

王凤婷, 靳盼盼, 刘芳, 等. 乳酸对粪肠球菌的抑菌作用及作用机制[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 200-206.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.029

乳酸对粪肠球菌的抑菌作用及作用机制

王凤婷^{1,2}, 靳盼盼^{1,2}, 刘芳¹, 孙芝兰¹, 吴海虹¹, 王道营¹, 许晓曦², 徐为民¹

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014; 2.东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 目前乳酸常被用来控制食品中腐败菌的生长,但是有关其对食品优势腐败菌抑菌机制方面的研究较少。本试验以一株从肉制品中分离得到的腐败菌粪肠球菌 R612-Z1 为目标菌株,研究乳酸对其的杀菌效果及作用机制。结果表明,各浓度(0.25%、0.50%、1.00%)的乳酸均有杀菌效果而且作用明显,通过激光共聚焦显微镜及流式细胞仪检测发现,处理后细胞膜通透性增强。扫描电镜及腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)浓度的测定结果说明,胞内物质流出聚集在细胞外侧,胞外 ATP 浓度和核酸类物质浓度明显上升,膜电势快速升高。因此,乳酸通过破坏粪肠球菌的细胞壁,增加细胞膜通透性,改变细胞内外电势,导致内容物流出,从而达到杀菌效果。

关键词: 粪肠球菌; 乳酸; 抑菌机理

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)01-0200-07

Antimicrobial activity and mechanism of lactic acid on *Enterococcus faecalis*

WANG Feng-ting^{1,2}, JIN Pan-pan^{1,2}, LIU Fang¹, SUN Zhi-lan¹, WU Hai-hong¹, WANG Dao-ying¹, XU Xiao-xi², XU Wei-min¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Lactic acid (LA) is widely used to control the growth of contaminating bacteria in food, but there are few reports about the antibacterial mechanism of it. The antimicrobial activity of LA against a dominated spoilage bacterium, *Enterococcus faecalis* R612-Z1, isolated from water-boiled salted duck was studied. The results showed that all the selected concentrations of LA (0.25%, 0.50%, 1.00%) had obvious bactericidal action. The permeability of cell membranes was increased for the bacterial cells treated with 1.00% LA, which was detected using the laser scanning confocal microscope and flow cytometry. The intracellular substances were leaked according to the results of scanning electron micrographs and the detection of extracellular ATP and UV-absorbing materials. The membrane potentials were found to be increased. Therefore, the antibacterial effect of LA on *E. faecalis* was mainly completed by the massive leakage of intracellular component, which was caused by damaging the cell membrane and membrane potential.

Key words: *Enterococcus faecalis*; lactic acid; antibacterial mechanism

收稿日期: 2017-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371802); 江苏省自然科学基金项目(BK20151367); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(17)3015]; 江苏省重点研发计划项目(BE2017392)

作者简介: 王凤婷(1993-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事食品微生物研究。(E-mail) 526013836@qq.com

通讯作者: 刘芳, (E-mail) fangliu82@163.com

食品的安全、质量及营养价值是人们密切关注的问题^[1]。食品在收获、加工、运输、储藏过程中容易变质^[2], 产生有害物质或滋生新的致病菌^[3]危害人体健康。肠球菌存在于人或动物消化道内, 特定条件下会成为病原体引发感染性疾病^[4], 人感染会引起泌尿系统感染、心内膜炎、伤口感染等, 动物感

染会引发脑炎、关节炎等^[5]。粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 为肠球菌属革兰氏阳性菌,属于消化道内正常菌群,但污染食品后会引发疾病发生,作为食源性致病菌已在生的猪肉、鸡肉、牛肉及其他动物源食品中检出^[6-7]。由于抗生素的大量使用,粪肠球菌已经对其产生耐药性,因此在临床治疗中有一定难度^[8]。吴悠^[9]等使用齐墩果酸和二甲基亚砷有效抑制了粪肠球菌的生长,Tong 等^[10]研究了多西环素、枸橼酸和去污剂组成的混合物(MTAD)与乳酸链球菌素(Nisin)复配对粪肠球菌的抑菌机理。

