

乳酸对阴沟肠杆菌的抑菌作用及其机制分析

王凤婷^{1,2}, 孙芝兰², 吴海虹², 许晓曦^{1,*}, 刘芳^{2,*}, 王道营², 耿志明², 诸永志², 徐为民²
(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:以自主分离的一株冰鲜鸡肉产品的优势腐败菌——阴沟肠杆菌为指示菌, 研究乳酸对该菌的抑菌机制。结果发现各质量分数乳酸(1.0%、0.5%、0.25%)均对阴沟肠杆菌具有一定的杀菌效果; 乳酸处理后菌体的细胞电势增加, ATP和紫外吸收物质有明显的泄漏; 透射电镜观察发现, 乳酸处理后的菌株形态变得不规则, 细胞壁损伤明显, 细胞内容物渗出; 通过激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞仪检测也发现, 乳酸处理后的菌株细胞通透性增加。因此, 乳酸抑菌效应主要通过作用于细胞壁, 导致细胞壁损伤和细胞通透性增加, 改变细胞内外电势, 造成内容物的泄漏, 发挥杀菌作用。

关键词: 乳酸; 阴沟肠杆菌; 抑菌机制

Antimicrobial Activity and Mechanism of Lactic Acid on *Enterobacter cloacae*

WANG Fengting^{1,2}, SUN Zhilan², WU Haihong², XU Xiaoxi^{1,*}, LIU Fang^{2,*}, WANG Daoying², GENG Zhiming², ZHU Yongzhi², XU Weimin²
(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The antimicrobial activity of lactic acid (LA) against a dominant strain of *Enterobacter cloacae* isolated from spoiled frozen chicken was examined in the study. The results showed that all the selected LA solutions (1.0%, 0.5%, and 0.25%) had bactericidal action against *E. cloacae*. The cell membrane potential and the leakage of intracellular ATP and ultraviolet-absorbing substances were increased in cells treated with 1.0% LA. The treated cells showed an irregular morphology under transmission electron microscope (TEM); furthermore, the cell wall was damaged and the intracellular contents were leaked out. The permeability of the cytoplasmic membrane was increased as shown by laser scanning confocal microscope and flow cytometry. Therefore, the bactericidal effect of LA against *E. cloacae* was mainly mediated by damaging the cell wall and consequently increasing the cell membrane permeability, thereby leading to leakage of the intracellular components.

Keywords: lactic acid; *Enterobacter cloacae*; antibacterial mechanism

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201806016

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 06-0095-06

引文格式:

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.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201806016. <http://www.spkx.net.cn>

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. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201806016. <http://www.spkx.net.cn>

食品及其原料营养丰富, 在收获、加工、运输、贮藏过程中极易腐败变质, 产生有害物质或滋生新的致病微生物, 微生物污染是影响食品安全的重要原因之一^[1]。

阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 属于肠杆菌科肠杆

菌属, 是一种革兰氏阴性粗短杆菌, 可在人和动物的粪便、肠道以及植物中检出^[2]。阴沟肠杆菌也可引起食源性疾病, 有研究表明在婴幼儿奶粉^[3]、冷冻冷食品^[4]及即食食品^[5]中均有其检出, 在食品制作工程中, 由于原料、

收稿日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371802); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20151367); 江苏省产学研项目 (BY2015073)

第一作者简介: 王凤婷 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: 526013836@qq.com

*通信作者简介: 许晓曦 (1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工和食品安全。E-mail: xiaoxi_xu01@163.com

刘芳 (1982—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为畜产品质量控制。E-mail: fangliu82@163.com

仪器、容器消毒不彻底就会造成其污染,产生腐胺及尸胺导致食品腐败^[6]。阴沟肠杆菌已成为医院感染越来越重要的病原菌,引起的细菌感染性疾病,常累及多个器官系统,包括皮肤软组织感染^[7]、泌尿道感染、呼吸道感染以及败血症等,但由于其产生的酶具有很强的耐药性^[8],因此临床治疗有难度。国内外均有关于抑制阴沟肠杆菌的报道,Pereira等^[9]研究体外模拟体内缓冲液条件下对其生长的抑制作用;梁洁等^[10]通过天然活性物质抑制其生长。通过消除食品中的阴沟肠杆菌,能够从根源上解决很大一部分安全问题。

