

# 爱媛类芽孢杆菌抗菌肽对白色念珠菌生物膜的抑制作用机制

王志新<sup>1</sup>, 黄玉清<sup>1</sup>, 刘亚慧<sup>1</sup>, 刘丹丹<sup>1</sup>, 宁亚维<sup>1</sup>, 贾英民<sup>2,\*</sup>

(1.河北科技大学食品与生物学院, 河北 石家庄 050018; 2.北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048)

**摘要:** 研究爱媛类芽孢杆菌抗菌肽对白色念珠菌生物膜的抑制作用, 采用微量二倍稀释法和时间-杀菌曲线测定抑制效果, 显微镜观察对白色念珠菌芽管和菌丝形成的影响, 2,3-二(2-甲氧基-4-硝基-5-磺酸基苯基)-2H-四唑-5-甲酰苯胺法研究对生物膜、预成型生物膜形成和成熟生物膜清除率的影响, 荧光探针观察对生物膜结构和膜内菌体状态的影响, 平板涂布法和实时聚合酶链式反应测定生物膜内活菌数量和相关基因表达水平。结果表明, 抗菌肽对白色念珠菌的最小抑菌浓度为8.28 AU/mL。抗菌肽能降低白色念珠菌的芽管形成率, 阻止菌丝的生成, 使其以酵母形式存在。抗菌肽对生物膜的形成和清除产生影响, 能在较短时间内破坏生物膜的结构完整性, 导致菌体受损和死亡, 减少膜内菌落数量。在基因水平上, 抗菌肽可降低多个生物膜形成相关的基因(如*ALS1*、*ALS3*、*HWPI*、*EFG1*、*ECE1*和*UME6*)的表达水平, 从而抑制生物膜的形成。研究证明抗菌肽能够有效抑制白色念珠菌生物膜形成、成熟膜清除、成膜基因表达等, 结果可为白色念珠菌新型抑菌物质的开发奠定理论基础, 为食品病原微生物污染防治和食品质量安全保障提供依据。

**关键词:** 爱媛类芽孢杆菌; 抗菌肽; 白色念珠菌; 生物膜; 抑菌机制

## Antimicrobial Mechanism of Antimicrobial Peptide from *Paenibacillus ehimensis* against *Candida albicans* Biofilms

WANG Zhixin<sup>1</sup>, HUANG Yuqing<sup>1</sup>, LIU Yahui<sup>1</sup>, LIU Dandan<sup>1</sup>, NING Yawei<sup>1</sup>, JIA Yingmin<sup>2,\*</sup>

(1. College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;

2. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** This study investigated the inhibitory effect of antimicrobial peptide from *Paenibacillus ehimensis* on the biofilms of *Candida albicans* by the microdilution and time-kill curve assays. Microscopic observation was conducted to assess the impact of the peptide on the formation of *C. albicans* germ tube and hyphae. Additionally, the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay was employed to investigate the influence on the formation of *C. albicans* biofilms, pre-formed biofilms, and the clearance rate of mature biofilms. Fluorescent probes were utilized to observe the alteration in the structure of biofilms and the status of intracellular fungal entities. The number of viable cells in biofilms was measured by the spread plate method, and real-time polymerase chain reaction (PCR) was employed to determine the expression levels of genes associated with biofilm formation. The results showed that the minimum inhibitory concentration of the antimicrobial peptide against *C. albicans* was 8.28 AU/mL. This peptide reduced the rate of germ tube formation in *C. albicans*, and prevented the formation of hyphae, making it exist in the form of yeasts. Furthermore, the antimicrobial peptide influenced both the formation and eradication of biofilms and disrupted the structural integrity of biofilms after a short duration, leading to damage and even death of *C. albicans*, and reducing cell counts in biofilms. The antimicrobial peptide reduced the expression levels of multiple genes related to biofilm formation (such as *ALS1*, *ALS3*, *HWPI*, *EFG1*, *ECE1* and *UME6*), therefore inhibiting biofilm formation. The above findings demonstrated that antimicrobial peptide effectively inhibited the biofilm formation, mature biofilm clearance and the expression of biofilm-forming genes in

收稿日期: 2024-01-11

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2020208014); 河北省省级科技计划资助项目(22327107D)

第一作者简介: 王志新(1980—)(ORCID: 0000-0001-8576-7048), 女, 教授, 博士, 研究方向为生物工程。

E-mail: zhixwang0311@163.com

\*通信作者简介: 贾英民(1961—)(ORCID: 0000-0002-1930-603X), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术与安全。

E-mail: jiayingmin@btbu.edu.cn

*C. albicans*. This study lays a theoretical foundation for the development of novel antimicrobial agents against *C. albicans* and provides a basis for the prevention and control of foodborne pathogen contamination to ensure food quality and safety.

**Keywords:** *Paenibacillus ehimensis*; antimicrobial peptide; *Candida albicans*; biofilms; antimicrobial mechanism

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240111-111

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 21-0176-09

引文格式:

王志新, 黄玉清, 刘亚慧, 等. 爱媛类芽孢杆菌抗菌肽对白色念珠菌生物膜的抑制作用机制[J]. 食品科学, 2024, 45(21): 176-184. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240111-111. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Zhixin, HUANG Yuqing, LIU Yahui, et al. Antimicrobial mechanism of antimicrobial peptide from *Paenibacillus ehimensis* against *Candida albicans* biofilms[J]. Food Science, 2024, 45(21): 176-184. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240111-111. <http://www.spkx.net.cn>

乳制品的质量在很大程度上取决于原料奶的质量, 微生物尤其是致病菌的含量是影响鲜奶质量的重要因素。原料奶一旦被致病菌污染, 不仅影响乳制品的营养和感官质量, 还会给消费者的健康带来隐患<sup>[1]</sup>。研究表明, 奶牛如感染乳腺炎念珠菌会导致其产生的鲜奶被污染, 这种受感染的牛奶与正常牛奶混合增加了原奶中念珠菌的污染率, 进而影响食品品质。引起奶牛乳腺炎的主要病原体是白色念珠菌, 这是一种常见于人类和动物的深层条件致病酵母<sup>[2-3]</sup>。临床上常见的真菌侵袭性念珠菌病主要是由白色念珠菌引起的, 表现为急性、亚急性或慢性感染, 常侵犯皮肤和黏膜, 也可引起内脏或全身感染。白色念珠菌的感染使得奶牛的乳房常受到影响, 对奶牛的健康带来了显著问题。念珠菌性乳腺炎会导致乳房发炎、肿胀和疼痛, 这不仅影响了奶牛的舒适度, 还降低了它们的乳汁生产效率。乳腺感染可能使乳汁中含有细菌和炎症物质, 对乳制品的质量和卫生安全构成潜在威胁。

