

致病性与非致病性副溶血性弧菌在不同温度和接触材料表面生物被膜形成情况分析

赵爱静¹, 付娇娇¹, 宋雪迎¹, 孙晓红^{1,2,3}, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵勇^{*1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306)

摘要: 采用结晶紫染色法分析了致病性 (22 株) 与非致病性 (17 株) 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 在不同温度 (4, 10, 15, 25, 37 °C) 及不同接触材料 (聚苯乙烯、玻璃和不锈钢) 表面生物被膜的形成情况。结果表明, VP 生物被膜形成能力在高温条件下 (25, 37 °C) 明显强于低温条件 (4~15 °C), 25 °C 是生物被膜形成的最适温度。对比 3 种常见的接触材料, VP 在玻璃表面生物被膜形成能力最强, 聚苯乙烯表面次之, 不锈钢表面最弱。通过变异系数分析可知, 温度对 VP 生物被膜形成能力影响最大, 其次为接触材料。进一步分析发现, 致病性菌株生物被膜形成能力显著强于非致病性菌株 ($p < 0.05$)。研究表明: 致病性与非致病性 VP 在不同温度及接触材料表面生物被膜形成能力存在差异, 建议今后在食品加工过程中, 可通过控温或更换接触材料, 进而有效控制 VP 生物被膜导致的危害。

关键词: 副溶血性弧菌; 生物被膜; 温度; 接触材料

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)01—0007—08

Analysis of Biofilm Formation by Pathogenic and No-Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* at Various Temperatures and Contact Surfaces

ZHAO Aijing¹, FU Jiaojiao¹, SONG Xueying¹,
SUN Xiaohong^{1,2,3}, PAN Yingjie^{1,2,3}, ZHAO Yong^{*1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, crystal violet staining method was applied to quantify biofilm-forming ability of pathogenic ($n=22$) and no-pathogenic ($n=17$) *V. parahaemolyticus* on different contact materials (polystyrene, glass and stainless steel) with regard to various temperatures (4, 10, 15, 25

收稿日期: 2015-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571917, 31671779); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2015 第 4-8 号, 沪农科推字 2017 第 4-4 号); 上海市教委曙光计划(15SG48); 上海市教委科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056)。

* 通信作者: 赵勇 (1975—), 男, 湖北英山人, 理学博士, 教授, 主要从事食品安全与生物技术研究。E-mail: yzhao@shou.edu.cn

引用本文: 赵爱静, 付娇娇, 宋雪迎, 等. 致病性与非致病性副溶血性弧菌在不同温度和接触材料表面生物被膜形成情况分析[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(01): 07-14.

and 37 °C). The results showed that *V. parahaemolyticus* adhered better at high temperatures (25 and 37 °C) than that at low temperatures (4~15 °C). Meanwhile, 25 °C was the optimal temperature for biofilm formation of *V. parahaemolyticus*. Compared with the other two materials, the level of bacterial biofilm formation was highest on glass. Based on coefficient of variation (CV) analysis, it displayed that the increase in strain variability of biofilm formation caused by temperature was much greater than that caused by material. Further analysis of the results revealed that the pathogenic bacteria can adhere significantly ($p < 0.05$) better than no-pathogenic bacteria. Therefore, the biofilm formation of pathogenic and no-pathogenic bacteria was obvious difference at five temperatures under three contact surfaces. In future, the contamination caused by pathogenic *V. parahaemolyticus* biofilm can be controlled effectively through changing temperatures or contact materials during food processing.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, biofilm, temperatures, contact materials

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种常见的食源性致病菌,尤其在夏秋季节,因误食污染的水产品而引发的急性肠胃炎、原发性败血症等疾病时有发生,对食品安全构成了巨大威胁。国家食源性疾病监测网数据显示,VP引起的食物中毒,发生规模及人群暴露规模呈明显上升趋势,已高居我国微生物性食物中毒首位^[1]。在正常的少盐或无盐环境中,VP是不容易繁殖的,因此,在不利环境中极有可能以一种特殊的保持自身有利生存的状态存在,即生物被膜。

