

程峰, 刘宇, 杨珍, 等. 茶树精油对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的影响 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 107-112. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020110063

CHENG Feng, LIU Yu, YANG Zhen, et al. Effect of Tea Tree Oil on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 107-112. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020110063

· 生物工程 ·

茶树精油对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的影响

程 峰, 刘 宇, 杨 珍, 莫亚男, 尚若锋, 郝宝成, 王学红, 梁剑平*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 农业农村部兽用药物创制重点实验室,
甘肃省新兽药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050)

摘 要: 本文研究了茶树精油对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 生物被膜的影响及其作用机制。首先测定了茶树精油对 1 株 MRSA 标准菌株及 12 株金黄色葡萄球菌分离菌株的 MIC 值为 0.08%~0.32%。结晶紫半定量染色实验发现 0.16% 的茶树精油对 MRSA 生物被膜形成有抑制作用, 结晶紫半定量染色实验和激光共聚焦显微镜发现 0.32% 的茶树精油可完全清除 MRSA 成熟的生物被膜, 0.16% 可明显破坏其生物被膜。抗生物被膜机制的初步探究发现茶树精油可以抑制 MRSA 生物被膜形成过程中多糖黏附素 (polysaccharide intercellular adhesion, PIA) 和胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA) 的分泌以及生物被膜形成相关基因 *agr*、*ica*、*cid*、*sar* 的表达。因此, 茶树精油具有强大的抗生物被膜作用, 可能机制是抑制其 PIA 的合成, eDNA 的分泌以及生物被膜形成相关基因的表达。

关键词: 茶树精油, 生物被膜, 结晶紫半定量法, 激光共聚焦显微镜, 多糖黏附素, 胞外 DNA

中图分类号: TS225.1⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)14-0107-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020110063

Effect of Tea Tree Oil on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm

CHENG Feng, LIU Yu, YANG Zhen, MO Yanan, SHANG Ruofeng, HAO Baocheng,
WANG Xuehong, LIANG Jianping*

(Key Laboratory of New Animal Drug Project, Gansu Province, Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The effects of tea tree oil on the biofilm of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its mechanism of action were studied in this paper. Firstly, the MIC values of tea tree oil against MRSA and 12 clinically isolated strains were determined to be 0.08%~0.32%. It was found that 0.16% of tea tree oil had an inhibitory effect on the formation of MRSA biofilms. Tea tree oil at 0.32% could completely remove mature biofilms of MRSA while 0.16% could significantly reduce the mature biofilms by semi-quantitative crystal violet experiments and CLSM. Preliminary exploration of the biofilm mechanism found that tea tree oil could inhibit the secretion of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) and extracellular DNA (eDNA), and the expression level of *agr*, *ica*, *cid* and *sar* during the formation of MRSA biofilm. Therefore, tea tree essential oil would have a strong anti-biofilm effect, and could inhibit the synthesis of PIA, the secretion of eDNA and the expression of genes related to biofilm formation.

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 中国农业科学院创新工程兽用天然药物创新团队项目 (CAAS-ASTIP-2014-LIHP-04); 兰州市科技计划项目 (2018-1-114); 中国农业科学院创新工程所级重点任务 (CAAS-LMY-03)。

作者简介: 程峰 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物研究与开发, E-mail: 17752522760@163.com。

*** 通信作者:** 梁剑平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 天然药物研究与开发, E-mail: liangjp100@sina.com。

Key words: tea tree oil; biofilm; semi-quantitative crystal violet experiments; CLSM; PIA; eDNA