白色念珠菌在应对多种复杂的环境时会形成耐药性更强的生物膜。生物膜是由附着在生物或非生物基质上的微生物组成的一个联盟, 其会嵌入胞外聚合物基质中, 显示出与浮游细胞不同的生活方式。生物膜的形成被认为是念珠菌的一个重要污染和致病机制<sup>[4]</sup>。生物膜形成分为4个阶段: 黏附、增殖、成熟和分散。黏附阶段白色念珠菌通过黏附素附着在基质上以形成细胞基层。细胞增殖阶段涉及菌丝的形成, 白色念珠菌开始拉伸并发育成丝状菌丝。成熟阶段菌丝的产生伴随着细胞外聚合物的分泌, 提供结构支持和保护, 使其能够抵抗抗真菌药和宿主免疫系统的攻击。分散阶段酵母细胞从成熟的生物膜中释放出来, 并可以扩散到远处, 开始新的生物膜形成周期。这些细胞与最初的浮游细胞不同, 它们的毒性更强, 更有可能形成生物膜<sup>[5-6]</sup>。生物膜对抗真菌药物和宿主免疫系统具有高度耐药性<sup>[7-8]</sup>, 但目前消除方法有限。常见的真菌治疗药物如两性霉素B和氟康唑, 由于潜在的副作用、高毒性和耐药性菌株的出现,

其应用受到了很大影响。生物膜的形成会增加对现有抗生素和免疫反应的抵抗力, 防止白色念珠菌生物膜的形成是抵抗白色念珠菌生物膜感染的有效策略, 因此迫切需要开发有选择性和有效抑制白色念珠菌生物膜形成的抑菌物质。

抗菌肽是一类小分子多肽, 是生物体抵御外源病原微生物入侵而产生的一类物质, 其在体外的抑菌研究已经相当成熟, 越来越多的抗菌肽被发现, 并表现出抑菌性强和抑菌谱广等特点<sup>[9-11]</sup>。抗菌肽对细菌、真菌以及癌细胞都具有良好的杀伤作用, 可通过多种途径和不同机制发挥抑制作用, 不仅降低了菌株的耐药性, 还可以更大程度发挥抑菌作用。因此, 若要将其作为抗生素的替代品, 对抗菌肽抑菌机制的研究非常有必要。

爱媛类芽孢杆菌 (*Paenibacillus ehimensis*) 是类芽孢杆菌属中的一个种, 具有拮抗作用和广谱抑菌性, 对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌和病原真菌具有较好的抑制作用。Eltokhy等<sup>[12]</sup>通过土壤初筛, 筛选出一株经16S rRNA基因测序鉴定为革兰氏阳性的菌株——爱媛类芽孢杆菌MZ921932, 该菌株对多重耐药性革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和念珠菌具有广泛的抗菌活性。爱媛类芽孢杆菌可通过产生抗菌肽发挥抑制作用, 相比研究较多的多黏类芽孢杆菌抗菌肽, 对爱媛类芽孢杆菌抗菌肽的研究较少。Aktuganov等<sup>[13]</sup>研究发现*P. ehimensis* IB-X-b培养上清液可以抑制多种植物病原真菌和木材腐朽菌, 经提取纯化发现其抗真菌活性是由于产生了属于杆菌毒素L-C15、fengycin/plipastatin A-C16及其同系物的环脂肽。Naing等<sup>[14]</sup>从*P. ehimensis* MA2012的培养上清液中纯化得到的一种新型脂肽, 可以抑制胶孢炭疽菌菌丝的生长, 影响菌丝形态。Huang Zhaohui等<sup>[15]</sup>从*P. ehimensis* B7中分离出2种阳离子脂肽 (PE1和PE2), 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌等多种致病菌具有抑菌活性。但目前鲜有关于爱媛类芽孢杆菌抗菌肽对白色念珠菌抑制的研究报道。

本课题组前期从爱媛类芽孢杆菌 (*P. ehimensis*) HD 中分离纯化出具有广谱抑菌性的抗菌肽ehimensin, 其对真菌具有良好的抑制效果<sup>[16]</sup>。本研究以白色念珠菌为指示菌, 考察爱媛类芽孢杆菌抗菌肽ehimensin对其生物膜形成的抑制作用, 从芽管、菌丝、生物膜形成、生物膜清除、生物膜内菌体状态以及成膜基因等方面研究抗菌肽对白色念珠菌生物膜的影响, 以期新型抗菌剂的开发提供一定参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

爱媛类芽孢杆菌抗菌肽ehimensin由本课题组制备, 呈粉末状, 易溶于水, 保藏于-20℃。抗菌肽效价为21.24 AU/mg。指示菌白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC 10231, 由河北科技大学酶工程实验室保藏于-80℃。

SYTOX-9、碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、RPMI 1640培养基、LIVE/DEAD试剂盒 美国Thermo Fisher Scientific公司; 胎牛血清 浙江天杭生物科技股份有限公司; 2,3-二(2-甲氧基-4-硝基-5-磺酸基苯基)-2H-四唑-5-甲酰苯胺 (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, XTT)、甲萘醌 上海麦克林生化科技股份有限公司; 柱式酵母总RNA抽提纯化试剂盒 生工生物工程(上海)股份有限公司; PrimeScript™ RT定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 专用反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒、ROX plus试剂盒 大连宝生物工程有限公司。

### 1.2 仪器与设备

ZSD-A1160恒温培养箱 上海智诚分析仪器制造公司; 3-18K高速冷冻离心机 德国Sigma公司; 96 微孔板 美国Costar公司; BX53荧光显微镜 日本奥林巴斯株式会社; Spectramax Plus 384酶标仪 美谷分子仪器有限公司; Ti2-U荧光倒置显微镜 日本尼康株式会社; ABI7500荧光定量PCR仪 美国Applied Biosystems公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 白色念珠菌活化培养

从甘油管中取出保藏的白色念珠菌, 接种于新鲜的YPD培养基中, 37℃、160 r/min培养24 h, 作为一代菌悬液, 再以2%的接种量接种于YPD培养基中培养12 h制成二代菌悬液用于后续实验。

#### 1.3.2 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定

采用微量二倍稀释法测定抗菌肽对白色念珠的MIC。使用YPD培养基在96孔板中对抗菌肽进行二倍梯度稀释, 使其形成不同质量浓度 (50、25、12.5、6.25、

3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10 mg/mL) 的抗菌肽, 再加入等体积白色念珠菌悬液 ( $5 \times 10^6$  CFU/mL), 设置真菌生长孔和空白对照孔。置于37℃培养24 h, 以孔底无可见菌体生长的最低抗菌肽质量浓度为MIC, 实验重复3次。