生物被膜(Biofilm, BF)指的是附着于各种载体表面的细菌细胞和包裹细菌的由细菌自身所分泌的含水聚合性基质所组成的结构性无柄细菌群落^[2]。食源性致病菌易在食品及其加工、运输和保藏设备的接触表面形成BF,并通过残留、接触、散播微生物或气溶胶的方式污染整个生产环境,随机性强、易被忽视^[3-5]。这些形成BF的微生物细胞自身可以分泌胞外多聚物(EPS),能增强微生物细胞对外界环境因素的抵抗能力,使得常规杀菌方法不能有效地彻底地灭菌,进而再次污染食品^[3,6]。美国国立卫生研究所(NIH)指出,人类细菌性感染约有65%是由BF引起的^[7]。

温度、pH、离子强度等环境条件,以及微生物生长的营养条件等,都会影响微生物BF的形成^[3,8]。近年来,食品接触材料对微生物BF形成能力的影响引起广泛关注。已有研究指出,食源性致病菌单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等易在常见的食品接触材料聚苯乙烯、玻璃、聚丙烯、不锈钢等

表面形成BF,给食品安全带来了极大风险^[9-10]。VP是一种海洋细菌,主要来源于鱼、虾、蟹、贝类等水产品。在这些水产品运输、加工及贮藏过程中,会直接或间接接触各种表面,如鱼缸、塑料运输盒、工器具、刀具、桌面、冰箱等,从而使VP易在玻璃、聚苯乙烯、不锈钢等材料表面附着形成生物被膜。法国报道称,60%的食源性疾病是由于生产加工过程中接触材料表面的微生物污染食品引起的^[11]。然而,关于VP在不同温度和食品接触材料交互作用下BF形成情况的研究鲜有报道。另外,Nilsson等^[12]发现致病血清型与非致病血清型单增李斯特菌BF形成能力的存在差异,而Lianou等^[13]则指出沙门氏菌BF的形成与其致病性血清型没有相关性。因此,作者模拟致病性与非致病性VP在食品工业中不同温度及食品接触表面BF的形成情况,旨在为通过食品加工环境对BF的有效控制提供理论,为食品安全提供保障。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

作者共检测了39株VP生物被膜形成情况,其中,致病性菌株22株,非致病性菌株17株(结果见表1)。

1.2 实验试剂与设备

结晶紫:美国sigma公司产品;SYBR Green I染料:北京索莱宝科技有限公司产品;24和96孔板:美国康宁公司产品;BioTek酶标仪:美国伯腾仪器有限公司产品;垂直流超净工作台、二级生物安全

柜:Esco China 公司产品;MIR154 高精度低温培养箱、MLS-3750 型高压灭菌锅:日本三洋电机生物医药株式会社产品;LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜:德国卡尔蔡司公司产品。

2 实验方法

2.1 菌株的活化

用平板划线法将-80℃冰箱内甘油管保藏的菌种接种至 TCBS 琼脂培养基,37℃过夜培养,挑取单菌落于 5 mL TSB(质量分数 3% NaCl)试管中,在 37℃、180 r/min 的摇床中培养 10 h,连续活化两次,作为接种液备用($A_{600\text{ nm}}=0.4$)。

2.2 BF 的培养

为研究不同食品接触表面对 BF 的影响,选用无菌的聚苯乙烯(简写 PS,直径 14 mm)、玻璃片(简写 GS,直径 14 mm)和不锈钢片(简写 SS,直径 12.5

mm)作为实验材料。将以上 3 种无菌的薄片分别置于 24 孔板中,并依次加入 990 μL 的 TSB(质量分数 3% NaCl),10 μL 的菌液($A_{600\text{ nm}}=0.4$),随后分别于 4、10、15、25 和 37℃培养箱内静置培养 48 h。

2.3 BF 形成能力的检测

采用结晶紫染色法对菌株 BF 形成能力进行检测^[4],并稍作修改。在 PS 和 GS 两种材料表面的 BF 培养结束后,弃掉菌液,用无菌 PBS 轻轻洗涤 3 次,以除去未粘附的细菌;待室温晾干后,加 1 mL 质量分数 0.1%的结晶紫染色 30 min;染色结束后,用无菌水冲洗以去除多余染液,洗涤 3 次,室温风干;最后加入 1 mL 体积分数 95%的乙醇洗脱附着的结晶紫。在 600 nm 下测定洗脱液的吸光值。在 SS 表面的 BF 培养结束后,移取 SS 片至新的 24 孔板内重复上述步骤。其中每个样品重复 6 个孔,以未接种菌液放置 PS、GS、SS 片的孔板重复上述操作作为空白对照。