乳酸作为一种天然食品防腐剂^[11],能够在抑制有害菌生长的同时保证食品的安全性。乳酸为三大有机酸之一^[12],可以参与人体正常代谢,对人体无害^[13],因此作为食品添加剂应用于食品加工中,可用作酸度调节剂、酸化剂、抗微生物剂、腌渍剂、增味剂、香料^[14]。乳酸并非食物自身存在^[15],主要是由食品发酵过程中产生,如酸奶、腌菜、奶酪等^[16],乳酸对许多微生物都有抑制作用^[17]。从国内外^[18-19]关于乳酸菌抑菌效果的报道来看,主要研究的是菌株本身的或其除有机酸类产物的抑菌效果及机理,如乳酸菌素(Nisin)^[20]对致病菌或腐败菌的抑制杀菌效果,关于其产物乳酸的抑菌效果研究相对较少。本实验以从冰鲜鸡肉中分离的阴沟肠杆菌为目标菌株,研究乳酸对其杀菌作用的机理,为研发以乳酸为基础的复合保鲜剂提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

阴沟肠杆菌C4为江苏省农业科学院农产品加工所从冰鲜鸡肉中分离获得;胰蛋白胍大豆肉汤培养基 海博生物公司。

5(6)-cFDA乳酸、DiSC₃(5) 美国Sigma公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI) 生工生物工程(上海)股份有限公司;ATP检测试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司;N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, NPN) 上海麦克林生化科技有限公司;邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, ONPG) 南京奥多福尼生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Accuri C6流式细胞仪 美国BD公司;PE(Ultra View VOX)转盘式激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM) 美国铂金埃尔默公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株及培养

将阴沟肠杆菌C4接种于新鲜的胰蛋白胍大豆肉汤

(trypticase soy broth, TSB)培养基中,生长至对数期时再次转接于新鲜培养基,重复3次后,将菌液与灭菌后体积分数30%的甘油以1:1的体积比混合后保存在-40℃冰箱中。活化时将冻存的菌液解冻后以体积分数1%接种于TSB培养基中,37℃、200 r/min摇床中培养12 h,备用。

1.3.2 细菌活性实验

TSB及琼脂按照一定比例配制培养基,灭菌后倒入无菌平板中,凝固后待用。将活化后的阴沟肠杆菌C4菌液按1%接种量接种于TSB液体培养基中,待37℃摇床培养到OD_{600 nm}值为1.0时,取20 mL菌液,离心收集菌泥,加入相同体积质量分数分别为0.25%、0.5%、1.0%的乳酸溶液,将菌悬液放入摇床中,分别在0、10、30、60、120、180 min取样,使用0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)按照10倍递增稀释法稀释样品至相应浓度^[21],取100 μL均匀涂布于TSB平板上,37℃培养24 h后,记录菌数。

1.3.3 透射电镜观察

将活化好的阴沟肠杆菌C4菌液以1%的体积分数接种于TSB液体培养基中,在37℃摇床中培养直至对数期,5 000 r/min、4℃离心10 min后,用PBS(pH 7.4)洗涤,去掉上清液,加入同体积质量分数1%的乳酸溶液,以只加入相同体积PBS作为对照。在37℃处理2 h,以5 000 r/min离心10 min,再用PBS洗涤3次,除净上清液,4℃条件下用2.5%的戊二醛固定12 h^[22]。已固定好的菌体,采用2%琼脂预包埋,切成1 mm³小块,缓冲液洗涤2次,再用2%锇酸溶液固定1 h,缓冲液洗涤3次,以60%、70%、80%和90%丙酮溶液,顺序脱水各1次,每次10 min,然后以无水丙酮重复脱水2次,环氧树脂Epon812包埋,梯度烘干,采用莱卡超薄切片机切成厚度为30 nm的样品,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,透射电镜(操作电压80 kV)观察、拍照^[23]。