#### 1.3.3 时间-杀菌曲线的绘制

将  $5 \times 10^6$  CFU/mL 的白色念珠菌悬液等量添加至用YPD培养基稀释的抗菌肽溶液中, 使抗菌肽终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC。37℃、160 r/min振荡培养, 定时取样, 稀释涂布, 计算活菌数。以时间为横坐标, 菌落数为纵坐标, 绘制时间-杀菌曲线, 实验重复3次。

#### 1.3.4 芽管形成测定

白色念珠菌用RPMI 1640培养液 (含15%胎牛血清) 清洗重悬至  $5 \times 10^6$  CFU/mL, 等体积添加抗菌肽并使其终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC, 37℃、160 r/min培养3 h, 显微镜下观察并随机计数100个细胞中产生芽管的数量。实验重复3次, 按照式(1)计算芽管形成率:

$$\text{芽管形成率}/\% = \frac{\text{芽管数量}}{\text{白色念珠菌数}} \times 100 \quad (1)$$

#### 1.3.5 菌丝形成测定

白色念珠菌用RPMI 1640培养液 (含15%胎牛血清) 清洗重悬至  $5 \times 10^6$  CFU/mL, 等体积添加抗菌肽并使其终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC, 37℃、160 r/min培养24 h, 显微镜下观察并拍照。

#### 1.3.6 生物膜形成分析

白色念珠菌用RPMI 1640培养基 (含15%胎牛血清) 清洗重悬至  $5 \times 10^6$  CFU/mL, 等体积添加抗菌肽并使其终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC。对照组 (0 MIC) 加入菌悬液和RPMI 1640培养基, 空白组加入RPMI 1640培养基。37℃培养24 h, 使用无菌PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 洗涤2次, 加入XTT钠盐-甲萘醌溶液, 避光孵育3 h, 用酶标仪测定490 nm处的OD值。实验重复3次, 按照式(2)计算生物膜形成率:

$$\text{生物膜形成率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_1$  为处理组OD<sub>490 nm</sub>值;  $A_2$  为空白组OD<sub>490 nm</sub>值;  $A_3$  为对照组OD<sub>490 nm</sub>值。

#### 1.3.7 预成型生物膜形成分析

白色念珠菌用RPMI 1640培养基 (含15%胎牛血清) 清洗重悬至  $2.5 \times 10^6$  CFU/mL, 取菌悬液至96孔板中黏附1.5 h。用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) (0.01 mol/L, pH 7.2) 洗涤后加入等体积不同质量浓度的抗菌肽, 对照组 (0 MIC) 加入未添加抗菌肽的RPMI 1640培养基, 空白组在新孔中加入RPMI 1640培养基。37℃培养24 h, 再次用PBS清洗后加入XTT钠盐-甲



苯酚溶液，避光孵育3 h，用酶标仪测定490 nm处的OD值。实验重复3次，按照式（3）计算预成型生物膜形成率：

$$\text{预成型生物膜形成率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2} \times 100 \quad (3)$$

式中： $A_1$ 为处理组OD<sub>490 nm</sub>值； $A_2$ 为空白组OD<sub>490 nm</sub>值； $A_3$ 为对照组OD<sub>490 nm</sub>值。

### 1.3.8 生物膜清除率测定

白色念珠菌用RPMI 1640培养基（含15%胎牛血清）清洗重悬至 $2.5 \times 10^6$  CFU/mL，在96孔板中加入菌悬液，37℃培养24 h。使用无菌PBS（0.01 mol/L、pH 7.2）洗涤后加入等体积抗菌肽溶液，使抗菌肽终质量浓度分别为0.5、1 MIC和2 MIC，对照组（0 MIC）和空白组加PBS。分别在培养0、0.5、1、2、3、6、9、12 h和24 h后用PBS清洗，再加入XTT钠盐-甲萘酚溶液，避光孵育3 h后用酶标仪测定490 nm处的OD值。实验重复3次，按照式（4）计算生物膜清除率：

$$\text{生物膜清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_2}\right) \times 100 \quad (4)$$

式中： $A_1$ 为处理组OD<sub>490 nm</sub>值； $A_2$ 为空白组OD<sub>490 nm</sub>值； $A_3$ 为对照组OD<sub>490 nm</sub>值。

### 1.3.9 生物膜形态观察

白色念珠菌用RPMI 1640培养基（含15%胎牛血清）清洗重悬至 $2.5 \times 10^6$  CFU/mL，37℃培养24 h使其形成生物膜。使用PBS（0.01 mol/L、pH 7.2）洗涤后加入抗菌肽溶液，使抗菌肽终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC，37℃作用1 h后用PBS洗掉生物膜上的浮游菌体，使用倒置荧光显微镜进行观察。

### 1.3.10 生物膜内菌体状态观察

白色念珠菌用RPMI 1640培养基（含15%胎牛血清）清洗重悬至 $2.5 \times 10^6$  CFU/mL，37℃培养24 h使其形成生物膜。使用PBS（0.01 mol/L、pH 7.2）洗涤后加入抗菌肽溶液，使抗菌肽终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC，37℃作用1 h后用PBS洗掉生物膜上的浮游菌体。然后加入PI/SYTO-9荧光染料，避光孵育30 min。再用PBS洗涤，使用倒置荧光显微镜进行观察。

### 1.3.11 生物膜内菌落总数测定

取白色念珠菌用RPMI 1640培养基（含15%胎牛血清）清洗重悬至 $2.5 \times 10^6$  CFU/mL，37℃培养24 h形成生物膜。使用PBS（0.01 mol/L、pH 7.2）洗涤后加入抗菌肽溶液，使抗菌肽终质量浓度分别为0、0.5、1 MIC和2 MIC，37℃作用1 h后用PBS洗掉浮游菌体。使用细胞刮刀将生物膜转移至离心管中，稀释并进行涡旋振荡，使生物膜内包裹的菌体游离至液体中，采用稀释涂布平板法测定白色念珠菌生物膜内活菌数量，实验重复3次。

### 1.3.12 生物膜成膜基因表达量

采用实时PCR测定抗菌肽对白色念珠菌生物膜形成相关基因表达水平的影响。白色念珠菌用RPMI 1640培养

基（含15%胎牛血清）清洗重悬至浓度为 $5 \times 10^6$  CFU/mL，等量添加质量浓度为0.5 MIC的抗菌肽至6孔板中，空白组加入等量未添加抗菌肽的RPMI 1640培养基，37℃培养24 h。PBS溶液洗去浮游菌后收集生物膜，使用柱式酵母总RNA抽提纯化试剂盒提取RNA，再使用PrimeScript™ RT定量PCR专用反转录试剂盒进行反转录合成cDNA。白色念珠菌生物膜形成相关基因的引物序列如表1所示，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。按照SYBR® Premix Ex Taq™（Tli RNaseH Plus）试剂盒、ROX plus试剂盒配制反应液，以18S rRNA作为内参基因进行实时PCR。实验重复3次，数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