在肉类和家禽加工厂中使用最普遍的消毒剂即为有机酸^[11],乳酸作为三大有机酸之一^[12],能够参与人体正常的代谢^[13],在达到杀菌目的的同时不对人体产生危害。乳酸具有很强的防腐保鲜功能,可作为食品添加剂用于果酒、饮料、肉类、食品等的加工中,具有调节 pH、抑菌、调味、保持色泽等作用^[14]。乳酸并非食物^[15],广泛存在于发酵类食品中^[16],如酸奶、干酪、泡菜等。国内外有很多关于乳酸菌及其细菌类产物抑菌特性及机理的报道^[17-18],但关于乳酸抑菌效果及机理的研究较少。本研究拟以一株从肉制品中分离得到的粪肠球菌为试验菌株,研究乳酸对其的杀菌作用及机理,以期为今后以乳酸为基础杀菌剂和保鲜剂的研究提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

所用菌株为粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis* R612-Z1),由江苏省农业科学院农产品加工研究所保存。试验用的脑心浸液肉汤(BHI)培养基购自北京陆桥生物公司。乳酸购自天津科密欧生物技术公司,荧光探针羧基荧光素双乙酸酯[5(6)-cFDA]和 3,3-Dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC₃(5)]均购自 Sigma 公司,碘化丙啶(PI)购自生工生物工程公司,腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)检测试剂盒购自碧云天公司。

1.2 仪器与设备

所用仪器和设备主要有 Accuri C6 流式细胞仪(BD 公司产品),PE(Ultra View VOX)转盘式激光共聚焦显微镜(铂金埃尔默公司产品),EVO-LS10 扫描电子显微镜(蔡司公司产品)和 BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪(Eppendorf 公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 菌株培养 将冻存管中的粪肠球菌 R612-Z1 接种于新鲜的 BHI 培养基中,37 °C、200 r/min 培养,待生长至对数期时再次转接于新鲜培养基中,重复 3 次,备用。

1.3.2 细菌活性试验 按培养基体积 1.00% 接种活化后的粪肠球菌 R612-Z1 菌液于 BHI 液体培养基中,37 °C 摇床培养到 OD₆₀₀ 值为 1.0 时,取 20 ml 菌液分别置于不同的离心管中,4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌体沉淀,然后在各管中分别加入相同体积的乳酸溶液,其浓度分别为 0.25%、0.50%、1.00%。将菌悬液放入摇床中,分别在 0 min、10 min、30 min、60 min、120 min、180 min 取样,使用 0.1 mol/L PBS 缓冲液按照 10 倍递增稀释法^[19]稀释样品至相应浓度,取 100 μl 均匀涂布于 BHI 固体平板上,37 °C 培养 24 h,记录菌数。

1.3.3 扫描电镜 按培养基体积 1.0% 接种活化后的粪肠球菌 R612-Z1 菌液于 BHI 液体培养基中,在 37 °C 摇床中培养至对数期,4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌体沉淀,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤,去掉上清,加入同体积且质量浓度为 1.0% 的乳酸,以只加入相同体积 PBS 缓冲液为对照。37 °C 处理 2 h,4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌体沉淀,再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,除净上清,4 °C 下用 2.5% 的戊二醛固定 12 h^[20]。在扫描电子显微镜下观察菌体表面形态的变化。

1.3.4 细胞膜渗透性试验

1.3.4.1 激光共聚焦显微镜检测 使用羧基荧光素双乙酸酯[5(6)-cFDA]和碘化丙啶(PI)来区分活细胞与死细胞^[21]。取对数期的菌液在 4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌体沉淀,用 0.85% NaCl 溶液洗涤菌泥后,其中一份加入同体积质量浓度为 1.00% 的乳酸,另一份加入同体积生理盐水的菌悬液作为对照,室温下处理 2 h,每 15 min 振荡 1 次。收集菌泥重新悬浮在 500 μl 的生理盐水中,加入荧光探针 cFDA(终浓度为 100 μmol/L),避光保存 10 min,然后加入 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,置于激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3.4.2 胞外 ATP 及紫外吸收物质的检测 取对数期的菌液在 4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌

泥,使用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 3 次,将菌泥悬浮在质量浓度为 1% 的乳酸溶液中,25 °C 下处理,分别在 0 min、10 min、30 min、60 min、120 min、180 min 取样。将样品于 4 °C、10 000 g 下离心 1 min,取上清测定其胞外小分子 ATP 浓度和紫外吸收物质(主要为核酸和蛋白质等)浓度的变化。按照 ATP 测定试剂盒说明书测定样品中 ATP 的含量,先测出 ATP 浓度与荧光值的标准曲线,然后在样品中加入 ATP 检测试剂,混合均匀后通过测定其化学发光值来确定 ATP 的浓度^[22]。紫外吸收物质的浓度以紫外分光光度计测定的 OD_{260} 值来表示。