表 1 实验中所用菌株
Table 1 Strains used in this study

致病性菌株			非致病性菌株		
编号	基因型	来源	编号	基因型	来源
VP-S1	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S8	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S2	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S13	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-C3	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	中国科学院微生物研究所	VP-S14	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S4	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S15	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-C5	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	中国科学院微生物研究所	VP-S16	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S6	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S17	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S9	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S18	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S11	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S19	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S12	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S20	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S22	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S21	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S23	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S25	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S24	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S33	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S26	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S34	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S27	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S35	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S28	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S36	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S29	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S37	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S30	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)	VP-S38	<i>tdh-/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)
VP-S31	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)			
VP-S32	<i>tdh+/trh-/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)			
VP-C7	<i>tdh-/trh+/tlh+</i>	中国科学院微生物研究所			
VP-S10	<i>tdh-/trh+/tlh+</i>	本实验室分离(河虾)			
VP-C39	<i>tdh+/trh+/tlh+</i>	美国疾病控制与预防中心			

2.4 激光共聚焦显微镜(CLSM)的观察

BF 经 PBS 轻轻洗 3 次, 去除未附着的细胞, 用体积分数 4% 戊二醛溶液固定 30 min, 之后用 PBS 溶液冲洗 3 遍, SYBR Green I 染料避光染色 30 min, PBS 溶液清洗 3 次, 取片, 在 CLSM 下观察。

2.5 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件对获得的数据进行单因素方差分析(ANOVA), 检验水平为 $p < 0.05$ 时为差异显著, 具有统计学意义, 并用 origin 8.0 作图。另外, 变异系数(Coefficient of Variation, CV)的计算公式为: 变异系数 $CV = (\text{标准偏差 SD} / \text{平均值 Mean}) \times 100\%$ 。

3 结果与分析

3.1 不同温度条件下 VP 菌株 BF 形成情况分析

VP 在不同温度条件下 BF 形成情况见表 2 和图 1。低温 4、10、15 °C 是水产品低温贮藏中常用温度, 高温 25、37 °C 是适于 VP 生成的环境温度。由表 2 可知, 在 PS 表面, 低温条件下(4~15 °C), 33.3%~48.7% 的 VP 生成 BF; 高温条件下(25、37 °C), 94.9% 以上的 VP 形成 BF。在低温和 37 °C 条件下, 仅生成弱粘附性 BF; 在 25 °C 条件下, 则生成强、中粘附性 BF, 分别占 1.28% 和 1.0%。由图 1(a)可知, 25 °C 条件下 BF 形成能力较强, 且 VP-S36 菌株在此条件下 BF 形成量明显强于其他菌株。总的来说, 在 PS 表面, 低温条件下, VP 成膜能力较弱, 25 °C 条件下最强, 37 °C 条件下相对较强。

在 GS 材料表面, 4~37 °C 条件下, 分别有 15 (38.5%)、25 (64.1%)、29 (74.4%)、35 (89.7%) 和 38 (97.4%) 株 VP 生成 BF。此结果表明随着温度的升高, VP 生成 BF 能力逐渐增强。Bonaventura 等^[15]研究指出, 在 4~37 °C 变化范围内, 单增李斯特菌 BF 形成能力逐渐增强, 与本研究结果相似。VP 在 4、10 °C 条件下, 仅生成弱粘附性 BF; 在 15、37 °C 条件下, 分别有 2 株和 14 株 VP 生成中粘附性 BF; 在 25 °C 条件下则 15 株生成中粘附性 BF, 2 株生成强粘附性 BF。菌株 VP-S36 在此条件下 BF 形成量明显强于其他菌株。结合图 1(b)可知, 25 °C 条件下, VP 成膜能力较强, 37 °C 次之, 低温较弱。

在 SS 材料表面, 4~37 °C 条件下, 成膜菌株数量分别为 18、14、28、29 和 19 株。在低温条件下生成的 BF 均呈弱粘附性, 在高温条件下均仅有 1 株 VP

生成中粘附性 BF。由图 1(c)可知, 25 °C 条件下 VP 成膜能力较强。因此, 在 SS 材料表面, 4 °C 和 10 °C 条件下, BF 形成能力较弱, 37 °C 条件下 VP 成膜能力稍强, 15 °C 和 25 °C 条件下 VP 成膜能力较强。