1.3.4 细胞膜渗透性分析

1.3.4.1 CLSM检测

细胞膜渗透性的实验使用荧光探针cFDA^[24]和PI来区分活细胞及死细胞。将对数期的菌液以5 000 r/min离心10 min,去上清液,用生理盐水(0.85% NaCl)洗涤1次,加入同体积1.0%的乳酸,加入同体积生理盐水的作为空白对照组,室温培养2 h,每15 min振荡1次。离心后悬浮在500 μL的生理盐水中,每个样品加入荧光探针cFDA使其终浓度达到100 μmol/L,避光保存10 min;然后在每个样品中加入10 μL红色核酸荧光染料PI,终浓度为30 μmol/L,避光反应10 min。混合液离心后用500 μL生理盐水悬浮菌泥,取3 μL菌液到载玻片上,加上盖玻片,置于CLSM下观察,拍照。

1.3.4.2 细胞外膜与细胞内膜通透性实验

乳酸处理阴沟肠杆菌后细胞外膜的通透性使用荧光探针NPN检测^[25], 细菌细胞达到对数期时洗涤并重悬于0.85%生理盐水, 加入荧光探针NPN, 使其终浓度达到10 $\mu\text{mol/L}$ 。加入乳酸(终质量分数为0.25%、0.5%、1.0%), 加入同体积生理盐水作为空白对照。使用酶标仪以激发波长350 nm、发射波长429 nm检测其荧光强度。细胞内膜通透性通过以ONPG作为反应底物^[26], 测定由阴沟肠杆菌C4中进入培养液中的 β -半乳糖苷酶的活性。过夜培养后的菌液1%接种至含2%乳糖的TSB培养基中, 至对数期时以6 000 r/min离心10 min收集菌体, 洗涤并悬浮于0.85%生理盐水中。然后在菌悬液中加入乳酸, 使其终质量分数为0%、0.25%、0.5%、1.0%, 在摇床中37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养, 分别在0、10、30、60、120、180 min取样, 离心后取上清液, 加入ONPG(终浓度为1.5 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养30 min后, 测定其产物 o -硝基苯酚在420 nm波长处吸光度。

1.3.4.3 胞外ATP和紫外吸收物质的测定

将活化后的菌液转接, 达到对数期后以5 000 r/min离心10 min, 使用PBS (pH 7.4) 洗涤3次, 将菌泥悬浮在乳酸溶液中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 分别在0、10、30、60、120、180 min取样。12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心1 min, 取上清液测定其胞外ATP浓度和紫外吸收物质的含量变化。ATP的测定利用试剂盒(碧云天)进行, 实验步骤按照说明书的介绍, 先做出浓度-荧光值的标准曲线, 接下来在样品中加入ATP检测试剂, 混合均匀后立即测其化学发光值^[27]。紫外吸收物质的含量以 $\text{OD}_{260\text{ nm}}$ 值表示。

1.3.5 流式细胞测定

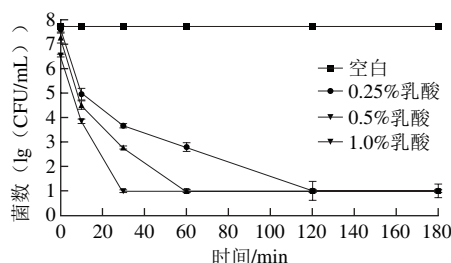
使用1.3.4节中处理好的菌液, 依次用cFDA和PI染色^[28], 12 000 r/min离心1 min收集菌体除去多余的荧光探针后, 重悬于PBS中。流式细胞仪测定时, 以低速率(400~600 个/s)收集50 000个细胞, 分别检测细胞中的绿、红荧光然后转化为数字信号, 在525 nm和620 nm波长处检测样品绿色、红色荧光。

1.3.6 细胞电势能的测定

细菌细胞的膜电位使用荧光探针DiSC₃(5)测定, 过夜培养的菌1%接种于TSB培养基中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min摇床中培养直至对数期, 6 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min, 除上清液。使用5 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸与5 mmol/L葡萄糖配制的缓冲液(缓冲液A)洗涤2次^[29], 阴沟肠杆菌C4重悬于缓冲液A与2 mmol/L乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)组成的体系中, 促进荧光探针进入菌体。在样品中加入荧光探针DiSC₃(5)使其终浓度达到0.5 $\mu\text{mol/L}$, 在室温下放置15 min。样品中加入乳酸后, 每个样品取200 μL 加入黑色的NBS板中, 使用酶标仪检测其荧光强度(激发波长为622 nm, 发射波长为670 nm)。