1.3.5 流式细胞仪 使用方法 1.3.4.1 中处理好的菌液,依次用 cFDA 和 PI 染色^[23],于 4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌体,除去多余的荧光探针后,重悬于 0.01 mol/L PBS 缓冲液中。在检测过程中以低速率(1 s 400~600 个)收集 50 000 个细胞,分别在 525 nm 和 620 nm 处检测样品绿色荧光和红色荧光,然后转化为数字信号。通过分析每个区域细胞的百分比来确定粪肠球菌的损伤程度。

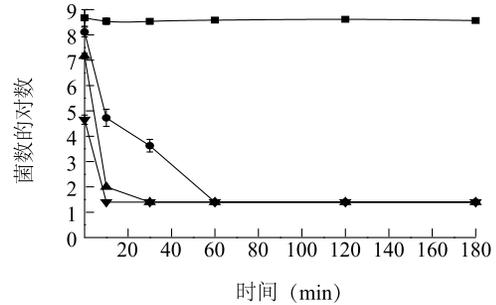
1.3.6 细胞电势能的测定 使用荧光探针 3,3-Dipropylthiadicarbocyanine iodide [DiSC3(5)] 来测定粪肠球菌膜电位的变化。将活化好的菌液按培养基体积的 1% 接种于脑心浸液肉汤 (BHI) 液体培养基中,在 37 °C、200 r/min 摇床中培养至对数期,于 4 °C 下 6 000 g 离心 10 min,收集菌泥。使用 5.0 mmol/L 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 与 5.0 mmol/L 葡萄糖配置的缓冲液 (缓冲液 A) 洗涤菌泥 2 次^[24],然后将菌泥重悬于缓冲液 A 中,加入终浓度为 0.5 μ mol/L 的荧光探针 DiSC3(5),室温放置 15 min,加入终浓度为 100.0 mmol/L 的 KCl 溶液,平衡 K^+ 浓度后,在样品中加入乳酸,每个样品取 200 μ l 加入黑色的 NBS 板中,使用酶标仪检测其荧光强度变化(激发波长为 622 nm,发射波长为 670 nm)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的乳酸对粪肠球菌 R612-Z1 的杀菌效果

不同浓度的乳酸对粪肠球菌 R612-Z1 的杀菌效果如图 1 显示,样品的初始菌数约为 1×10^8 ,质量分数为 1.00% 的乳酸在 10 min 内全部杀死细菌,0.25% 和 0.50% 的乳酸全部杀死细菌分别需要 60 min 和 30 min。在最初检测点(0 min),与对照相比,加入乳酸

的样品的菌数均有减少,这是由于样品中添加乳酸后从混匀到取样需要一定时间,同时也说明乳酸对粪肠球菌的杀菌作用明显,并且杀菌迅速。



—■— 对照; —●— 0.25% 乳酸; —▲— 0.50% 乳酸; —▼— 1.00% 乳酸
粪肠球菌菌数的对数值小于等于 1.4 时,菌数不可检测;未加入乳酸的样品为对照。

图 1 不同浓度的乳酸对粪肠球菌 R612-Z1 的杀菌效果

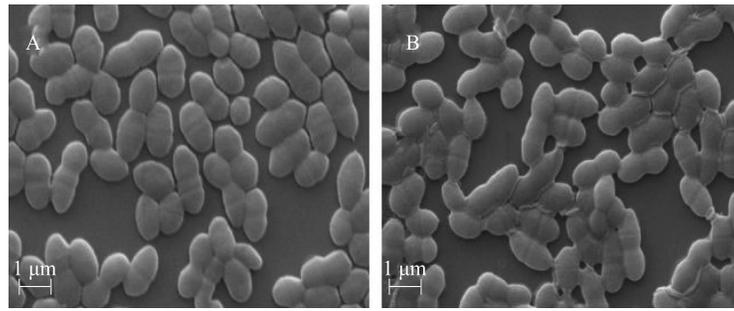
Fig.1 The antibacterial effect of lactic acid (LA) on *Enterococcus faecalis* R612-Z1 at different concentrations

