酶的表达进行探究,发现低浓度的水飞蓟素可以显著抑制其溶血因子及凝固酶的表达,在徐云凤^{[23]37-41}关于安石榴苷对金黄色葡萄球菌抑制作用的研究中显示,低剂量的安石榴苷可以抑制其毒力因子的表达,但未表现出明显的剂量依赖性。傅里叶红外光谱分析结果显示,在水飞蓟素处理后,与金黄色葡萄球菌蛋白质、脂肪酸、水合作用等相关吸收峰强度明显减弱,这也揭示了水飞蓟素可能通过影响细菌水合,蛋白质合成来影响细菌表面疏水性、黏附性、毒力因子的表达,从而抑制其生物膜形成的潜在

机制。

综上所述,水飞蓟素对金黄色葡萄球菌的生物膜形成具有很好的抑制以及清除作用,同时能够显著抑制其毒力因子的表达。

参考文献

- [1] LI S X, WANG P P, ZHAO J L, et al. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail raw chicken meat[J]. *Journal of Food Protection*, 2018, 81(4): 528-533.
- [2] 白小宝, 索佳, 曹晨阳, 等. 生食蔬菜源金黄色葡萄球菌毒素编码基因和药敏性分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(14): 94-99.
BAI X B, SUO J, CAO C Y, et al. Study on the coding gene and drug sensitivity of *Staphylococcus aureus* toxin from raw vegetables[J]. *Food Science*, 2023, 44(14): 94-99.
- [3] 陈鹏举, 史迎迎, 赵庆枫, 等. 圣草酚促进 miR-128 缓解金黄色葡萄球菌引起的奶牛乳腺上皮细胞炎症损伤[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(10): 2 045-2 051.
CHEN P J, SHI Y Y, ZHAO Q F, et al. Eriodictyol promotes miR-128 to alleviate the inflammatory damage of bovine mammary epithelial cells caused by *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Veterinary Medicine of China*, 2020, 40(10): 2 045-2 051.
- [4] MCCARTHY H, RUDKIN J K, BLACKN S, et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5: 1-9.
- [5] LIMOLI D H, JONES C J, WOZNIAC D J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function [J]. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(3): 1-19.
- [6] YONEMOTO K, CHIBA A, SUGIMOTO S, et al. Redundant and distinct roles of secreted protein eap and cell wall-anchored protein