2 结果与分析

2.1 不同质量分数乳酸对阴沟肠杆菌的杀菌效果



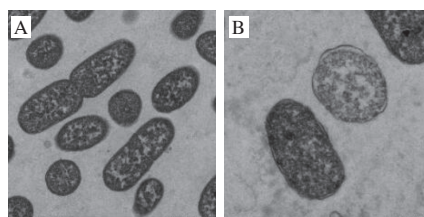
阴沟肠杆菌对数值不大于1时即判定杀菌。

图1 不同质量分数乳酸对阴沟肠杆菌的杀菌效果

Fig. 1 The antibacterial effect of lactic acid on *E. cloacae* at different concentrations

从图1可以看出, 当初始菌数约为 10^7 CFU/mL时, 1.0%的乳酸在30 min时完全杀死细菌, 0.5%及0.25%的乳酸完全杀死细菌分别需要60 min和120 min。在实验的起始点(0 min)时3个质量分数的乳酸处理组菌数均有一定减少, 说明乳酸对于阴沟肠杆菌具有一定的瞬时杀菌作用。乳酸处理的样品在实验的前30 min杀菌速度最快, 并且较低质量分数乳酸对于阴沟肠杆菌也能达到很好的杀菌效果。

2.2 菌体内部观察



A.对照; B. 1.0%乳酸处理。

图2 乳酸处理阴沟肠杆菌后的透射电镜结果

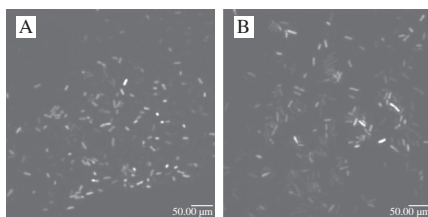
Fig. 2 TEM images of LA-treated *E. cloacae* cells

透射电镜能够直观地看出乳酸处理阴沟肠杆菌后其细胞壁及内部结构的变化。切片时细菌细胞一部分沿着横截面, 另一部分沿着纵面切片, 图中细胞由圆形与长圆形组成。如图2所示, 未添加乳酸的对照组阴沟肠杆菌表面光滑无破裂及气孔, 细胞壁完整并与细胞膜界限明显, 细胞内部成分无渗漏; 经过1.0%乳酸处理后的细菌细胞体积增大, 细胞壁破坏严重, 质壁分离, 虽然细菌仍然保持着细胞的基本形态, 但是内部细胞质分布不均匀并出现空腔, 细胞内细胞质漏出后整体逐渐透明。这说明乳酸能够快速进入细胞内部并破坏细胞质膜^[30], 并且增加细胞膜的通透性, 导致细胞内部成分泄漏导致细胞失活。

2.3 乳酸作用增加膜通透性分析

2.3.1 CLSM结果

通过两种核酸荧光探针cFDA和PI染色后,细胞质膜的通透性变化在图3中直观显示。cFDA能够进入所有细胞,而PI仅能进入受损细胞,荧光探针PI进入后导致cFDA荧光减少^[31]。染色后完整的细胞在图中呈现为绿色荧光,破损的细胞则被PI染成红色荧光。未经乳酸处理的空白对照组样品染色后主要为绿色荧光同时有少量黄色和红色,经过1.0%乳酸处理1 h后的样品大部分为红色荧光,以上结果说明经过乳酸处理后阴沟肠杆菌细胞膜通透性增加。