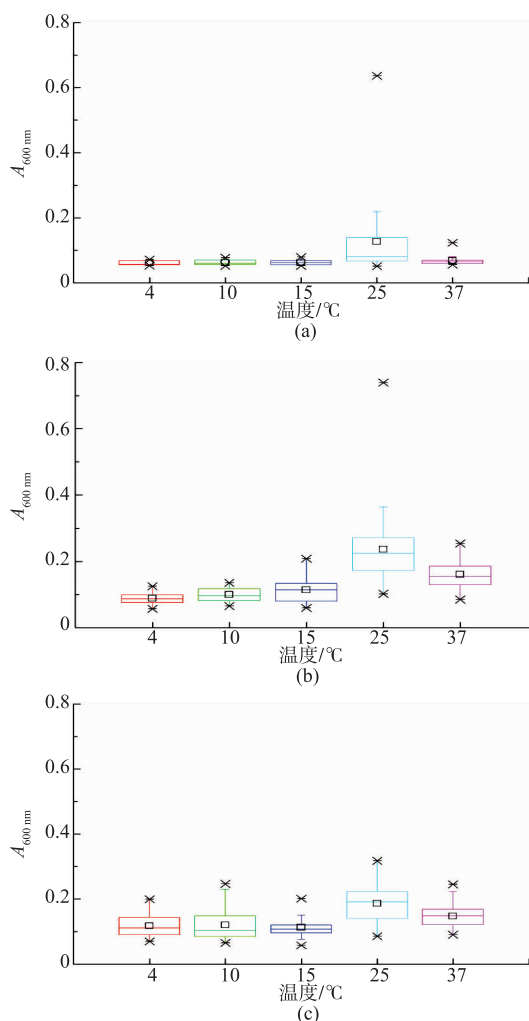


图 1 不同温度及聚苯乙烯(PS,A)、玻璃(GS,B)、不锈钢(SS,C)表面 VP 菌株 BF 生成量的箱形分布图

Fig. 1 Boxplots of biofilm formation by *V. parahaemolyticus* at different temperatures on polystyrene (PS,A), glass(GS,B) and stainless steel(SS,C)

鞭毛是细菌的运动器官, 在 BF 形成过程中扮演者重要角色, 温度的变化会影响鞭毛的生成, 从而影响 BF 的形成^[16]。在低温(4~15 °C)下, VP 自身生长迟缓, 鞭毛的运动受到抑制, 这可能是低温 BF 生成能力较弱的重要因素。25 °C 是 VP 菌株 BF 形成的最佳温度, 在此条件下可形成强粘附的 BF, 可能是由于 25 °C 适宜 VP 生长, 在此温度下鞭毛生长较快, 促进了胞外多糖、胞外蛋白等胞外物质的分

泌,进而利于BF的生成。在37℃条件下,VP虽能维持生存但形成BF能力相对较弱,这可能是胞外酶类物质对高温敏感的原因所致^[4]。因此,建议在以后的食品加工、运输及保藏过程中通过控制温度抑制VP菌株BF的形成,进而降低因其污染而引发的食品风险。

通过变异系数分析可知,温度影响VP菌株BF形成能力的变异性,其变异系数从大到小排序为:CV(25℃)>CV(37℃)>CV(10℃)>CV(15℃)>CV(4℃),表明25℃对VP成膜能力变异性影响最大。Lianou等认为,沙门氏菌成膜能力变异性在25℃最小^[13],与结论相反。说明不同种属的细菌,温度对其BF形成能力变异性的影响存在很大差异。

3.2 不同材料表面VP菌株BF形成情况分析

在低温条件及不同接触材料表面VP菌株BF形成情况见表2。在4℃条件下,分别有48.7%、38.5%、46.2%的VP在PS、GS和SS表面生成BF。因此,在4℃条件下,VP更易在PS材料表面粘附,其次是SS表面,最后是GS表面。在10℃条件下,GS表面64.1%的VP生成BF,而PS和SS材料表面

成膜菌株所占比例相对较低,仅有33.3%和35.9%的VP形成BF。说明在10℃条件下,VP在GS材料表面粘附性较强,在PS和SS材料表面粘附性明显较弱。在15℃条件下,PS、GS和SS3种材料表面VP成膜菌株所占比例分别为41.0%、74.4%和71.8%。其中,在GS材料表面,2株VP形成了中粘附性BF。因此,在15℃条件下,VP在GS材料表面成膜能力较强,其次是SS表面,最后是PS表面。