由于在人类疾病治疗中抗生素的不合理使用,细菌耐药性问题变得越来越严重,特别是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的大流行,更是引起了人们对细菌耐药性问题的广泛关注^[1]。MRSA 可以引起多种疾病,例如医院获得性感染、社区获得性感染、肺炎、败血症和皮肤感染^[2]。MRSA 还特别容易形成由生物被膜(biofilm, BF),生物被膜是指细菌黏附于接触表面所形成的大量细菌聚集膜状物^[3],是细菌为了适应自然环境有利于生存的一种特殊结构。研究表明,生物被膜形成后细菌的数量会显著增加,并且可以逃避免疫系统的识别^[4]。同时,生物被膜可以显著增加细菌对药物的抵抗能力,导致细菌耐药性问题愈发严重,有研究表明游离细菌对药物的敏感性是生物膜态细菌的 10~1000 倍左右^[5-6]。但是在临床上只有很少的药物对 MRSA 生物被膜有很好的抑制或者清除作用^[7-8]。因此开发一种新的可以有效控制 MRSA 生物被膜的药物迫在眉睫。

茶树精油(tea tree oil, TTO)是从澳大利亚的桃金娘科互叶白千层的新鲜枝叶中以水蒸汽蒸馏的方式提取出来的一种无色至淡黄色液体,有尖锐的樟脑气味和薄荷醇的清凉感^[9]。茶树精油具有广谱抗细菌^[10]、真菌^[11]、病毒^[12]以及寄生虫^[13]等生物活性,因而在香料、农业、食品工业以及化妆品等行业都具有广泛的应用。研究发现,茶树精油对金黄色葡萄球菌^[10]和白色念珠菌^[14]等多种细菌和真菌生物被膜的形成也有一定的抑制作用,可以破坏它们的生物被膜,但其机制尚不完全明确。因此本文选取 MRSA 的标准菌株 ATCC43300 作为实验菌株,来研究茶树精油对于 MRSA 生物被膜的抑制机制,为茶树精油作为新型抗菌天然药物的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

MRSA 标准菌株 ATCC43300 美国标准菌种库;茶树精油 澳大利亚 Maincamp 公司;BHI 培养基、TSB 培养基 英国 Oxoid(Fisher)公司;MHA/B 培养基 北京奥博星公司;RNA 提取试剂盒 杭州博日生物科技公司;q-RT-PCR 试剂盒、反转录试剂盒 日本 Takara 公司;LIVE/DEAD™ BacLight™ 试剂盒 美国 ThermoFisher Scientific 公司。

多功能酶标仪 美国 GENE 公司;激光共聚焦显微镜 德国 ZEISS 公司;超微量紫外分光光度计 美国 Plextech 公司;荧光定量 PCR 仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶树精油对 MRSA 悬浮细菌的抑制作用 根据 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)

药敏实验指导标准,使用微量稀释法测定了茶树精油对 1 株标准菌株(MRSA, ATCC43300)以及 12 株临床分离菌株(金黄色葡萄球菌)的最小抑菌浓度(MIC)以及最小杀菌浓度(MBC)。MIC 指能抑制细菌生长的最小药物浓度, MBC 指能杀灭 99.9% 的细菌的最小药物浓度。

1.2.2 茶树精油对 MRSA 生物被膜形成的抑制作用

参照 Srdjan 等^[15]的方法培养生物被膜并进行染色。首先在 TSB 培养中将 MRSA 静置培养 24 h 以活化 MRSA,然后将活化好的 MRSA 用 TSB-g(添加了 1% 葡萄糖的 TSB 培养基)培养基稀释 100 倍,同不同浓度的茶树精油(使茶树精油的终浓度为 0.64%、0.32%、0.16%、0.08%、0.04% 和 0)一起加到平底 96 孔板中,静置培养,在 6、12、24、36、48 h 时弃去培养基,用无菌 PBS 清洗 3 遍,加入 10% 的甲醛固定过夜,弃去甲醛晾干,加入 0.1% 的结晶紫溶液染色 30 min 后弃去结晶紫,然后用流水冲洗干净残余的结晶紫,至烘箱中烘干,加入 95% 的乙醇重悬结晶紫,静置 30 min 后在酶标仪上测定 OD₅₉₀。