A.对照; B. 1.0%乳酸处理。

图3 乳酸处理后阴沟肠杆菌在CLSM下的状态

Fig. 3 CLSM images of LA-treated *E. cloacae* cells

2.3.2 细胞外膜与细胞内膜通透性分析

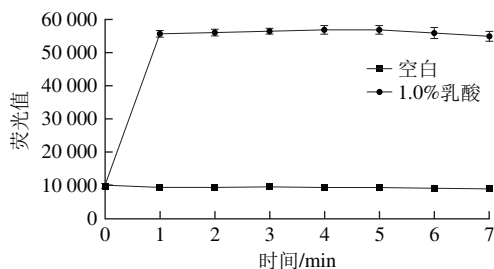


图4 乳酸对阴沟肠杆菌外膜通透性的影响

Fig. 4 Time-dependent effect of LA on the outer membrane permeability of *E. cloacae*

细胞外膜作为革兰氏阴性菌的一种独特结构,使用疏水性荧光探针NPN检测其通透性。外膜受到损伤后NPN才能进入细胞内并产生荧光,因此本研究中每分钟测定429 nm波长处的荧光值来反映细胞外膜通透性的改变(图4),0 min时未加入处理剂,加入1.0%乳酸处理1 min后荧光值达到最高,检测到荧光值达到55 000以上,而空白样品的荧光值基本没有不变。阴沟肠杆菌作用明显,对其外膜有破坏作用^[32],并且作用迅速。细菌内膜渗透性的检测以ONPG为底物,当细胞内膜被破坏后,胞内的 β -半乳糖苷酶释放到胞外环境中,分解ONPG生成半乳糖及o-硝基苯酚,后一种产物为黄色,可以通过测定其在420 nm波长处的吸光度来检测。本研究发现空白样品及处理样品在各时间点420 nm波长处吸光度均在0.05~0.06之间,无明显变化,由于本实验中乳酸处理

时的pH值在2.2左右,会影响到 β -半乳糖苷酶的活性,因此该结果不能说明乳酸处理后阴沟肠杆菌内膜通透性是否变化。

2.3.3 胞外ATP的测定结果

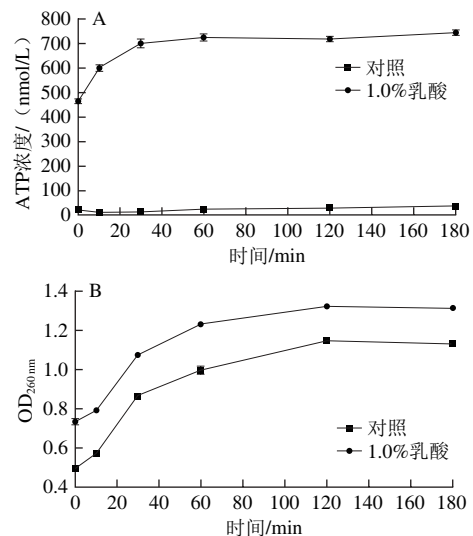


图5 乳酸处理阴沟肠杆菌后胞外ATP浓度(A)和紫外吸收物质(B)的变化

Fig. 5 Changes in extracellular ATP levels (A) and UV-absorbing materials (B) in *E. cloacae* cells treated with LA at different concentrations

本研究首先通过标准样品确定了ATP浓度与荧光值的定量关系($y=264\ 312x+2\ 595.3$, $R^2=0.999$),然后根据待测样品的荧光值确定样品中ATP浓度,结果见图5A。对照组样品最初(0 min)胞外ATP浓度为19 nmol/mL,取样持续时间为3 h,在取样期间内,ATP浓度变化不明显。1.0%乳酸处理后,胞外ATP浓度明显增加,30 min内变化趋势较快,随后变化缓慢,测定时间内从最初462 nmol/mL增加到745 nmol/mL。在Liu Guorong等^[31]研究中同样提到bifidocin A对细胞进行抑菌处理后胞外ATP浓度增加,说明乳酸处理后引起胞内ATP的大量漏出。紫外吸收物质主要包括大分子的蛋白质和核酸等。1%质量分数乳酸处理后胞外溶液的OD_{260 nm}值在处理期间要比对照组高(图5B),说明处理组胞外紫外吸收物质的含量要高于对照组,说明乳酸处理会引起胞内大分子等的流失。