表1 目标基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	基因功能	编码蛋白
18S rRNA-F	CGATGGAAGTTTGAGGCAATA	内参基因	
18S rRNA-R	CTCTCGGCCAAGGCTTATACT		
HWP1-F	TCTACTGCTCCAGCCACTGA	菌丝特异性	HWP1
HWP1-R	CCAGCAGGAATTGTTCCAT	细胞壁蛋白	
ALS3-F	AATGCTGTTTGGGTTGGTC	编码细胞壁	ALS3
ALS3-R	TCACCTGCCTGAAATTGACA	蛋白	
EFG1-F	TATGCCCCAGCAAAACAATG	编码重要的	EFG1
EFG1-R	TTGTTGCTCTGCTGCTGTC	转录因子	
ALS1-F	TTGGGTTGGTCTTAGATGG	编码细胞表面相关	ALS1
ALS1-R	ATGATTTCAAAGCGTCGTT	糖蛋白	
ECE1-F	CCAGAAATTGTGCTCGTGTGCCA	编码细胞生长相关	ECE1
ECE1-R	TCCAGGACGCCTCAAAAACGTTAG	蛋白	
UME6-F	AGCACCAAATTCGCCTTATG	编码与生物膜形成	UME6
UME6-R	AGGTTGAGCTTGTCTCAGTT	相关蛋白	

注：HWP1.菌丝壁蛋白1（hyphal wall protein 1）；ALS3.凝集素样序列蛋白3（agglutinin-like sequence protein 3）；EFG1.增强菌丝生长蛋白1（enhanced filamentous protein growth 1）；ALS1.凝集素样序列蛋白1（agglutinin-like sequence protein 1）；ECE1. elongation-specific cell elongation protein 1；UME6. unscheduled meiotic gene expression protein 6。

## 1.4 数据分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。数据用SPSS 17.0进行统计分析，利用Origin 8.0进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌肽对白色念珠菌的抑菌活性

采用微量二倍稀释法测定抗菌肽对白色念珠菌的抑制作用，其MIC为8.28 AU/mL。

通过时间-杀菌曲线进一步探究抗菌肽对白色念珠菌的抑菌活性，结果如图1所示，添加0.5 MIC抗菌肽对白色念珠菌抑制作用微弱，添加1 MIC和2 MIC抗菌肽则对白色念珠菌具有明显的抑菌和杀菌作用，最终菌落数与初始菌落数相比，分别降低了2.79、3.46（lg（CFU/mL））。Guevara-Lora等<sup>[17]</sup>使用2种合成肽（ΔM3、ΔM4）作用于白色念珠菌，在合适条件下2种合成肽都降低了白色念珠菌的菌落总数。Li Dedong等<sup>[18]</sup>通过时间-杀菌曲线发现，1 MIC（32 μg/mL）紫檀芪对白色念珠菌具有很强的抑制活性，在作用6 h时菌落总数为 $10^4$  CFU/mL左右。



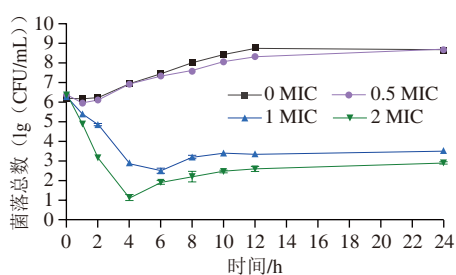
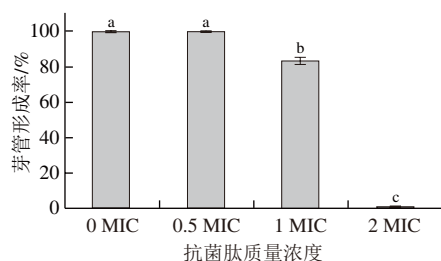


图1 抗菌肽对白色念珠菌的时间-杀菌曲线

Fig. 1 Time-kill curves of the antimicrobial peptide against *C. albicans*

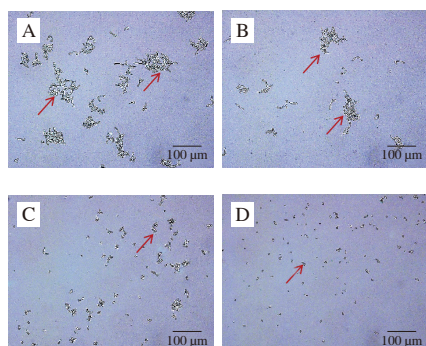
## 2.2 抗菌肽对白色念珠菌芽管形成的影响

抗菌肽对白色念珠菌芽管形成的影响如图2和图3所示, 对照组芽管形成率为99.33%, 白色念珠菌多以菌丝相形式存在。添加0.5 MIC抗菌肽对白色念珠菌芽管的形成影响不明显。添加1 MIC抗菌肽时芽管形成率下降为82.67%, 白色念珠菌处于酵母相和芽管共存的状态, 且与对照组相比, 芽管长度较短, 芽管的形成受到了很大程度的抑制。添加2 MIC抗菌肽时芽管形成率为0.33%, 白色念珠菌以酵母相形式存在。Lv Quanzhen等<sup>[19]</sup>报道, 2 MIC (0.125  $\mu\text{g/mL}$ ) 胍类抗真菌剂31C作用白色念珠菌3 h后, 才对芽管有部分抑制作用, 但不及本研究中抗菌肽的抑制效果。



小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图2 抗菌肽对白色念珠菌芽管形成率的影响

Fig. 2 Effects of the antimicrobial peptide on the germ tube formation rate of *C. albicans*

A. 0 MIC; B. 0.5 MIC; C. 1 MIC; D. 2 MIC。图4、8、9同。

图3 抗菌肽对白色念珠菌芽管形成的影响

Fig. 3 Effects of the antimicrobial peptide on the germ tube formation of *C. albicans*

## 2.3 抗菌肽对白色念珠菌菌丝形成的影响

如图4所示, RPMI 1640培养基 (含15%胎牛血清) 会诱导白色念珠菌生成菌丝, 0 MIC处理组中, 白色念珠菌由酵母相转变为菌丝相, 菌丝之间大量缠绕。0.5 MIC处理组在抗菌肽作用3 h后对芽管形成的影响不明显, 但在作用24 h后可观察到白色念珠菌菌丝生长受到了很大的抑制, 酵母相和菌丝相共存。结合2.2节结果, 推测1 MIC处理组中部分白色念珠菌可能在前期形成芽管, 但由于抗菌肽持续高效的抑制作用, 导致菌体死亡或形成芽生孢子, 以酵母相的形式存在。2 MIC处理组白色念珠菌不仅是酵母相, 菌体生长繁殖也受到了严重的抑制, 多数为单个菌体。