1.2.3 茶树精油对成熟生物被膜的清除作用 参照 Srdjan 等^[15]的方法制备成熟的生物被膜,制备好成熟的生物被膜之后,弃去培养基,用无菌 PBS 清洗 2~3 次,然后加入用 TSB-g 培养基稀释好的茶树精油,使茶树精油的浓度分别为 0.16%、0.08%、0.04%、0.02%、0.01% 和 0。在 24 h 时弃去培养基,用无菌 PBS 清洗 3 遍,加入 10% 甲醛固定过夜,弃去甲醛,加入结晶紫染色后用流水冲洗干净,加入 95% 乙醇重悬结晶紫,静置 30 min 后测定 OD₅₉₀,然后计算不同浓度的茶树精油对 MRSA 生物被膜的清除率,计算公式为清除率(%)=(OD₀-OD₁)×100/OD₀,式中,OD₀为茶树精油浓度为 0 时测得的吸光度,OD₁为使用不同茶树精油浓度作用后生物被膜后所测得的吸光度。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察茶树精油对 MRSA 生物被膜的影响 在 6 孔板中使用细胞爬片培养生物被膜,并且加入不同浓度的茶树精油并使茶树精油的浓度分别为 0.16%、0.08%、0.04% 和 0。使用赛默飞 LIVE/DEAD™ BacLight™ 试剂盒进行染色,然后使用蔡司 LSM800 激光共聚焦显微镜进行拍照,荧光选择 FITC 和 Texas Red,用 ZEN 2.3 软件进行图像处理。

1.2.5 茶树精油对 MRSA 生物被膜形成过程中多糖黏附素(PIA)合成和胞外(eDNA)释放的影响 参照官妍等^[16]的方法,将用 TSB 培养基静置培养活化后的 MRSA 接种在含有不同浓度茶树精油(0.08%、0.04%、0.02% 和 0)的刚果红平板上。37 ℃ 静置培养 24 h 观察平板变黑的程度,实验重复 3 次。

eDNA 的提取参照 Kelly 等^[17]的方法, 将用 TSB 培养基活化后的 MRSA 用 TSB-g 培养基稀释后加到 24 孔板中, 然后加入不同浓度的茶树精油并使茶树精油的浓度分别为 0.16%、0.08%、0.04%、0.02% 和 0。静置培养 24 h, 加入 10 μ L 的 EDTA, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 1 h, 弃去培养基, 加入 700 μ L 的 TEN 缓冲液混匀, 测定 OD₆₀₀ 并记录, 然后将菌悬液移至新的 EP 管中, 12000 r/min 离心后将上清转入新的离心管中, 用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)分别萃取一次, 将上层水相加入 3 倍体积的 100% 乙醇与 1/10 体积的乙酸钠中, -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜后 18000 $\times$ g 离心 20 min, 弃去上清并加入预冷的 70% 乙醇洗涤, 风干, 并溶于 20 μ L TE 中, 用超微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度。eDNA 的相对表达量用单位生物被膜的 eDNA 含量来表示。

1.2.6 茶树精油对 MRSA 生物被膜形成相关基因的影响 MRSA 细菌生物被膜形成有多种相关的基因, 采用 Primer 5 软件设计 MRSA 生物被膜形成基因 *cidA*, *agrA* 的上下游引物(表 1)。将含有 0.08% 茶树精油的菌悬液(使用 TSB-g 培养基)在 6 孔板中静置培养 24 h, 使用 Simply P Total RNA Extraction Kit (Bioflux)试剂盒提取其总 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳验证提取 RNA 的完整性; 使用分光光度计测定 RNA 的浓度, 使用 Taraka 反转录试剂盒进行反转录反应, 最后使用 Taraka 荧光定量试剂盒进行 q-RT-PCR 扩增, 试验重复 3 次。