2.4 流式细胞仪检测结果

用乳酸处理阴沟肠杆菌后细胞膜的完整性通过荧光探针cFDA和PI双重染色验证^[18],可以区分正常活细胞、死细胞及受损伤的活细胞。完整的细胞膜阻止核酸染料PI进入,损伤的细胞允许PI进入;cFDA可以进入所有细胞,但由于DNA对于PI的亲合力高于cFDA,所以死细胞中PI代替cFDA^[33]。根据乳酸处理前后细胞的状态获得点状图,不同象限代表不同状态的细胞:第1象限(Q1-

LR)：由cFDA染色的活细胞；第2象限(Q1-UR)：双重染色的受损细胞；第3象限(Q1-UL)：PI染色的死亡细胞；第4象限(Q1-LL)：未染色细胞。未处理细胞与经过1.0%乳酸处理1 h后的细胞分布有明显的差异，未处理样品(图6A) 96.4%为完整活细胞，处理后(图6B)为34.4%受损细胞和63.3%的死细胞，Q1-UR与Q1-LR部分百分数增加证明细胞损伤及膜的破坏，因此流式细胞仪的检测数据进一步证明了乳酸对阴沟肠杆菌的细胞膜具有破坏作用。

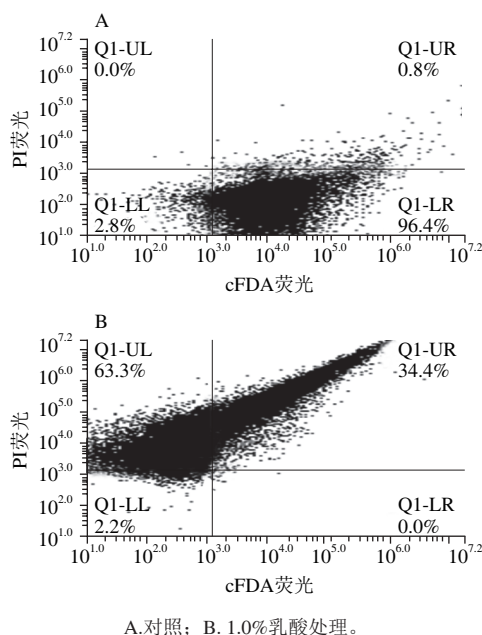


图6 乳酸处理后阴沟肠杆菌的流式点状图

Fig. 6 Flow cytometry dot plots of LA-treated *E. cloacae* cells

2.5 细胞电势能分析

乳酸对阴沟肠杆菌的处理会引起细胞电势的变化，需氧或兼性细菌通过细胞膜获取质子梯度(质子动力)转化为ATP并将营养物质传递进入细胞^[27]，质子动力的主要组成为电势梯度。荧光探针DiSC₃(5)是一种对膜电势变化敏感的染料，能够在完整的极化细胞膜中积累并自行淬灭。去极化后电势的变化导致DiSC₃(5)从细胞膜中释放，荧光值增加。由于阴沟肠杆菌为革兰氏阴性菌，荧光探针不易进入细胞内，因此处理样品的缓冲液中加入EDTA，对荧光探针进入细胞内起到促进作用。每4 min对670 nm波长处的荧光值进行测定(图7)，对照组样品荧光值保持6 000左右几乎不变，1.0%乳酸处理后的样品在最初(0 min)为9 559，高于对照组，这是由于加入乳酸到开始测定需要大约1 min，期间乳酸已经开始对阴沟肠杆菌作用，导致膜电势增加。

通过以上研究显示乳酸的杀菌速度较快，在2 h内可以杀死大于6 (lg (CFU/mL))的阴沟肠杆菌。Xu等^[34]研究发现香芹酚与百里香酚作用6 h后大肠杆菌降低小于

6 (lg (CFU/mL))。乳酸处理后虽然细胞形状不变，整体结构完整，但是在细胞膜通透性实验中，发现其细胞外膜通透性变化明显，伴随着ATP小分子和大分子的紫外吸收物质的释放，并且膜电势有显著变化，说明乳酸处理后阴沟肠杆菌的细胞膜通透性发生了变化。研究发现溶菌酶功能化金纳米颗粒^[35]在对细菌细胞作用时，细胞变形，破坏了细胞壁细胞膜结构和功能，最终导致细胞死亡。因此细胞膜的结构和通透性的改变是多数抗菌物质引起细胞损伤的主要原因。