Yue Huizhen等<sup>[20]</sup>研究发现, 存在中药抑菌剂CHGX的情况下观察到菌丝细胞的百分比明显较小, 且呈剂量依赖性, 菌丝细胞的比例随着孵育时间的延长而逐渐降低, 作用24 h后, CHGX能有效抑制菌丝的形成, 菌株以酵母形式存在。Manoharan等<sup>[21]</sup>使用2  $\mu\text{g/mL}$ 的1,8-二羟基蒽醌作用白色念珠菌24 h后, 部分菌体长出芽管且未看到较长的菌丝, 抑制了酵母相向菌丝相的转变。Song Yuanyuan等<sup>[22]</sup>发现2-乙基蒽醌不但能减少生物膜形成, 还能抑制菌丝的形成, 40  $\mu\text{g/mL}$ 的2-乙基蒽醌处理组中菌丝发育很少, 可观察到酵母细胞和假菌丝相, 与本研究结果相似。

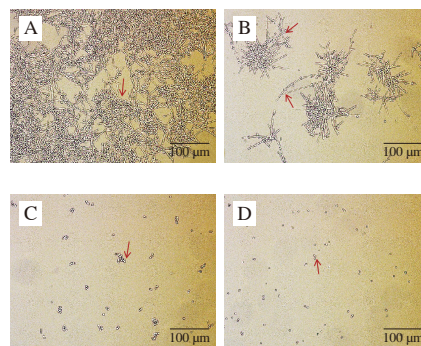


图4 抗菌肽对白色念珠菌菌丝形成的影响

Fig. 4 Effect of the antimicrobial peptide on the hyphal formation of *C. albicans*

## 2.4 抗菌肽对白色念珠菌生物膜形成的影响

XTT可被细胞内的线粒体脱氢酶还原成水溶性有色的甲臢产物, 在480~490 nm波长处有最大吸收。如图5所示, 0.5 MIC处理组生物膜形成率为51.17%, 而1 MIC和2 MIC抗菌肽处理不能使白色念珠菌形成生物膜。Raber等<sup>[23]</sup>研究发现多肽Pom-1可抑制白色念珠菌生物膜的形成, 当Pom-1的质量浓度为10  $\mu\text{g/mL}$ 时白色念珠菌生物膜的形成减少12%。本研究结果显示抗菌肽也可以有效的抑制白色念珠菌生物膜的形成, 降低其致病性。

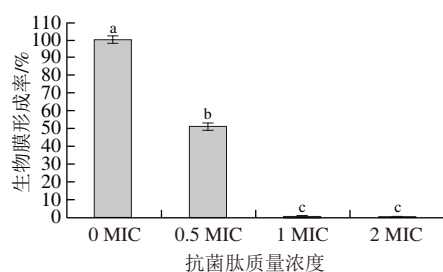


图5 抗菌肽对白色念珠菌生物膜形成的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of the antimicrobial peptide on the biofilm formation of *C. albicans*

## 2.5 抗菌肽对白色念珠菌预成型生物膜形成的影响

如图6所示, 0.5 MIC处理组预成型生物膜形成率为81.57%, 而1 MIC和2 MIC处理组不仅不能形成生物膜, 还对预成型生物膜有一定的清除能力。根据先前报道, 0.25  $\mu\text{g/mL}$  (4 MIC) 的抗真菌剂31C仅可抑制约30%的生物膜的形成<sup>[19]</sup>。肽C18以质量浓度依赖的方式显著降低生物膜活性百分比, 与对照组相比, 质量浓度为32 (1 MIC)、64  $\mu\text{g/mL}$  (2 MIC) 和128  $\mu\text{g/mL}$  (4 MIC) 的C18对生物膜生物膜形成的抑制率分别为87%、91%和92%<sup>[24]</sup>。本研究结果表明爱媛类芽孢杆菌抗菌肽可以有效抑制白色念珠菌预成型生物膜的形成。

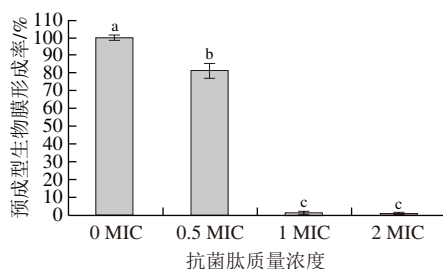


图6 抗菌肽对白色念珠菌预成型生物膜形成的影响

Fig. 6 Effects of the antimicrobial peptide on the formation of preformed biofilms of *C. albicans*

## 2.6 抗菌肽对白色念珠菌生物膜清除率的影响

如图7所示, 在抗菌肽作用生物膜1 h后, 0.5 MIC处理组清除率达到48.08%, 1 MIC和2 MIC处理组清除率分别为64.10%和77.56%。随着抗菌肽作用时间的延长, 不同处理组对白色念珠菌生物膜的清除率均达到100%。

已有报道显示, 肽LfcinB15对白色念珠菌MIC为6.25, 采用25  $\mu\text{g/mL}$ 的LfcinB15作用生物膜1 h后, 清除率在30%左右<sup>[25]</sup>。肽C18在作用白色念珠菌生物膜24 h后, 128 (4 MIC)、256  $\mu\text{g/mL}$  (8 MIC) 和512  $\mu\text{g/mL}$  (16 MIC) 的C18分别使成熟生物膜减少了39%、48%和57%<sup>[24]</sup>。本研究结果显示, 短时内抗菌肽对白色念珠菌的清除率高于之前的报道, 说明本研究中的抗菌肽有较高的清除效率。

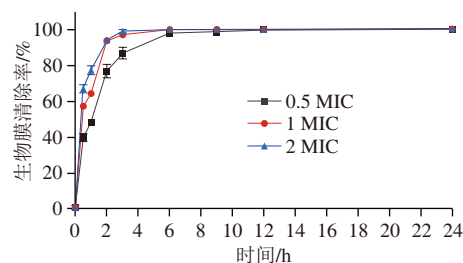


图7 抗菌肽对白色念珠菌生物膜清除率的影响

Fig. 7 Effect of the antimicrobial peptide on the clearance rate of *C. albicans* biofilms

## 2.7 抗菌肽对白色念珠菌生物膜内菌体的影响

爱媛类芽孢杆菌抗菌肽与白色念珠菌生物膜作用后, 生物膜的完整性遭到破坏。如图8所示, 0 MIC处理组生物膜结构较致密, 随着抗菌肽质量浓度的增高, 生物膜逐渐稀疏, 结构遭到破坏。