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primer

引物名称	序列	长度
icaA-F	GGCTGGACTCATATTGTAAAGTTGG	25
icaA-R	GTATTCCTCTGTCTGGGCTTG	22
cidA-F	TGTACCGCTAACTTGGGTAGAAGAC	25
cidA-R	CGGAAGCAACATCCATAATACCTAC	25
agrA-F	TGCGAAGACGATCCAAAACA	20
agrA-R	GGGCAATTTCATAGGCTTTTC	22
sarA-F	TGGTTCTCATCTCCCTTTGCTT	22
sarA-R	GCGATGCTAATCTTCTGGTG	21
16S-R	GCTCGTGTCTGAGATGTTGG	21
16S-F	TTTCGCTGCCCTTTGTATTGT	21

PCR 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 10 μ L, DNase/RNase-Free Water 6 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, ROX 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 60 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s。

1.3 数据处理

每组实验做 3 个平行对照, 所有实验数据均以平均值 $\pm$ 标准误差(SE)的形式表示。使用 SPSS 23.0 进行 *t* 检验确定所有数据的统计差异, *P*<0.05 的值被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 茶树精油对悬浮菌的抑制作用

茶树精油对悬浮菌具有良好的抗菌效果, 本研究测定了茶树精油对 MRSA 以及 12 株临床分离得到的金黄色葡萄球菌的 MIC 值与 MBC 值, 如表 2 所示, 茶树精油对 13 株金黄色葡萄球菌的 MIC 值在 0.08%~0.32% 之间, MBC 值在 0.16%~0.32% 之间。当一个药物对细菌的 MBC/MIC $\leq$ 4 时被认为是杀菌剂^[18]。对于本研究中的大多数菌株来说, 茶树精油对其的 MBC 值是 MIC 值的 2 倍, 因此, 茶树精油对本研究中的细菌具有杀菌作用。

表 2 茶树精油对金黄葡萄球菌的 MIC 值
Table 2 MIC of tea tree oil against *Staphylococcus aureus*

菌株	MIC值(%)	MBC值(%)
ATCC43300	0.32	0.32
S-1	0.16	0.32
S-2	0.08	0.16
S-3	0.16	0.16
S-4	0.16	0.16
S-5	0.16	0.16
S-6	0.16	0.16
S-7	0.16	0.16
S-8	0.16	0.16
S-9	0.32	0.32
S-10	0.16	0.16
S-11	0.16	0.32
S-12	0.16	0.32

2.2 茶树精油对 MRSA 生物被膜的影响

如图 1 所示, 0.64% 和 0.32% 浓度的茶树精油对 MRSA 生物被膜形成的抑制效果最明显, 基本没有形成生物被膜; 0.16% 的茶树精油对 MRSA 生物被膜形成的抑制也有显著效果, 在 24 和 48 h 时的抑制率分别达到 65.74% $\pm$ 0.97%(*P*<0.01)和 51.35% $\pm$ 2.13%(*P*<0.01); 0.04% 和 0.02% 的茶树精油对 MRSA 生物被膜的形成也有一定的抑制效果, 24 h 时抑制率分别达到 53.44% $\pm$ 0.47%(*P*<0.01)和 41.96% $\pm$ 1.81%(*P*<0.05)。从图 1 中可以看出, 茶树精油对 MRSA 生物被膜的形成有较强的抑制效果, 并呈现浓度依赖性。

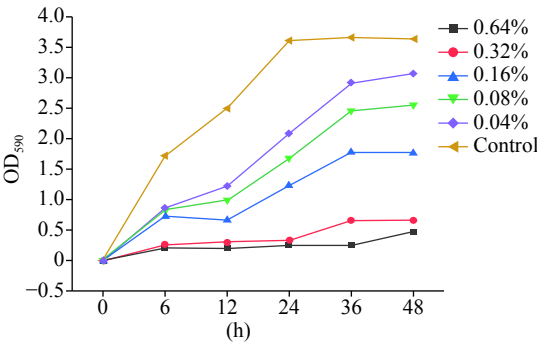


图 1 茶树精油对 MRSA 生物被膜生长的抑制效果
Fig.1 Inhibition effect of tea essential oil on MRSA biofilm growth