在高温条件及不同接触材料表面VP菌株BF形成情况如下:从表2可知,在25℃条件下,PS材料表面,29株VP生成弱粘附性BF,5株VP生成中粘附性BF,4株VP生成强粘附性BF;在GS材料表面,18株、15株、2株VP分别生成弱、中、强粘附性BF;在SS材料表面,28株VP生成弱粘附性BF,1株VP生成中粘附性BF,无强粘附性BF的生成。由此可见,在25℃条件下,SS材料表面VP成膜能力较弱。在37℃条件下,PS表面37株VP形成弱粘附性BF;在GS材料表面,24株VP生成弱粘附性BF,14株生成中粘附性BF;在SS材料表面,19株VP生成BF,其中1株形成中粘附性BF。该结果

表2 不同温度及接触材料表面VP菌株BF的形成情况

Table 2 Biofilm formation of *V. parahaemolyticus* on different surfaces at various temperatures

材料	温度 ℃	不粘附/%	弱粘附/%				中粘附/%			强粘附/%			形成 BF/%		
		NT	WT	WP-	WP+	MT	MP-	MP+	ST	SP-	SP+	T	TP-	TP+	
PS	4	20(51.3)	19(48.7)	12(30.8) A	7(17.9) B	-	-	-	-	-	-	19(48.7)	12(30.8) A	7(17.9) B	
	10	26(66.7)	13(33.3)	6(15.4) A	7(17.9) A	-	-	-	-	-	-	13(33.3)	6(15.4) A	7(17.9) A	
	15	23(59.0)	16(41.0)	7(17.9) B	9(23.1) A	-	-	-	-	-	-	16(41.0)	7(17.9) B	9(23.1) A	
	25	1(2.6)	29(74.4)	14(35.9) A	15(38.5) A	4(10.3)	-	4(10.3)	5(12.8)	3(7.7)	2(5.1)	38(97.4)	17(43.6) B	21(53.8) A	
	37	2(5.1)	37(94.9)	17(43.6) B	20(51.3) A	-	-	-	-	-	-	37(94.9)	17(43.6) B	20(51.3) A	
GS	4	24(61.5)	15(38.5)	7(17.9) A	8(20.5) A	-			-	-	-	15(38.5)	7(17.9) A	8(20.5) A	
	10	14(35.9)	25(64.1)	11(28.2) B	14(35.9) A	-			-	-	-	25(64.1)	11(28.2) B	14(35.9) A	
	15	10(25.7)	27(69.2)	11(28.2) B	16(40.0) A	2(5.1)		2(5.1)	-	-	-	29(74.4)	11(28.2) B	18(46.2) A	
	25	4(10.3)	18(46.1)	5(12.8) B	13(33.3) A	15(38.5)	8(20.5)	7(17.9)	2(5.1)	2(5.1)		35(89.8)	15(38.5) B	20(51.3) A	
	37	1(2.6)	24(61.5)	10(25.7) B	14(35.9) A	14(35.9)	7(17.9)	7(17.9)	-			38(97.4)	17(43.6) B	21(53.8) A	
SS	4	21(53.8)	18(46.1)	5(12.8) B	13(33.3) A	-	-	-	-	-	-	18(46.1)	5(12.8)B	13(33.3) A	
	10	25(64.1)	14(35.9)	3(7.7) B	11(28.2) A	-	-	-	-	-	-	14(35.9)	3(7.7) B	11(28.2) A	
	15	11(28.2)	28(71.8)	11(28.2) B	17(43.6) A	-	-	-	-	-	-	28(71.8)	11(28.2) B	17(43.6) A	
	25	12(30.8)	27(69.2)	8(20.5) B	19(48.7) A	-	-	-	-	-	-	27(69.2)	8(20.5) B	19(48.7) A	
	37	21(53.8)	18(46.1)	5(12.8) B	13(33.3) A	-	-	-	-	-	-	18(48.2)	5(12.8) B	13(33.3) A	