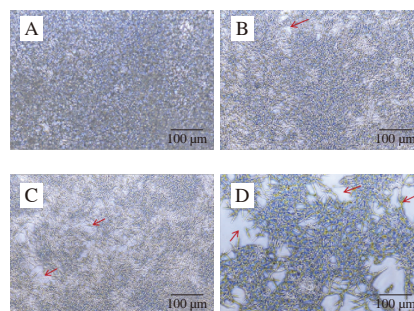


图8 抗菌肽对白色念珠菌生物膜形态的影响

Fig. 8 Effect of the antimicrobial peptide on the morphology of *C. albicans* biofilms

SYTO-9能够透过所有细胞的细胞膜与细胞核内基因结合发出绿色荧光, PI只能穿透受损细胞的细胞膜与核酸结合发出红色荧光。采用SYTO-9和PI双染法观察抗菌肽对白色念珠菌生物膜内的菌体情况。如图9所示, 0 MIC处理组呈现绿色, 且颜色较暗, 说明生物膜内菌体的细胞膜比较完整, 且生物膜结构较致密, 透光性差。0.5 MIC处理组呈橘黄色, 同时能看到很多绿色亮点, 此时生物膜内部分细胞膜已经破损并且相比于0 MIC处理组生物膜结构变得稀疏。1 MIC处理组呈橘红色, 生物膜内菌体破损加剧, 生物膜呈网状结构, 空隙增大。2 MIC处理组呈红色, 说明生物膜内大部分菌体的细胞膜呈破损状态, 生物膜也变得更加稀疏。

Braga等<sup>[26]</sup>用麝香草酚处理白色念珠菌生物膜24 h, 经SYTO-9和PI染色后, 0.5 MIC处理组未见明显变化, 1 MIC孵育抗菌肽引起可见的变化, 如细胞密度和丝状形式的降低以及红色细胞的广泛存在, 2 MIC抗菌肽孵育导致所有指标的数量进一步减少, 没有活力的红色丝状形式和细胞清晰可见, 只有少数有活力的绿色细胞。Roschetto等<sup>[27]</sup>

使用LIVE/DEAD FungaLight酵母细胞活力检测试剂盒对生物膜进行染色后,发现抗菌肽VLL-28可导致白色念珠菌生物膜中大部分细胞死亡,降低了近平滑念珠菌和热带念珠菌生物膜的细胞活力和生物量。

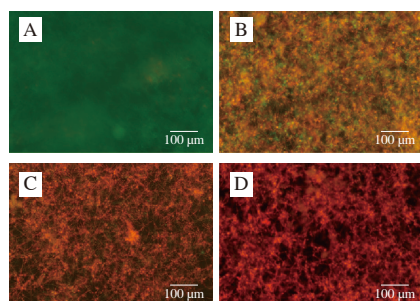


图9 抗菌肽对白色念珠菌生物膜内菌体的影响  
Fig. 9 Effects of the antimicrobial peptide on fungal cells in *C. albicans* biofilms

### 2.8 抗菌肽对白色念珠菌生物膜内菌落总数的影响

抗菌肽作用白色念珠菌生物膜后,对生物膜内菌体存活情况进一步测定。如图10所示,生物膜内菌落总数随着抗菌肽质量浓度的增加而减少,且1 MIC和2 MIC处理组和对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。0.5、1、2 MIC抗菌肽处理组与对照组相比,生物膜内的菌落总数分别下降了0.21、1.48 ( $\lg(\text{CFU/mL})$ )和3.54 ( $\lg(\text{CFU/mL})$ )。由此可知,抗菌肽可通过减少白色念珠菌生物膜内活菌数量发挥抑制作用。

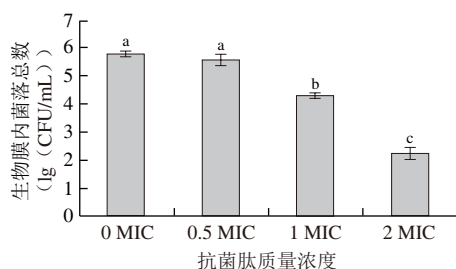


图10 抗菌肽对白色念珠菌生物膜内菌落总数的影响  
Fig. 10 Effects of the antimicrobial peptide on the total number of colonies in *C. albicans* biofilms

### 2.9 抗菌肽对白色念珠菌生物膜成膜基因的影响

本研究中抗菌肽可通过影响白色念珠菌生物膜形成相关基因的表达从而抑制生物膜的形成。如图11所示,抗菌肽作用白色念珠菌细胞膜后, *ALS1*、*ALS3*和*HWPI*基因表达水平分别降低了44.28%、28.03%和94.92%, *EFG1*、*ECE1*和*UME6*基因表达水平分别降低了53.73%、42.77%和43.50%。抗菌肽通过降低黏附素水平、干扰由于环腺苷酸-蛋白激酶A(cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A, cAMP-PKA)途径的破坏而导致的菌丝形成以及限制菌丝的长期维持来影响生物膜的形成。关于抑菌物质对白色念珠菌生物膜的抑制作用机制,也有

很多类似的报道,如臭氧超细气泡水通过调控黏附和菌丝形成相关基因(*ALS1*、*ALS3*、*RAS1*、*EFG1*、*CPH1*等)的表达发挥抗生物膜作用<sup>[28]</sup>。紫嘌呤通过降低菌丝特异性基因(*ALS3*、*ECE1*、*HWPI*和*HYR1*)的表达来抑制菌丝的生成<sup>[29]</sup>。7-苄氧基吡啶通过调节菌丝特异性和生物膜相关基因(*HWPI*、*ALS3*、*ECE1*和*RBT1*)表达,减少菌丝发育,从而抑制生物膜的形成<sup>[30]</sup>。

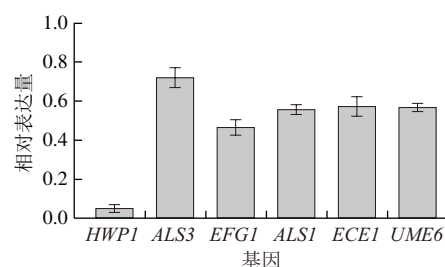


图11 抗菌肽对白色念珠菌生物膜成膜基因表达的影响  
Fig. 11 Effects of the antimicrobial peptide on the expression of biofilm formation-related genes in *C. albicans*