2.3 茶树精油对 MRSA 成熟生物被膜的清除作用

如图 2 所示, 茶树精油对 MRSA 成熟的生物被膜具有极显著的清除作用($P<0.01$), 与对照组相比, 0.02% 的茶树精油即可对 MRSA 的生物被膜产生一定的清除作用, 随着浓度的增高, 清除率也逐渐增高, 当茶树精油浓度达到 0.16% 时, 清除率达到 $92.55\% \pm 1.15\%$, 接近 100%。如图 3 所示, 激光共聚焦显微镜照片也显示出了茶树精油对 MRSA 成熟生物被膜的强大的清除作用, 随着茶树精油浓度的升高, 活细菌逐渐减少, 死细菌逐渐增多, 生物被膜逐渐稀疏。通常, 去除成熟的生物被膜比抑制其形成更加困难。因

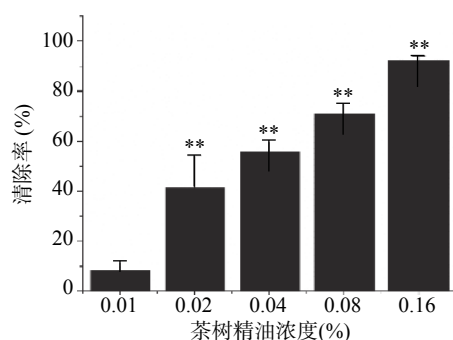


图 2 茶树精油对 MRSA 成熟生物被膜的清除作用

Fig.2 Clearance of tea tree oil against MRSA mature biofilm
注: 与对照组相比, **表示数据差异极显著, $P<0.01$; 图 5 同。

此, 茶树精油可以被认为是一种潜在的抗生物被膜剂, 因为它不仅可以抑制生物被膜的形成, 而且可以破坏成熟的生物被膜。所以有必要进一步研究茶树精油的抗生物被膜活性并阐明其作用机理。

2.4 茶树精油对 MRSA 生物被膜影响的初步机制探究

PIA 对于生物被膜形成的黏附阶段和聚集阶段具有重要的意义^[19]。PIA 与刚果红特异性反应变黑, 根据平板变黑的程度可以判断 PIA 产生量的多少。由图 4 可知, 随着药物浓度的增加, 黑色逐渐变浅, 表明 PIA 的合成量逐渐减少, 说明茶树精油可以抑制 MRSA 生物被膜中 PIA 的合成。

eDNA 是细菌在形成生物被膜过程中部分细菌裂解释放的生物被膜基质(EPS)重要组成成分^[20], 在生物膜形成的各个阶段都起着至关重要的作用, 包括初始细菌粘附、聚集、微菌落形成以及生物膜结构的确认^[21]。如图 5 所示, 茶树精油即可对 MRSA 生物被膜形成过程 eDNA 的释放有一定的抑制效果, 在茶树精油浓度为 0.16% 时, eDNA 的含量减少了 $91.25\% \pm 2.46\%$ ($P<0.01$)。并且抑制效果呈现浓度依赖性, 随着茶树精油浓度的增加, 抑制效果也变得更加明显。eDNA 以及 PIA 含量的降低说明细菌之间的黏附能力下降, 导致其生物被膜的完整性被破坏,