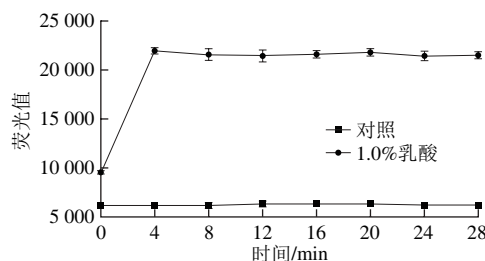


图7 乳酸处理后阴沟肠杆菌细胞电势能变化

Fig. 7 Change in membrane potential of LA-treated *E. cloacae* cells

3 结论

本研究中使用乳酸作用于阴沟肠杆菌，结果表明质量分数为0.25%、0.5%、1.0%的乳酸均有杀菌效果，乳酸质量分数为1.0%时杀菌速度最快。透射电镜的结果可以看出处理前后细胞变形，细胞壁损伤明显，细胞膜破裂，内容物流出。CLSM和流式细胞仪检测结果发现，经过乳酸处理后细菌细胞大量死亡，染色后红色荧光探针PI进入细胞内，说明菌株细胞通透性增强。细胞外膜通透性、细胞电势及胞外ATP浓度和紫外吸收物质变化明显，并且在较短的处理时间时上升较快，之后变化趋势平缓，说明乳酸对细菌细胞的瞬时作用明显，杀菌效果较快。因此，乳酸对阴沟肠杆菌的作用方式主要是通过改变细胞壁形态，使细胞膜通透性增加，改变细胞内外电势，胞内ATP及其他内容物渗出。

参考文献：

- [1] 周志江. 生物防腐剂及其在食品防腐中的应用[J]. 保鲜与加工, 2015(1): 1-8. DOI:10.3969/j.issn.1009-6221.2015.01.001.
- [2] 周慧平, 唐连飞, 蔡文杰, 等. 奶粉中阴沟肠杆菌实时荧光PCR快速检测方法建立[J]. 检验检疫学刊, 2016(3): 10-13.
- [3] 吕敬章, 黄李华, 赵贵明, 等. 奶粉中阴沟肠杆菌的检测方法研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 144-148. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.02.033.
- [4] 童秀钿. 冷冻冷食品中大肠杆菌检测及分类[J]. 浙江预防医学, 2000, 12(1): 60-61. DOI:10.3969/j.issn.1007-0931.2000.01.046.
- [5] NYENJE M E, TANIH N F, GREEN E, et al. Current status of antibiograms of *Listeria ivanovii* and *Enterobacter cloacae* isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa[J]. International Journal