2.2 乳酸对粪肠球菌 R612-Z1 细胞形态结构的影响

图 2 显示,未经乳酸处理的对照组细胞完整,表面光滑,呈规则的球形,细胞间隙明显。经过质量浓度为 1.00% 的乳酸处理 1 h 后,细胞外膜溶解,部分细胞壁缺失,菌体连成片,细胞严重变形,呈不规则球形,胞外能明显看到有内容物漏出。乳酸处理对粪肠球菌 R612-Z1 的细胞壁和细胞质膜造成破坏^[25],导致内容物漏出。

2.3 乳酸对粪肠球菌 R612-Z1 细胞膜渗透性的影响

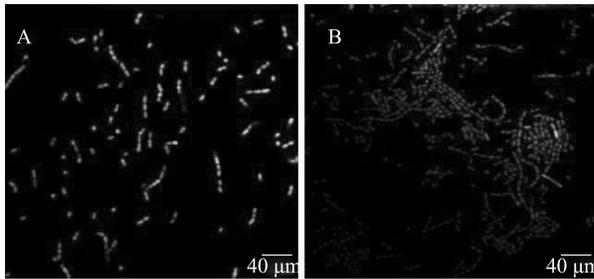
2.3.1 转盘式激光共聚焦结果 细菌细胞通过核酸荧光探针 5(6)-cFDA 和核酸荧光探针 PI 进行染色,根据染色结果(图 3)可以直观地看出细胞膜通透性的变化情况。5(6)-cFDA 是一种疏水性复合物^[21],能进入具有完整细胞膜结构的细胞,在非特异性脂酶水解作用下生成羧基荧光素 (cF),呈绿色荧光。PI 仅能进入受损细胞,与 DNA 或 RNA 结合后呈现红色荧光,PI 进入胞内后,cFDA 发出的荧光变弱^[26]。因此,未受损的细胞呈绿色,破损的细胞呈红色。未经乳酸处理的样品(图 3A)主要为绿色荧光,经过质量浓度为 1.00% 的乳酸处理后几乎所有细胞表现为红色荧光(图 3B),有少量的细胞损伤较轻,呈黄色,说明乳酸处理后粪肠球菌 R612-Z1 细胞膜的通透性增加了。



A: 未经乳酸处理的对照组细胞; B: 经过质量浓度为 1.00% 的乳酸处理 1 h 后的细胞。

图 2 乳酸处理粪肠球菌的扫描电镜观察

Fig.2 SEM images of LA-treated *E. faecalis* cells

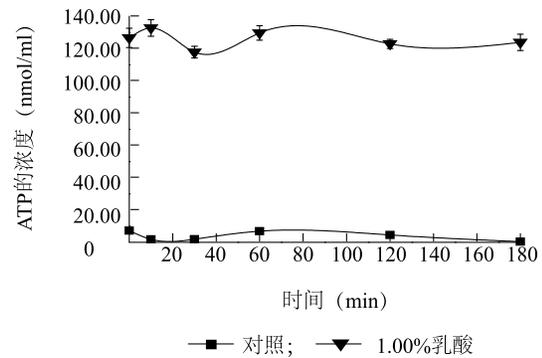


A: 未经乳酸处理的对照组细胞; B: 经过质量浓度为 1.00% 乳酸处理 1 h 后的细胞。

图 3 乳酸处理粪肠球菌后的激光共聚焦结果

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

2.3.2 胞外 ATP 及紫外吸收物质 使用试剂盒中提供的 ATP 标准品确定 ATP 浓度与荧光值的定量关系 ($Y = 222\ 856.00x + 784.01$, $R^2 = 0.999$), 然后通过测定样品荧光值来确定样品中 ATP 的浓度。图 4 显示, 0 min 时, 对照组样品的 ATP 浓度为 7.28 nmol/ml, 检测期间浓度变化不大, 质量浓度为 1.00% 乳酸处理样品的 ATP 浓度为 126.72 nmol/ml, 在随后测定的 3 h 内, ATP 浓度基本维持稳定。通过测定紫外吸收物质的浓度来确定乳酸对细胞膜通透性的影响, 260 nm 处主要为 DNA、RNA、代谢产物、离子等物质的吸收峰^[27]。图 5 显示, 0 min 时, 对照组样品吸光度为 0.25, 3 h 内保持稳定, 乳酸处理组吸光度为 1.03, 其后吸光度保持在 0.90~1.00, 说明乳酸处理后, 细胞膜通透性增强, 胞内 ATP 及核酸物质泄漏。由于加入乳酸后从混匀到取样需要一定时间, 因此在 0 min 测得吸光度值较高, 由此也可以说明, 质量分数为 1.00% 的乳酸作用迅速, 瞬间对细胞膜造成破坏。