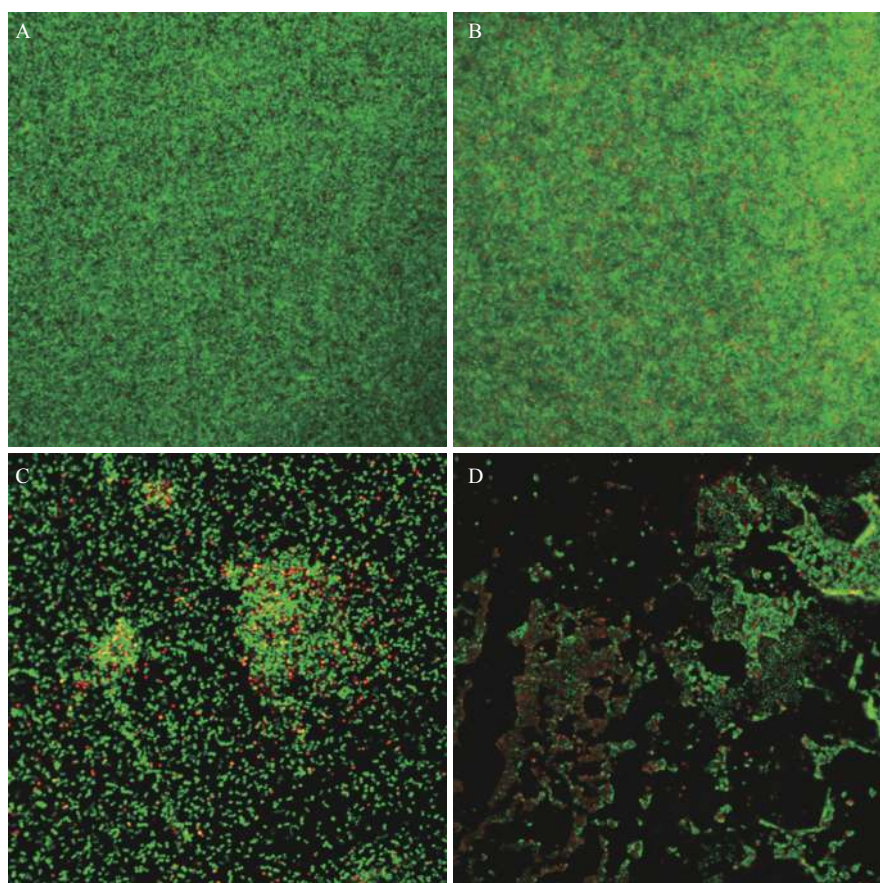


图 3 激光共聚焦显微镜下 MRSA 生物被膜图像

Fig.3 CLSM image of LIVE/DEAD stained MRSA biofilms grown on cell slide

注: A、B、C、D 中茶树精油浓度分别为 0、0.04%、0.08%、0.16%; 绿色代表活细菌, 红色代表死细菌。

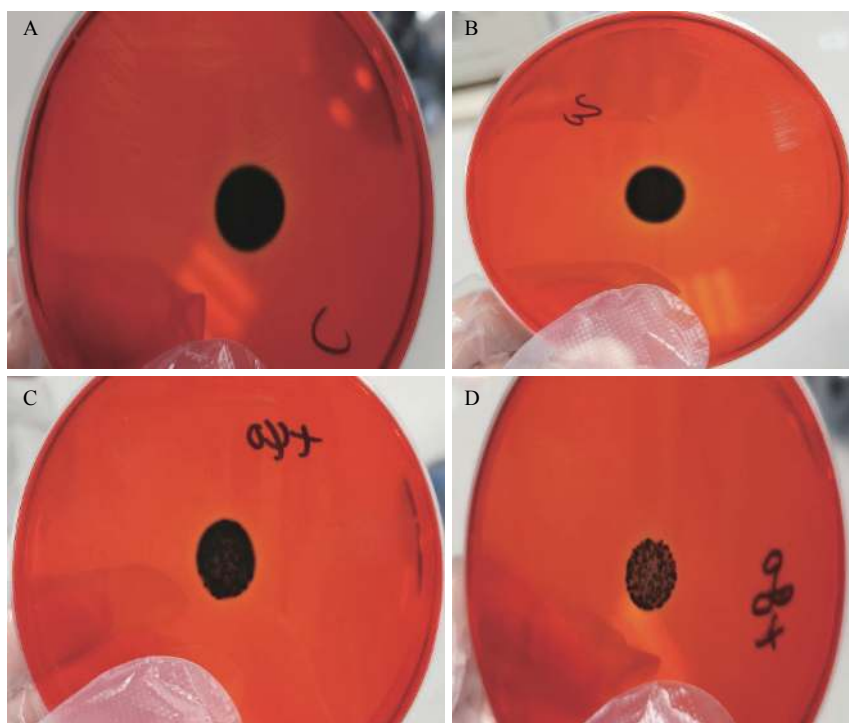


图 4 茶树精油对 MRSA 生物被膜中 PIA 的影响

Fig.4 Effect of tea tree oil on PIA in MRSA biofilm

注: A、B、C、D 中茶树精油浓度分别为 0、0.02%、0.04%、0.08%。

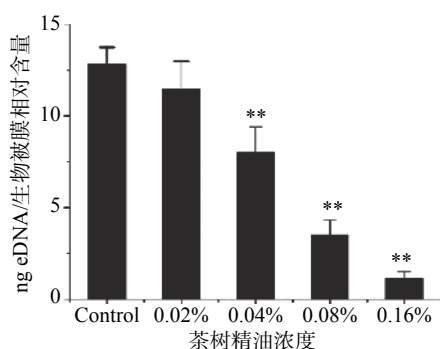


图 5 茶树精油对 eDNA 分泌的影响

Fig.5 Influence of tea tree oil effect on the secretion of eDNA

表现出抗生物被膜活性。因此,茶树精油可能通过 eDNA 的释放以及 PIA 的合成抑制 MRSA 生物被膜的形成。

生物被膜形成过程中关键的调控基因有 *agr*、*ica*、*cid*、*sar* 等。*agr* 主要调控细菌的群体感应系统,有研究证明 *agr* 是细菌群体感应系统(QS)的主要调控分子,对生物被膜的成熟阶段至关重要^[22]。*ica* 基因主要调控 PIA 的合成,同时也可以调节细菌之间的黏附和聚集^[23]。*cid* 主要调控细菌的程序性死亡与溶解,可以间接地参与调控 eDNA 的释放^[24]。*sarA* 是金黄色葡萄球菌的全局调控因子,主要调控金黄色葡萄球菌毒力基因的表达调控系统;*sarA* 可以和 *ica* 操纵子的启动子结合促进 *ica* 的表达,进而影响 PIA 的合成^[25]。采用荧光定量 PCR 对茶树精油对 MRSA 生物被膜形成过程中这些基因的表达的影响进行研究,使用 $2^{-\Delta\Delta t}$ 对基因的表达进行相对定