- SasG in biofilm formation and pathogenicity of *Staphylococcus aureus*[J]. *Infect Immun*, 2019, 87(4): 1-15.
- [7] Al-MOUSAWI A H, Al-KAABI S J, ALBAGHDADI A J H, et al. Effect of black grape seed extract (*Vitis vinifera*) on biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* [J]. *Curr Microbiol*, 2019, 77(2): 238-245.
- [8] WANG Z Y, JIA Y T, ZHANG M. Effect of curcumin on the quality properties of millet fresh noodle and its inhibitory mechanism against the isolated spoilage bacteria[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(3): 1451-1460.
- [9] 韩金龙, 董梅, 王琴, 等. 天然食品防腐剂研究进展[J]. *中国食品*, 2021(23): 104-105.
- HAN J L, DONG M, WANG Q, et al. Research progress of natural food preservatives[J]. *China Food*, 2021(23): 104-105.
- [10] 庆九, KHAING Z M, 俞新南, 等. 植物源抑菌剂的抗氧化性及其在食品中的应用[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(3): 113-117.
- QING J, KHAING Z M, YU X N, et al. Antioxidant activity of plant-derived bacteriostatic agents and their application in food[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(3): 113-117.
- [11] 韩超, 石丽丽, 赵金鹏, 等. 水飞蓟的毒理学安全性评价[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(6): 20-24.
- HAN C, SHI L L, ZHAO J P, et al. Toxicological safety evaluation of *Silybum marianum*[J]. *China Food and Nutrition*, 2018, 24(6): 20-24.
- [12] 黄凰, 张莹莹, 胡余明, 等. 水飞蓟提取物的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性研究[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(1): 103-105, 114.
- HUANG H, ZHANG Y Y, HU Y M, et al. Study on acute toxicity, genotoxicity and subchronic toxicity of *Silybum marianum* extract [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2016, 23(1): 103-105, 114.
- [13] 杨思进, 白雪, 蒲清荣, 等. 一种调节肝脏机能的饮料及其制备方法 and 用途: CN110973411A[P]. 2020-04-10.
- YANG S J, BAI X, PU Q R, et al. A beverage for regulating liver function and its preparation method and use: CN110973411A[P]. 2020-04-10.
- [14] 石崧. 一种用于保护肝脏的含有水飞蓟素的新型食品配方: CN113367340A[P]. 2021-09-10.
- SHI Q. A new food formula containing silymarin for protecting the liver: CN113367340A[P]. 2021-09-10.
- [15] 马琳, 马兴群, 韩强, 等. 一种具有能够修复肝脏的甜菜碱功能饮品: CN111296837A[P]. 2020-06-19.
- MA L, MA X Q, HAN Q, et al. A betaine functional drink that can repair the liver: CN111296837A[P]. 2020-06-19.
- [16] 刘剑桥, 孟莹, 朱艳华. 水飞蓟素缓释制剂的研究进展[J]. *中国药房*, 2017, 28(28): 4011-4014.
- LIU J Q, MENG Y, ZHU Y H. Research progress of silymarin sustained-release preparations[J]. *China Pharmacy*, 2017, 28(28): 4011-4014.
- [17] 杨延音, 杨治国, 胡世国, 等. 水飞蓟素在皮肤科的功效及其在化妆品中的应用进展[J]. *日用化学工业*, 2019, 49(4): 259-263.
- YANG Y Y, YANG Z G, HU S G, et al. Efficacy of silymarin in dermatology and its application progress in cosmetics [J]. *Daily Chemical Industry*, 2019, 49(4): 259-263.
- [18] FEI P, FENG H X, WANG Y Y, et al. *Amaranthus tricolor* crude extract inhibits *Cronobacter sakazakii* isolated from powdered infant formula[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 9969-9979.
- [19] TREMBLAY Y D N, LAMARCHE D, CHEVER P, et al. Characterization of the ability of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms[J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(1): 234-246.
- [20] GARCIA-HEREDIA A, GARCIA S, MERINO-MASCORRO J Á, et al. Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *Food Microbiology*, 2016, 59: 124-132.
- [21] OMMEN P, ZOBEB N, MEYER R L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 141: 87-89.
- [22] JADHAV S, SHAH R, BHAVE M, et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms[J]. *Food Control*, 2013, 29(1): 125-130.
- [23] 徐云凤. 安石榴苷对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
- XU Y F. Study on the bacteriostatic effect and mechanism of pomegranate glycoside on *Staphylococcus aureus* [D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2017.
- [24] PADMAVATHI A R, ABINAYA B, PANDIANS K. Phenol 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*[J]. *Biofouling*, 2014, 30(9): 1111-1122.
- [25] LIANG H, HE K, LI T, et al. Mechanism and antibacterial activity of vine tea extract and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 21416.
- [26] LEE S Y, NAM S H, LEE H J, et al. Antibacterial activity of aqueous garlic extract against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 2015, 30: 210-216.
- [27] 霍佳楠, 姜晓文, 许晶, 等. 蒲公英水提物对体外金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. *中兽医医药杂志*, 2015, 34(1): 12-15.
- HUO J N, JIANG X W, XU J, et al. Effect of dandelion water extract on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in vitro [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2015, 34(1): 12-15.