NT,所有不粘附菌株;WT,所有弱粘附菌株;WP-,弱粘附非致病性菌株;WP+,弱粘附致病性菌株;MT,所有中粘附菌株;MP-,中粘附非致病性菌株;MP+,中粘附致病性菌株;ST,所有强粘附菌株;SP-,强粘附非致病性菌株;SP+,强粘附致病性菌株;T,所有成膜菌株;TP-,所有成膜非致病性菌株;TP+,所有成膜致病性菌株。A与B表示致病性菌株与非致病性菌株在同一条件下BF形成能力的显著性差异($p<0.05$)。

表明,在 37 ℃条件下,GS 表面成膜能力较强,PS 表面次之,SS 表面较弱。综上所述,VP 在 GS 材料表面粘附性较强,在 PS 表面相对较强,在 SS 材料表面较弱。

VP 带负电荷,极易与带正电的材料相结合,而 GS 带正电荷,故在 GS 表面其 BF 形成能力较强。Meira 等^[17]研究指出在疏水性材料-聚丙烯表面,金黄色葡萄球菌 BF 能力强于亲水性材料 SS 表面 BF 形成能力,与本研究 VP 在疏水材料 PS 比在亲水材料 SS 表面更易粘附的结果相类似。Rodriguez 和 Litzler^[18-19]等研究表明菌株在 SS 表面成膜能力与粗糙度无关,同样,本研究中 SS 不光滑的表面并未影响 VP 生物被膜的形成。Bonsaglia 等^[16]发现单增李斯特菌在 SS 材料表面可形成强粘附性 BF,在 GS 表面大都形成弱粘附性 BF,与作者研究结果相反。说明细菌在不同材料表面形成 BF 的能力与其所在菌属有很大关系。VP 在 37 ℃下,PS 和 GS 表面成膜能力较强,而 SS 表面较弱,仅有 19 株 VP 形成 BF。该现象的原因可能是,较 PS 与 GS,SS 是一种导热性良好的材料,在高温 37 ℃的交互作用下抑制 VP 鞭毛的生成,进而降低 BF 的形成^[16,20]。因此,在食品加工过程中,可通过改换食品接触材料的方式有效控制 VP 菌株 BF 导致的危害。

由变异系数 CV 值可知,CV (PS)=74.17%,CV (GS)=56.15%,CV (SS)=35.99%,说明对比 3 种材料,PS 表面菌株 BF 形成能力的变异性最大。由表 2 可知,在 PS 表面,低温条件下低于 50%的 VP 形成 BF,而高温条件下超过 94.9%的 VP 形成 BF,成膜 VP 菌株数量波动范围较大;在 GS 表面,4~37 ℃变化范围内,成膜菌株数量波动规律,呈逐渐上升趋势;在 SS 表面,成膜菌株数量波动范围较小。因此,PS 材料对 VP 成膜变异性影响最大。此外,对影响 BF 生成的外界因素进行了变异系数分析,结果显示,CV(温度)=157.4%,CV(接触材料)=43.4%,说明温度对 VP 成膜影响最大,其次是接触材料。综上所述,在食品加工环境中,不仅要注意接触材料表面的卫生,更要注意控制环境温度,以降低 BF 污染引发的食品风险。

3.3 致病性菌株与非致病性菌株 BF 形成情况

致病性菌株与非致病性菌株 BF 形成情况见表 2。对于弱粘附性 BF,在 PS 表面,主要是由致病性菌株形成的;在 GS 表面,4~37 ℃条件下,致病性 VP

成膜菌株数量是非致病性 VP 的 1 倍以上,尤其是 25 ℃条件下,达 2 倍以上;在 SS 表面,15 ℃条件下,弱粘附致病性 VP 是弱粘附非致病性 VP 的 1.5 倍,其他温度下则多于 2 倍。对于中粘附性 BF,在 15 ℃、GS 表面及 25 ℃、PS 表面均为致病性菌株形成的;在 25 ℃和 37 ℃、GS 表面,一半由致病性菌株生成,一半由非致病性菌株生成。对于强粘附性 BF,在 PS 表面,3 株为非致病性菌株形成,2 株为致病性菌株形成;GS 表面则均为非致病性菌株形成。总体来说,致病性菌株成膜能力明显强于非致病性菌株 ($p<0.05$),这可能与致病性、非致病性菌株对同一外界环境应激反应不同有关。Nilsson 等^[12]指出,致病性 1/2a 血清型单增李斯特菌成膜能力更强。综上,致病性 VP 成膜能力强于非致病性 VP,这一特性从侧面说明了为何 VP 高居微生物性食物中毒首位。