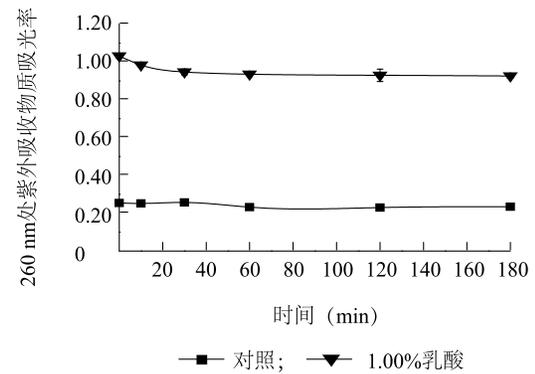
未经乳酸处理的样品为对照。

图 4 胞外 ATP 浓度的变化

Fig.4 Changes of concentrations of extracellular ATP

2.3.3 流式细胞仪检测结果 通过荧光探针 cFDA 和 PI 双染^[28]对细胞的完整性进行验证, cFDA 可以进入所有细胞, 而 PI 仅能进入膜损伤的细胞且与核酸亲和力更强, 可代替已进入细胞内的 cFDA 分子。流式细胞仪分析后, 可按细菌细胞的损伤状态将其分为完整细胞、受损细胞、死亡细胞和未染色细胞。细菌样品处理后, 利用流式细胞仪获得粪肠球菌流式点状图, 首先以对照组样品为基准划分象限, 象限 Q1-LR 为 cFDA 染色的完整活细胞, 象限 Q1-UR 为双重染色的受损活细胞, 象限 Q1-UL 为 PI 染色的死亡细胞, 象限 Q1-LL 为未染色细胞。图 6 显示, 粪肠球菌 R612-Z1 经过 1.00% 乳酸处理后细胞的分布与对照样品有明显差异, 未经乳酸处理的细菌样品中 99.7% 为活细胞, 经过乳酸处理后的细菌样品中 93.8% 为死细胞, 5.2% 为受损细胞。Booyens^[23]根据流式细胞仪的结果, 分析大蒜精油处理 3 种双歧杆菌前后其细胞膜的损伤程度。对照组样品和处理组样品中分别存在 0.2% 和 1.0% 未染色细胞, Sil-

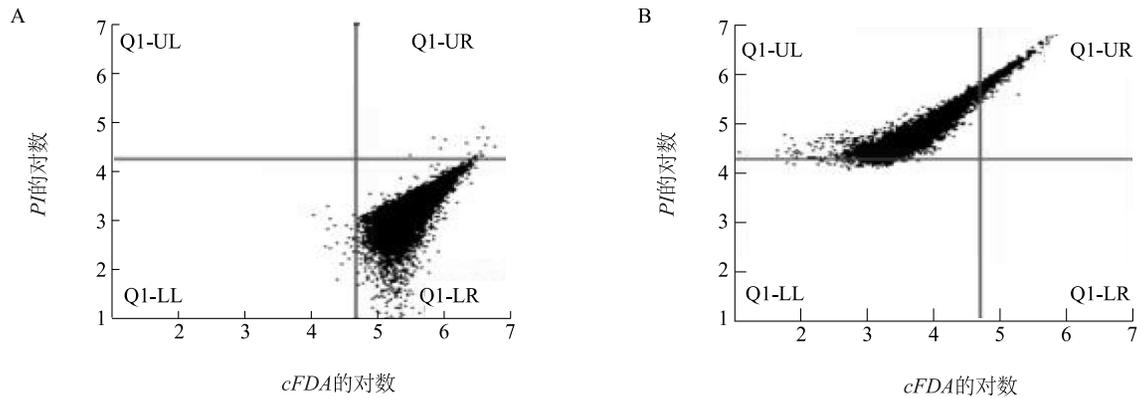
va^[29]也指出流式数据中存在未能染色的细胞,对这种细胞存在的原因有2种猜测^[23]。第一,有一部分细胞膜在处理过程中经历严重的破坏,导致其核酸流出,而2种荧光探针均是对核酸进行染色,Wang^[25]也指出乳酸能够破坏细胞质膜及胞内物质结构。第二,细胞聚集成团或成链,降低了染色率。综上所述,粪肠球菌 R612-Z1 经过 1.00% 乳酸处理后大部分细菌死亡,少部分受损,与激光共聚焦的结果相呼应,说明乳酸对粪肠球菌具有严重的破坏作用,可对其细胞膜造成损伤。