量,荧光定量 PCR 结果如表 3 所示。茶树精油作用后的 MRSA 细胞内 *agrA*、*cidA*、*sarA*、*icaA* 等基因的表达水平均下调,茶树精油对以上 4 种基因的表达均有显著的抑制作用,因此,茶树精油可能通过抑制 *agrA*、*icaA*、*cidA* 及 *sarA* 等基因的表达从而抑制的 MRSA 生物被膜中 eDNA 的释放以及 PIA 的合成,进一步表现出抗 MRSA 生物被膜活性。

表 3 茶树精油作用后 MRSA 部分基因表达量的变化
Table 3 Changes in the expression of some genes in MRSA treatment by tea tree essential oil

基因名称	对照组表达量	处理组表达量	表达量变化
<i>agrA</i>	1.000	0.320	-3.13±0.16
<i>cidA</i>	1.000	0.188	-5.31±0.19
<i>sarA</i>	1.000	0.474	-2.10±0.22
<i>icaA</i>	1.000	0.242	-4.13±1.11

3 结论

综上所述,茶树精油可以有效杀灭 MRSA 的悬浮菌,并具有强大的抗生物被膜作用,结晶紫半定量和激光共聚焦实验说明茶树精油不仅可以抑制生物被膜的形成,也可以有效地清除成熟的生物被膜。其可能的机理是茶树精油通过抑制 *agrA*、*icaA*、*cidA* 及 *sarA* 4 种基因的表达,从而抑制 MRSA 细菌生物被膜形成过程中 eDNA 的释放以及 PIA 的合成,由此降低生物被膜的粘附性,表现出抗生物被膜活性。同时,茶树精油本身也是一种良好的杀菌剂,对脱离了生物被膜的 MRSA 细菌也具有强大的杀灭作用。而关于茶树精油如何抑制生物被膜形成相关基因的表达仍需要进一步的深入研究。