低温环境中,致病性 VP 成膜能力的变异性大于非致病性菌株;25 ℃条件下,非致病性菌株成膜能力的变异性更大;37 ℃条件下,致病与非致病性菌株成膜能力的变异性无明显差别。由此可见,低温对致病性菌株成膜能力影响性更大,25 ℃对非致病性菌株成膜能力影响更大,37 ℃对致病与非致病菌株成膜能力影响类似。由表 3(b)可知,较致病性菌株,非致病性菌株在接触材料表面成膜能力的变异性更大,其中 PS 表面对非致病性菌株成膜能力的变异性影响最大。因此,致病与非致病性菌株成膜能力的变异性受温度和材料的影响,应加强对温度的控制及接触材料表面卫生的监管,避免因 BF 污染而导致中毒事件发生。

3.4 VP-S36 在玻璃表面生物被膜 CLSM 的检测

为进一步验证上述实验结果,特选取典型菌株 VP-S36(见图 1),对其在 GS 表面不同温度条件下形成的三维立体 BF 结构进行 CLSM 观察(如图 2)。在 4 ℃下几乎所有细胞呈单细胞分布,细胞无明显聚集状态,荧光强度最弱;在 10 ℃下大部分细胞则呈单细胞分布,少数细胞聚集,荧光强度较弱;在 15 ℃下部分细胞聚集成簇,荧光强度明显弱于 25 ℃和 37 ℃;在 25 ℃下形成了较厚的 BF,几乎覆盖了 GS 材料表面,荧光强度最强;在 37 ℃下形成了多细胞聚集的 BF,该结构覆盖了大部分的材料表面,荧光强度较强。由 CLSM 观察结果可知:VP-S36 在 25 ℃和 37 ℃条件下有大量 BF 形成,在 25 ℃下 BF 形成能力最强,在低温条件下成膜能力明显减弱。VP-

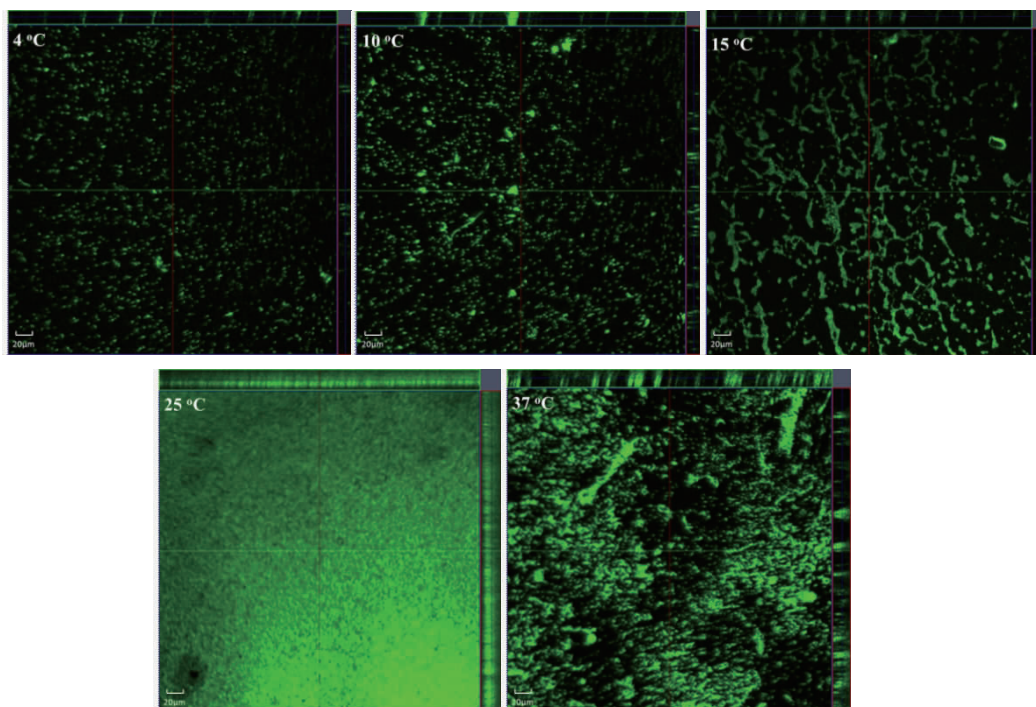


图 2 不同温度下菌株 VP-S36 生物被膜 CLSM 图片

Fig. 2 CLSM images of VP-S36 strain biofilm formed at different temperatures.