未经乳酸处理的样品为对照。

图5 紫外吸收物质吸光度变化

Fig.5 Changes of absorbance of UV-absorbing materials



A: 未经乳酸处理的细菌样品; B: 经过乳酸处理后的细菌样品。Q1-LR: cFDA 染色的完整活细胞; Q1-UR: 双重染色的受损活细胞; Q1-UL: PI 染色的死亡细胞; Q1-LL: 未染色细胞。

图6 乳酸处理后的粪肠球菌流式点状图

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

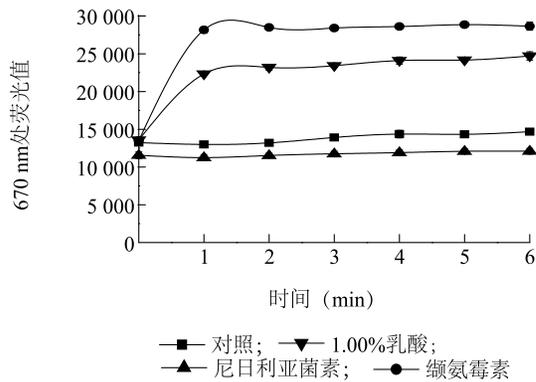
2.4 乳酸对粪肠球菌 R612-Z1 细胞膜电势能的影响

通过测定细胞膜电势能变化,进一步研究乳酸对粪肠球菌的作用。荧光探针 DiSC3(5) 是一种对膜电势变化敏感的阳离子荧光染料^[30],能够在完整的极化细胞膜中累积并且自行淬灭,乳酸处理后细胞膜去极化^[31],导致与细菌细胞结合的荧光探针脱落进入溶液中,荧光值增加。对样品在 670 nm 处的荧光进行检测(图7),尼日利亚菌素和缬氨霉素分别作为阴性对照和阳性对照,加入 KCl 平衡细胞内外 K⁺ 浓度后测定荧光值为 13 000 左右,对照组样品荧光值在测定期间保持稳定,加入尼日利亚菌素后略有下降,加入 K⁺ 载体缬氨霉素后荧光值迅速上升,处理 1 min

时荧光值为 28 159,加入 1.00% 乳酸处理后的样品的荧光值在 1 min 内变化较快,之后趋于稳定,但荧光值低于阳性对照样品的荧光值。荧光值的迅速上升说明乳酸对粪肠球菌作用迅速,细胞膜快速去极化对其功能造成破坏。

3 结论

乳酸杀菌迅速,加入乳酸后菌数迅速下降,浓度为 0.25%、0.50%、1.00% 的乳酸分别在 60 min、30 min、10 min 内达到完全杀菌的效果,乳酸作用于粪肠球菌 R612-Z1 后使其胞内 ATP 及核酸类物质快速释放到胞外。Sun 等^[32]的研究结果表明,单独使用乳酸链球菌素(Nisin)和乳酸杆菌表层分离蛋白 SlpB 或者 2 种物质复配使用后也会使胞外 ATP 和



未经乳酸处理的样品为对照。

图7 乳酸处理后粪肠球菌膜电势变化

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

核酸物质增加,ATP 浓度在反应 1.5 h 时达到最高,260 nm 处的吸光值在反应 6.0 h 时达到最大,说明复配物对细菌作用缓慢。乳酸处理粪肠球菌后,细胞形状无明显变化,但有胞内物质流出。乳酸对于细菌的破坏主要是破坏其膜通透性,对细胞整体形态无明显影响^[33-34]。使用肉桂醛作为抑菌剂处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌时,胞外核酸、蛋白质等物质含量增多,电导率增大,细胞膜电势变化^[35]。因此,细胞膜通透性的变化是多种抑菌物质达到抑菌或杀菌作用的原因。通过研究发现,乳酸处理迅速改变了细胞膜内外电势,增加了细胞膜通透性,导致内容物流出,从而起到了抑菌作用,但乳酸导致细胞膜分子结构阶段损伤的作用机制仍需要深入研究。