(下转第 43 页)

- (自然科学版), 2019, 40(5): 646-652.
- HE X Y, LIU C Z, CHEN M X, et al. Identification and preliminary enzyme properties of cold adapted alkaline protease producing strain *Chryseobacterium* sp. vv8[J]. Journal of Overseas Chinese University (Natural Science Edition), 2019, 40(5): 646-652.
- [19] WANG S L, YANG C H, LIANG T W, et al. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3 700-3 707.
- [20] YAMAGUCHI S, YOKOE M. A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3 337-3 343.
- [21] WANG S L, HSU W T, LIANG T W, et al. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5 679-5 686.
- [22] RIFFEL A, BRANDELLI A, BELLATO C D M, et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(3): 693-703.
- [23] DENG A, WU J, ZHANG Y, et al. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7 100-7 106.
- [24] 殷方荣, 翟李欣, 田乔鹏, 等. 贝莱斯芽孢杆菌角质蛋白酶的克隆表达、纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(6): 57-66.
- YINF R, ZHAI L X, TIAN Q P, et al. Gene cloning, expression, purification, and enzymatic properties of keratinase from *Bacillus velezensis*[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2023, 42(6): 57-66.
- [25] 张军, 朱檬, 汤伟, 等. 一株低温蛋白酶产生菌的分离及该酶的鉴定与酶学性质表征[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(15): 175-183.
- ZHANG J, ZHU M, TANG W, et al. Isolation of psychrotroph producing cold-adaptive and identification and characterization of the protease[J]. Food Research and Development, 2023, 44(15): 175-183.
- [26] MAGESWARI A, SUBRAMANIAN P, CHANDRASEKARAN S, et al. Systematic functional analysis and application of a cold-active serine protease from a novel *Chryseobacterium* sp.[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 18-27.
- [27] BHAVIKATTI J S, BODDUCHARL S M, KAMAGOND R S, et al. Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium *Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 for multiple industrial applications[J]. 3 Biotech, 2020, 10(6): 1-17.
- [28] WANG S L, YANG C H, LIANG T W, et al. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3 700-3 707.
- [29] 王朋辉, 王伟贤, 杨涛, 等. 碱性蛋白酶洗涤性能的影响因素[J]. 日用化学工业, 2021, 51(11): 1 109-1 117.
- WANG P H, WANG W X, YANG T, et al. Influencing factors on washing performance of alkaline protease in liquid detergent[J]. Journal of Daily Chemical Industry, 2021, 51(11): 1 109-1 117.
- [30] 宋超东, 殷豆豆, 谢晨杰, 等. 高效虾壳脱蛋白菌株的筛选、产酶条件优化及酶学性质研究[J/OL]. 食品与发酵工业. (2023-08-16) [2023-09-02]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036282>.
- SONG C D, YIN D D, XIE C J, et al. Screening of efficient shrimp shell deproteinization strains, optimization of enzyme production conditions and enzyme properties[J/OL]. Food and Fermentation Industry. (2023-08-16) [2023-09-02]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036282>.
- (上接第 32 页)
- [28] 崔海英, 周慧, 刘延涛, 等. 丁香精油对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(12): 55-59.
- CUI H Y, ZHOU H, LIU Y T, et al. Study on the inhibitory effect of clove essential oil on *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. China Food Additives, 2015(12): 55-59.
- [29] 李虹. 环二肽对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制机制研究及其应用[D]. 镇江: 江苏大学, 2021: 20-21.
- LI H. Study on the inhibition mechanism of cyclic dipeptide on *Staphylococcus aureus* biofilm and its application[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021: 20-21.
- [30] AMAN M J, ADHIKARI R P. Staphylococcal component pore-forming toxins: Targets for prophylaxis and immunotherapy[J]. Toxins (Basel), 2014, 6(3): 950-972.
- [31] OLIVEIRA D, BORGES A, SIMOES M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases[J]. Toxins (Basel), 2018, 10(6): E252.
- [32] 方博. 金黄色葡萄球菌 Rbf 调控毒力基因表达的分子机制[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021: 20-27.
- FANG B. The molecular mechanism of *Staphylococcus aureus* Rbf regulating virulence gene expression[D]. Hefei: China University of Science and Technology, 2021: 20-27.
- [33] OUST A, MORETRO T, KIRSCHNER C, et al. FT-IR spectroscopy for identification of closely related *Lactobacilli*[J]. J Microbiol Methods, 2004, 59(2): 149-162.
- [34] NITHYANAND P, BEEMA R M, MUTHAMIL S, et al. Usnic acid, a lichen secondary metabolite inhibits group A *Streptococcus* biofilms[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107(1): 263-272.