S36 在 CLSM 下观察到的 BF 结构与结晶紫染色法半定量的结果一致。因此,温度对 VP 菌株 BF 的形成产生一定的影响,低温条件下 BF 的形成能力较弱,37 °C 条件下,菌株成膜能力较强,25 °C 条件下,菌株成膜能力

4 结 语

首次阐释了 VP 在 5 个温度、3 种接触材料表面 BF 的形成情况,结果显示,低温环境中 VP 生成 BF 能力较弱,37 °C 条件下 BF 能力相对较强,25 °C

条件下更适于 VP 菌株 BF 的形成;GS 表面 BF 形成能力较强,其次是 PS 表面,最后是 SS 表面;影响 BF 形成的外界因素中,温度影响最大,其次为接触材料。另外,致病性菌株成膜能力强于非致病菌株。因此,建议今后在食品加工过程中,可通过控温或改变接触材料的方式以降低致病性 VP 菌株 BF 形成而引发的食品风险。此研究不仅可为后续 VP 菌株 BF 形成特性的深入研究奠定基础,而且可为食品加工企业进一步控制和清除食品接触材料表面产生的 BF 提供理论依据。

参考文献:

- [1] TIAN Mingsheng, ZHENG Leijun, PENG Shaojie, et al. Analysis and measures on collective food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai municipality during 2000-2007[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2008, 20(6): 514-517. (in Chinese)
- [2] QI Hanying, WANG Wenbin, ZHENG Yu, et al. Mechanism of biofilm formation and analysis of influencing factors[J]. **Microbiology**, 2013, 40(4): 677-685. (in Chinese)
- [3] SREY S, JAHID I K, HA S D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern [J]. **Food Control**, 2013, 31(2): 572-585.
- [4] ABDALLAH M, BENOLIEL C, DRIDER D, et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments[J]. **Archives of Microbiology**, 2014, 196(7): 453-472.

- [5] HUANG Baowei, ZHANG Hongmei, LIU Xuelu, et al. Different patterns of biofilm formation and effect of sub-MIC disinfectant on biofilm formation of foodborne pathogens[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5): 757-760. (in Chinese)
- [6] KIM H S, PARK H D. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [J]. **Plos One**, 2013, 8(9): e76106.
- [7] POTERA C. Forging a link between biofilms and disease[J]. **Science**, 1999, 283: 1837-1839.
- [8] PAGEDAR A, SINGH J, BATISH V K. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2010, 50(S1): S98-S106.
- [9] OULAHAL N, BRICE W, MARTIAL A, et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products [J]. **Food Control**, 2008, 19(2): 178-185.
- [10] SCHLISSELBERG D B, YARON S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella Typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine[J]. **Food Microbiology**, 2013, 35(1): 65-72.
- [11] BRIDIER A, SANCHEZ V P, GUILBAUD M, et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens [J]. **Food Microbiology**, 2015, 45: 167-178.
- [12] NILSSON R E, ROSS T, BOWMAN J P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2011, 150(1): 14-24.
- [13] LIANOU A, KOUTSOUMANIS K P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2012, 160(2): 171-178.
- [14] LAURA B R, LUCIANA R S, VINICIUS Z C, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *E. coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry slaughterhouse[J]. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010, 41: 1082-1085.
- [15] DI B G, PICCOLOMINI R, PALUDI D, et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2008, 104(6): 1552-1561.
- [16] BONSAGLIA E C R, SILVA N C C, JUNIOR A F, et al. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures[J]. **Food Control**, 2014, 35(1): 386-391.
- [17] Da Silva Meira Q G, de Medeiros Barbosa I, Athayde A J A A, et al. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers [J]. **Food Control**, 2012, 25(2): 469-475.
- [18] RODRIGUEZ A, AUTIO W R, McLandsborough L A. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation[J]. **Journal of Food Protection®**, 2008, 71(1): 170-175.
- [19] LITZLER P Y, BENARD L, BARBIER F N, et al. Biofilm formation on pyrolytic carbon heart valves: influence of surface free energy, roughness, and bacterial species[J]. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, 2007, 134(4): 1025-1032.
- [20] TATSUO A L M. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces [J]. **Nature**, 1992, 355: 182-184.