参考文献

- [1] M Otto. Community-associated MRSA: What makes them special?[J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(6-7): 324-330.
- [2] Sahreena Lakhundi, Zhang Kunyan. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. *Clinical microbiology reviews*, 2018, 31(4).
- [3] Furukawa S, Kuchma S L, O'Toole G A. Keeping their options open: Acute versus persistent infections[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(4): 1211-1217.
- [4] Holder D, Berry D, Dai D, et al. A dynamic and complex monochloramine stress response in *Escherichia coli* revealed by transcriptome analysis[J]. *Water Res*, 2013, 47(14): 4978-4985.
- [5] Thien-Fah Mah. Biofilm-specific antibiotic resistance[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(9): 1061-1072.
- [6] Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance[J]. *J Infect Public Health*, 2017, 10(4): 369-378.
- [7] Ranall M V, Butler M S, Blaskovich M A, et al. Resolving biofilm infections: Current therapy and drug discovery strategies[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(11): 1375-1385.
- [8] Thomas Bjarnsholt, Ciofu Oana, Molin Søren, et al. Applying insights from biofilm biology to drug development—can a new approach be developed?[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12(10): 791-808.
- [9] 程峰, 尚若锋, 杨珍, 等. 茶树精油抗微生物作用机理研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 3(42): 331-337.
- [10] Zhao Xingchen, Liu Zonghui, Liu Zuojia, et al. Phenotype and RNA-seq-Based transcriptome profiling of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to tea tree oil[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018: 123304-123313.
- [11] Li Zhenbiao, Wang Nan, Wei Yingying, et al. Terpinen-4-ol enhances disease resistance of postharvest strawberry fruit more effectively than tea tree oil by activating the phenylpropanoid metabolism pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(24): 6739-6747.
- [12] Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, et al. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action[J]. *Antiviral Research*, 2011, 89(1): 83-88.
- [13] James P J, Callander J T. Bioactivity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against sheep lice (*Bovicola ovis* Schrank) in vitro[J]. *Veterinary Parasitology*, 2012, 187(3-4): 498-504.
- [14] Yusaku Koseki, Tanaka Rika, Murata Hiroshi. Development of antibacterial denture cleaner for brushing containing tea tree and lemongrass essential oils[J]. *Dental Materials Journal*, 2018, 37(4): 659-666.
- [15] Srdjan Stepanovic, Vukovic Dragana, Hola Veronika, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci[J]. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2007, 115(8): 891-899.
- [16] 官妍, 章九云, 汪长中, 等. 穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(14): 2147-2150.
- [17] Kelly C Rice, Ethan E Mann, Jennifer L Endres, et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(19): 8113-8118.
- [18] Pankey G A, Sabath L D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections[J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(6): 864-870.
- [19] Hannah Mc Carthy, Rudkin Justine K, Black Nikki S, et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015: 5.
- [20] Das T, Sehar S, Koop L, et al. Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91935.
- [21] Qin Zhiqiang, Ou Yuanzhu, Yang Liang, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Microbiology*, 2007, 153(7): 2083-2092.
- [22] Yao Yufeng, Vuong Cuong, Kocianova Stanislava, et al. Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: Quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense[J]. *The Journal of infectious diseases*, 2006, 193(6): 841-848.
- [23] Liu Meihui, Wu Xiaoxia, Li Jianke, et al. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the ica operon[J]. *Food Control*, 2017: 73613-618.
- [24] Adriana Renzoni, Barras Christine, Francois Patrice, et al. Transcriptomic and functional analysis of an autolysis-deficient, teicoplanin-resistant derivative of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(9): 3048-3061.
- [25] Valle J, Toledo Arana A, Berasain C, et al. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 48(4): 1075-1087.