质量浓度为 1.00%的乳酸处理细菌 1 h 后,通过扫描电镜观察到细胞外部被内容物包裹,同时胞外 ATP 浓度及紫外吸收物质浓度的增加也说明胞内有物质渗漏。通过 cFDA 和 PI 染色,在激光共聚焦显微镜与流式细胞仪下观察,乳酸处理后大部分细胞死亡,红色荧光明显增强,表明细胞膜通透性增强,导致荧光探针 PI 进入胞内。因此,乳酸作用于粪肠球菌时会快速破坏其细胞壁及细胞膜结构,使其细胞膜通透性增强,胞内的内容物如 ATP、核酸等快速渗出,达到杀菌效果。

参考文献:

[1] 结莉,陈玲,王晓鹏. 食品微生物检测技术和质量控制探究[J]. 食品安全导刊,2017(3):52.

[2] 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.

[3] 李岩. 食品微生物检验样品采集和保存的注意事项及其检验技术[J]. 中国卫生产业,2017,14(6):39-40.

[4] GOLIŃSKA E, TOMUSIAK A, GOSIEWSKI T, et al. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(23):3562-3572.

[5] 方根成,郝雪华. 47 株粪肠球菌的耐药性分析[J]. 河南预防医学杂志,2016,27(5):339-344.

[6] WILCKES A, ANDEISEN S R, LICHT T R. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis*, isolated from raw food[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243(1):15-19.

[7] SPARO M, URBIZU L, SOLANA M V, et al. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 54(2):119-125.

[8] OLI A K, SUNGAR R, SHIVSHETTY N, et al. A study of scanning electron microscope of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* from clinical isolates[J]. Advances in Microbiology, 2012, 2(2):93-97.

[9] 吴悠,胡焱,王瑶. 齐墩果酸联合二甲亚砜对粪肠球菌的抑制作用[J]. 山东医药,2016,56(29):17-20.

[10] TONG Z, ZHOU L, LI J, et al. *In vitro*, evaluation of the antibacterial activities of MTAD in combination with Nisin against *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Endodontics, 2011, 37(8):1116-1120.

[11] ANANG D M, RUSUL G, BAKAR J, et al. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C[J]. Food Control, 2007, 18(8):961-969.

[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]. 肉品卫生,2002(10):34.

[14] 赵辉. 高产 L-(+)-乳酸植物乳杆菌工程菌的构建与应用[M]. 哈尔滨:黑龙江大学出版社,2010.

[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(10):187-191.

[16] 王光华. 乳酸和乳酸钠在肉及制品中的抑菌作用[J]. 肉类工业,1994(1):29-31.

[17] ABDELBASSET M, DJAMILA K. Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raib"[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(16):2908-2914.

[18] 樊星,张昊,郭慧媛,等. 乳酸菌抑菌功能的研究进展[J]. 中国乳业,2012(9):52-54.

[19] COX S D, MANN C 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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 and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2700-2704.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] TEETHAISONG Y, AUTARKOOL N, SIRICHAIWETCHAKOON K, et al. Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Biomedical Science, 2014, 21(1): 90.
- [28] BERNEY M, HAMMES F, BOSSHARD F, et al. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry[J]. Journal of Occupational and Organizational Psychology, 2001, 74(5): 599 - 621.
- [29] 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*, CCMI 1034 continuous aerobic fermentation processes as measured by multi-parameter flow cytometry[J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 24(1): 31-41.
- [30] WINKEL J D T, GRAY D A, SEISTRUP K H, et al. Analysis of antimicrobial-triggered membrane depolarization using voltage sensitive dyes[J]. Frontiers in Cell & Developmental Biology, 2016, 4: 29.
- [31] ZHANG L, SCOTT M H, MAYER L, et al. Interaction of polyphemusin I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers [J]. Biochemistry, 2000, 39(47): 14504-14514.
- [32] SUN Z, LI P, LIU F, et al. Synergistic antibacterial mechanism of the *Lactobacillus crispatus* surface layer protein and nisin on *Staphylococcus saprophyticus*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 265.
- [33] FISHER K, PHILLIPS C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4): 1343.
- [34] LV F, LIANG H, YUAN Q, et al. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms[J]. Food Research International, 2011, 44(9):3057-3064.
- [35] 张赞彬,刘笑宇,姜萍萍,等. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J]. 现代食品科技, 2015(5):31-35.

(责任编辑:王 妮)