## 3 讨论

白色念珠菌是乳制品污染的一种病原真菌,常用的巴氏杀菌不能彻底清除其产生的孢子,进而影响了产品质量,给消费者带来了严重安全风险。临床上白色念珠菌作为常见的真菌病原体,当宿主免疫功能或防御能力下降时,可引起局部或全身性疾病,形成的生物膜耐药性和毒力十分强盛。预防和治疗白色念珠菌感染的药物较少,随着白色念珠菌耐药性的增加,迫切需要寻找新的抗真菌方法和药物来解决这一复杂的问题。生物防治被认为是一种更有效、更安全的策略。因此,自然界中无毒害且高效的新型生物抗真菌剂成为了研究方向,其中抗菌肽在应对真菌防治方面受到了极大关注。抗菌肽是一种高效广谱的抑菌剂,其在体外的抑菌研究已经相当成熟,越来越多的抗菌肽被发现,并表现出抑菌性强和抑菌谱广等特点。抗菌肽作为新型的抑菌物质对细菌的抑菌机理报道较多,而对白色念珠菌的抑制机理报道较少,对其生物膜的抑制机理更加少。白色念珠菌产生的生物膜非常致密,之前的报道对生物膜的清除均不彻底,所以要寻找清除更加彻底的安全性更高的替代物质。

本研究以新型的抑菌物质抗菌肽作为抑菌剂,探究其对白色念珠菌生物膜的抑制作用。白色念珠菌的生长方式为出芽繁殖,但当机体免疫能力下降或抵抗力降低时,芽生孢子可发育为芽管进而形成菌丝,具有致病性。抑制芽管的形成可防止其进一步发育为菌丝,从而降低白色念珠菌的致病性。白色念珠菌的菌丝是其重要的病理机制,在致病过程中发挥着关键作用。菌丝是支持生物膜结构完整性的基本成分,并为附着额外的酵母



细胞、假菌丝、其他菌丝以及多物种生物膜中的细菌提供支架。本研究结果表明爱媛类芽孢杆菌抗菌肽可以很好地抑制芽管的形成,阻止白色念珠菌酵母相向菌丝相转化,不能进一步形成耐药性较强的生物膜结构,从而在白色念珠菌生物膜形成的初始阶段成功地实施阻断,降低其致病性。

白色念珠菌的致病性与其形成生物膜的能力密切相关,生物膜对抑菌剂的耐受性比浮游细胞高得多。本研究结果表明爱媛类芽孢杆菌抗菌肽对白色念珠菌生物膜形成的黏附有较强的抑制效果。抗菌肽能在较短的时间内降低生物膜的黏附能力,将其清除。由此可知,爱媛类芽孢杆菌抗菌肽不仅能抑制生物膜的形成,还能破坏成熟生物膜的维持。

本研究结果还表明爱媛类芽孢杆菌抗菌肽破坏了白色念珠菌生物膜结构的完整性,使其生物量减少,还影响生物膜内菌体的活性,造成菌体破损和死亡。Jafri等<sup>[31]</sup>研究发现未经处理的白色念珠菌和热带念珠菌生物膜含有大量的细胞外基质,经过1.56 µg/mL和3.12 µg/mL的麝香草酚处理后生物膜形成受到不同程度的抑制,生物膜细胞解聚、基质产生减少、菌丝量减少。

生物膜形成是一个循序渐进的过程,爱媛类芽孢杆菌抗菌肽通过影响白色念珠菌生物膜成膜基因来抑制生物膜的形成。白色念珠菌首先黏附在基质上,然后开始生长菌丝<sup>[29]</sup>。白色念珠菌生物膜形成的第一个关键步骤是黏附,这个过程依赖于几种称为黏附素的细胞壁蛋白。这些蛋白通过与特定的氨基酸或糖残基结合来促进与其他细胞的附着,包括上皮细胞和其他微生物细胞或非生物表面<sup>[32]</sup>。白色念珠菌中黏附素家族有凝集素样序列(Als)家族,菌丝壁蛋白(Hwp)家族和单个蛋白质文件家族F/菌丝调节(Iff/Hyr)家族。菌丝特异性基因*ALSI*编码细胞表面相关糖蛋白,*ALS3*编码细胞壁蛋白,是菌丝特异性基因。*HWP1*是一种黏附基因,编码白色念珠菌的细胞表面蛋白,对菌丝发育和细胞黏附至关重要<sup>[33]</sup>,帮助白色念珠菌细胞强烈附着在上皮细胞上,引起黏膜念珠菌病<sup>[34]</sup>。本研究用抗菌肽使菌丝特异性基因*ALSI*、*ALS3*和*HWP1*表达水平下调,从而影响白色念珠菌的黏附。

EFG1是一种与cAMP-PKA通路相关的转录因子,可直接或间接调节一定数量的菌丝特异性基因(*HWP1*、*ALSI*、*ALS3*和*ECE1*)。EFG1参与细胞形态的调节,是不同形态开关的主要调节因子,是生物膜发育和毒力所必需的<sup>[35]</sup>。*HWP1*和*ALS3*是cAMP-PKA通路的下游组分,与EFG1调控相关<sup>[36]</sup>。*ECE1*是细胞伸长相关的基因,编码菌丝细胞伸长和生物膜形成所需的蛋白质。*UME6*是与生物膜分散相关的基因,可以增强白色念珠菌的生物膜形成。*ECE1*和*UME6*是长期维持菌丝生长和细

胞伸长所需的基因。本研究中抗菌肽使转录因子表达水平下调从而影响菌丝的形成,同时使基因*UME6*和基因*ECE1*表达水平下调以影响菌丝的形成和长期维持。

## 4 结 论

爱媛类芽孢杆菌抗菌肽对白色念珠菌生物膜具有较好的抑制效果,可以有效抑制芽管、菌丝、生物膜的形成,提高生物膜的清除率,破坏生物膜结构的完整性;影响生物膜内菌体的活性,造成菌体破损和死亡,导致膜内菌落总数减少;通过降低成膜基因的表达量来抑制白色念珠菌生物膜的形成。本实验结果为白色念珠菌生物膜的抑制研究提供了参考,也为抗真菌物质的开发奠定了一定基础。

## 参考文献:

- [1] LIN Q, LI Y X, SHENG M K, et al. Antibiofilm effects of berberine-loaded chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 173: 114237. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114237.
- [2] BURGAIN A, PIC É, MARKEY L, et al. A novel genetic circuitry governing hypoxic metabolic flexibility, commensalism and virulence in the fungal pathogen *Candida albicans*[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(12): e1007823. DOI:10.1371/journal.ppat.1007823.
- [3] SU H, HU C J, CAO B X, et al. A semisynthetic borrelidin analogue BN-3b exerts potent antifungal activity against *Candida albicans* through ROS-mediated oxidative damage[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 5081. DOI:10.1038/s41598-020-61681-0.
- [4] BENZIANE M Y, BENDAHO M, BENBELAÏD F, et al. Efficacy of endemic Algerian essential oils against single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*[J]. Archives of Oral Biology, 2023, 145: 105584. DOI:10.1016/j.archoralbio.2022.105584.
- [5] PONDE N O, LORTAL L, RAMAGE G, et al. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2021, 47(1): 91-111. DOI:10.1080/1040841X.2020.1843400.
- [6] PEREIRA R, DOS SANTOS FONTENELLE R O, DE BRITO E H S, et al. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(1): 11-22. DOI:10.1111/jam.14949.
- [7] GALDIERO E, SALVATORE M M, MAIONE A, et al. GC-MS-based metabolomics study of single- and dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7): 3496. DOI:10.3390/ijms22073496.
- [8] SHARMA D, MISBA L, KHAN A U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2019, 8: 76. DOI:10.1186/s13756-019-0533-3.
- [9] DATTA S, ROY A. Antimicrobial peptides as potential therapeutic agents: a review[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021, 27(1): 555-577. DOI:10.1007/s10989-020-10110-x.
- [10] WU M H, CHEN Q, WANG Y D, et al. Structural modification and antitumor activity of antimicrobial peptide HYL[J]. Chinese Chemical Letters, 2020, 31(5): 1288-1292. DOI:10.1016/j.ccl.2019.10.013.