- of Environmental Research & Public Health, 2012, 9(9): 3101-3114. DOI:10.3390/ijerph9093101.
- [6] GREIF G, GREIFOVA M, KAROVICOVA J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions[J]. Journal of Food & Nutrition Research, 2006, 45(1): 21-29.
- [7] 李桂梅, 黄宏章, 高强. 致病性阴沟肠杆菌1例报告[J]. 医学理论与实践, 2008, 21(5): 526. DOI:10.3969/j.issn.1001-7585.2008.05.060.
- [8] 高亚色. 1株与肠致病性大肠埃希菌O114:K90(B)交叉凝集的阴沟肠杆菌调查[J]. 预防医学论坛, 2008, 14(10): 920-921. DOI:10.3969/j.issn.1672-9153.2008.10.028.
- [9] PEREIRA S, PEREIRA C, SANTOS L, et al. Potential of phage cocktails in the inactivation of *Enterobacter cloacae*-an *in vitro* study in a buffer solution and in urine samples[J]. Virus Research, 2016, 211(4): 199-208. DOI:10.1016/j.virusres.2015.10.025.
- [10] 梁洁, 李琳, 单杨, 等. 葛根异黄酮对唾液淀粉酶及阴沟肠杆菌的抑制作用初探[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(9): 60-64. DOI:10.3969/j.issn.1006-9577.2016.09.014.
- [11] 张红印, 吴祖兴, 张一鸣, 等. 天然防腐剂及其在食品加工中的应用[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2001, 7(3): 20-21.
- [12] 高彩霞, 吴正钧. L-乳酸、D-乳酸对3种食源性致病菌的抑制作用[J]. 乳业科学与技术, 2014, 37(5): 1-3.
- [13] 于丽萍. 鲜肉保鲜与包装[J]. 肉类卫生, 2002(10): 34-34.
- [14] 闫智慧, 高静, 周丽亚, 等. 乳酸的应用与发酵生产工艺[J]. 河北工业大学学报, 2004, 33(3): 15-19. DOI:10.3969/j.issn.1007-2373.2004.03.004.
- [15] 乔支红, 程永强, 鲁战会, 等. 乳酸对三种食源性致病菌的抑菌及杀菌作用[J]. 食品科技, 2008, 33(10): 187-191. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2008.10.054.
- [16] 王晓飞. 纯种发酵泡菜及其风味物质的研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2005. DOI:10.7666/d.w014869.
- [17] 汪陈洁. 乳酸对常见食源性致病菌的抗菌活性与作用机理[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [18] GAAMOUCHE S, ARAKRAK A, BAKKALI M, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2014, 3: 657-666.
- [19] MEZAINI A, CHIHIB N E, BOURAS A D, et al. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product[J]. Journal of Environmental & Public Health, 2009: 678495. DOI:10.1155/2009/678495.
- [20] 刘晓雪, 葛菁萍, 宋刚, 等. Nisin的防腐特性及其在食品工业中的应用[J]. 黑龙江医药, 2016, 29(2): 195-199. DOI:10.14035/j.cnki.hljyy.2016.02.002.
- [21] COX S D, MANNC M, MARKHAM J L, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(1): 170-175. DOI:10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x.
- [22] ZHANG Y, LIU X, WANG Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2016, 59: 282-289. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.05.032.
- [23] 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.
- [24] 汪清美, 陈庆森, 刘伟阳. 5(6)-cFDA标记乳酸菌细胞的影响因素[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 168-172.
- [25] LI X, FENG X Q, YANG S. A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria[J]. Food Science, 2010, 31(13): 148-153. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201013035.
- [26] NING Y, YAN A, YANG K, et al. Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*, by dual mechanisms[J]. Food Chemistry, 2017, 228: 533-540. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.01.112.
- [27] SHI C, SONG K, ZHANG X, et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*[J]. PLoS ONE, 2016, 11(7): e0159006. DOI:10.1371/journal.pone.0159006.
- [28] BOOYENS J, THANTSHA M S. Fourier transform infra-red spectroscopy and flow cytometric assessment of the antibacterial mechanism of action of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) against selected probiotic *Bifidobacterium* strains[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14(1): 289. DOI:10.1186/1472-6882-14-289.
- [29] HUANG E, YOUSEF A E. The lipopeptide antibiotic paenibacterin binds to the bacterial outer membrane and exerts bactericidal activity through cytoplasmic membrane damage[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2700-2704. DOI:10.1128/AEM.03775-13.
- [30] WANG C, CHANG T, YANG H, et al. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2015, 47(6): 231-236. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.06.034.
- [31] LIU G, SONG Z, YANG X, et al. Antibacterial mechanism of bifidocin A, a novel broad-spectrum bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04[J]. Food Control, 2016, 62: 309-316. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.10.033.
- [32] ALAKOMI H L, SKYTTÄ E, SAARELA M, et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2001-2005. DOI:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.
- [33] SILVA T L D, REIS A, KENT C A, et al. Stress-induced physiological responses to starvation periods as well as glucose and lactose pulses in *Bacillus licheniformis* CCM 1034 continuous aerobic fermentation processes as measured by multi-parameter flow cytometry[J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 24(1): 31-41. DOI:10.1016/j.bej.2005.01.013.
- [34] XU J, ZHOU F, JI B P, et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(3): 174-179. DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x.
- [35] 杨龙平, 严文静, 黄明明, 等. 溶菌酶功能化金纳米颗粒抑菌性能研究[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 84-90. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714013.