- [11] DOS SANTOS C, FRANCO O L. Advances in the use of plants as potential biofactories in the production of antimicrobial peptides[J]. Peptide Science, 2023, 115(1): e24290. DOI:10.1002/pep2.24290.
- [12] ELTOKHY M A, SAAD B T, ELTAYEB W N, et al. Exploring the nature of the antimicrobial metabolites produced by *Paenibacillus ehimensis* soil isolate MZ921932 using a metagenomic nanopore sequencing coupled with LC-mass analysis[J]. Antibiotics, 2021, 11(1): 12. DOI:10.3390/antibiotics11010012.
- [13] AKTUGANOV G, JOKELA J, KIVELÄ H, et al. Isolation and identification of cyclic lipopeptides from *Paenibacillus ehimensis*, strain IB-X-b[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 973: 9-16. DOI:10.1016/j.jchromb.2014.09.042.
- [14] NAING K W, LEE Y S, NGUYEN X H, et al. Isolation and characterization of an antimicrobial lipopeptide produced by *Paenibacillus ehimensis* MA2012[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(7): 857-868. DOI:10.1002/jobm.201400505.
- [15] HUANG Z H, HU Y, SHOU L F, et al. Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus ehimensis* B7[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 87. DOI:10.1186/1471-2180-13-87.
- [16] FENG C L, LU L Z, LIU D D, et al. Purification, structure and characterization of the novel antimicrobial lipopeptides produced by *Paenibacillus ehimensis* HD[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 177: 114603. DOI:10.1016/j.lwt.2023.114603.
- [17] GUEVARA-LORA I, BRAS G, JUSZCZAK M, et al. Cecropin D-derived synthetic peptides in the fight against *Candida albicans* cell filamentation and biofilm formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13: 1045984. DOI:10.3389/fmicb.2022.1045984.
- [18] LI D D, ZHAO L X, MYLONAKIS E, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of pterostilbene against *Candida albicans* biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(4): 2344-2355. DOI:10.1128/AAC.01583-13.
- [19] LV Q Z, NI T J H, LI L P, et al. A new antifungal agent (4-phenyl-1,3-thiazol-2-yl) hydrazine induces oxidative damage in *Candida albicans*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 578956. DOI:10.3389/fcimb.2020.578956.
- [20] YUE H Z, XU X L, HE S S, et al. Antifungal mechanisms of a Chinese herbal medicine, Cao Huang Gui Xiang, against *Candida* species[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 813818. DOI:10.3389/fphar.2022.813818.
- [21] MANOHARAN R K, LEE J H, KIM Y G, et al. Alizarin and chrysazin inhibit biofilm and hyphal formation by *Candida albicans*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 447. DOI:10.3389/fcimb.2017.00447.
- [22] SONG Y Y, WANG Z Q, LONG Y J, et al. 2-Alkyl-anthraquinones inhibit *Candida albicans* biofilm via inhibiting the formation of matrix and hyphae[J]. Research in Microbiology, 2022, 173(6/7): 103955. DOI:10.1016/j.resmic.2022.103955.
- [23] RABER H F, SEJFIAJ J, KISSMANN A K, et al. Antimicrobial peptides Pom-1 and Pom-2 from *Pomacea poeyana* are active against *Candida auris*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* biofilms[J]. Pathogens, 2021, 10(4): 496. DOI:10.3390/pathogens10040496.
- [24] SUN C Q, PENG J, YANG L B, et al. A cecropin-4 derived peptide C18 inhibits *Candida albicans* by disturbing mitochondrial function[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 872322. DOI:10.3389/fmicb.2022.872322.
- [25] CHANG C K, KAO M C, LAN C Y. Antimicrobial activity of the peptide LfcinB15 against *Candida albicans*[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(7): 519. DOI:10.3390/jof7070519.
- [26] BRAGA P C, CULICI M, ALFIERI M, et al. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2008, 31(5): 472-477. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2007.12.013.
- [27] ROSCETTO E, CONTURSI P, VOLLARO A, et al. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 17570. DOI:10.1038/s41598-018-35530-0.
- [28] SHICHIRI-NEGORO Y, TSUTSUMI-ARAI C, ARAI Y, et al. Ozone ultrafine bubble water inhibits the early formation of *Candida albicans* biofilms[J]. PLoS ONE, 2021, 16(12): e0261180. DOI:10.1371/journal.pone.0261180.
- [29] TSANG P W K, BANDARA H M H N, FONG W P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e50866. DOI:10.1371/journal.pone.0050866.
- [30] MANOHARAN R K, LEE J H, LEE J. Efficacy of 7-benzoyloxyindole and other halogenated indoles to inhibit *Candida albicans* biofilm and hyphal formation[J]. Microbial Biotechnology, 2018, 11(6): 1060-1069. DOI:10.1111/1751-7915.13268.
- [31] JAFRI H, AHMAD I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*[J]. Journal de Mycologie Médicale, 2020, 30(1): 100911. DOI:10.1016/j.mycmed.2019.100911.
- [32] CAVALHEIRO M, TEIXEIRA M C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies[J]. Frontiers in Medicine, 2018, 5: 28. DOI:10.3389/fmed.2018.00028.
- [33] NOBILE C J, ANDES D R, NETT J E, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*[J]. PLoS Pathogens, 2006, 2(7): e63. DOI:10.1371/journal.ppat.0020063.
- [34] SHIN D S, EOM Y B. Zerumbone inhibits *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(10): 713-721. DOI:10.1139/cjm-2019-0155.
- [35] CONNOLLY L A, RICCOMBENI A, GRÓZER Z, et al. The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*[J]. Molecular Microbiology, 2013, 90(1): 36-53. DOI:10.1111/mmi.12345.
- [36] HSU C C, LAI W L, CHUANG K C, et al. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*[J]. Medical Mycology, 2013, 51(5): 473-482. DOI:10.3109/13693786.2012.743051.