文章编号: 1673-1689(2011)05-0757-04

不同食源微生物生物被膜形成特征及亚致死浓度消毒剂对菌体成膜的影响

黄宝威, 张宏梅*, 刘学禄, 谢丽斯
(广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 研究 4 种细菌在体外不同培养条件下形成生物膜的能力, 并探索了亚致死质量浓度消毒剂对细菌生物成膜的影响。在不同营养物质浓度和培养条件下以及不同质量浓度的季铵盐下, 以微孔板法检测菌体成膜性。高温、低浓度的葡萄糖和 NaCl 促进菌体形成生物膜, 高质量浓度葡萄糖和 NaCl、较高的培养温度, 成膜受到抑制。菌体成膜受到多种因素的影响, 合理控制食源微生物生物被膜的形成, 是促进食品安全和卫生的重要手段。

关键词: 生物被膜; 亚抑菌浓度; 消毒剂
中图分类号: Q 813 文献标识码: A

Different Patterns of Biofilm Formation and Effect of Sub-MIC Disinfectant on Biofilm Formation of Foodbore Pathogens

HUANG Bao-wei, ZHANG Hong-mei*, LIU Xue-lu, XIE Li-si
(Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The objective of this study is to investigate the biofilm formation of four kinds of different bacteria in vitro under different culture conditions and the effect of sub-MIC disinfectant on biofilm formation. For this, biofilm formation were tested by microtiter-plate method under the different nutrient conditions, temperature and pH, as well as different concentration of quaternary ammonium compounds. the results demonstrated that biofilm formation was identified widely among food pathogens. Furthermore, high temperatures, low concentration of glucose and sodium chloride increased the production of biofilm. From the above results, a conclusion could be made: Biofilm formation was influenced by many factors. Control of the production of biofilm was important for food safety in the food processing.

Key words: biofilm, subMIC, disinfectant

生物被膜是指细菌粘附于接触表面, 分泌多糖 基质、纤维蛋白、脂质蛋白等, 将其自身包绕其中而

收稿日期: 2010-10-16
基金项目: 国家自然科学基金项目(20707003); 广东省 211 重点学科广东工业大学轻工化工学院创新人才项目; 广东省大学生创新实验项目(2010044)。
* 通信作者: 张宏梅(1975-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工学博士, 副教授, 主要从事微生物耐药机制方面的研究。Email: hmzhang@gdut.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

形成的大量细菌聚集膜样物[1]。几乎所有的食源微生物在一定的条件下都能形成生物被膜。生物被膜的形成是菌体对消毒剂产生耐药的原因之一。据报道,生物被膜可提高细菌对杀菌剂的抵抗能力50~5000倍。在食品、食品加工设备等富含营养物质的潮湿材料的表面,残留的微生物往往容易形成生物被膜。带来影响食品安全和卫生的隐患[2]。生物被膜的形成受菌种、菌量、接触表面类型、营养条件和生长环境等诸多因素的影响,从而呈现出厚薄不均、粘附牢固程度不同等的状态。了解这些因素对生物被膜形成的影响可为研究生物被膜的生理生化以及控制生物被膜的形成提供技术和理论支持。作者采用微孔板法研究4种食源微生物生物被膜的形成特征,并探索了亚致死浓度季铵盐类消毒剂对生物被膜形成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用4种食源微生物分别是铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* B_1、*Pseudomonas aeruginosa* B_2、*Pseudomonas aeruginosa* B_3、金黄色葡萄球菌 *Staphyloccocus aureus* B_4、*Staphyloccocus aureus* B_5、*Staphyloccocus aureus* B_6、鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumanniis* B_7、*Acinetobacter baumanniis* B_8、*Acinetobacter baumanniis* B_9、乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* B_{10}、*Lactobacillus acidophilus* B_{11}、*Lactobacillus acidophilus* B_{12},全部为作者所在实验室保存。胰酶大豆肉汤(TSB):北京奥博星生物技术责任有限公司;细胞培养板(96孔):美国 Corning Costar 公司;酶标仪(Model 680):Bio-Rad 公司。消毒剂:苯扎溴铵,市售。

1.2 菌液的制备

将细菌活化后,接种于3% TSB中,37 ℃隔夜培养至活菌数达到约 10^8 cfu/mL 备用。

1.3 生物成膜的检测

参照文献[4]并做一些改进。96孔板加入200 μL的TSB,过夜培养物按1∶100稀释后接种至96孔板。空白对照只加TSB。培养结束后,在630 nm处测培养板的吸光度 A_{630}。然后弃去培养板中的培养基,用含0.1 g/dL蛋白胨的生理盐水洗涤培养板3次,在空气中干燥30 min[4]。然后向孔中加入100 μL 1%的番红染色15 min,轻轻洗涤培养板,直至水中无颜色,干燥30 min。然后向孔中加入100 μL 95%的乙醇,脱色15 min,在490 nm测培养板的吸光度 A_{490}[5]。成膜能力用 A_{490}/A_{630} 来表示,平行3次实验。

1.3.1 不同营养条件下细菌生物被膜生长情况

在25 ℃下,在TSB培养基中分别添加不同质量浓度的葡萄糖(0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 g/dL)、以及不同质量浓度的NaCl(0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 g/dL),培养48 h后探讨菌体形成生物膜的情况。

1.3.2 不同培养条件下细菌生物被膜生长情况

温度的测定为分别在25、30、37、42 ℃ 4个温度培养菌体,培养48 h后,测量各种菌株的成膜能力;培养时间的测定为在温度为25 ℃的TSB培养基中,分别培养24、48、72 h后测量菌株的成膜能力;pH值的测定为1 mol/L的NaOH或者1 mol/L的盐酸调节TSB培养基的pH值分别为4.0、7.0、9.0,测量各菌株在不同pH值下生物膜形成的情况。

1.4 MIC值的确定

MIC值由药敏实验确定。菌种在37 ℃下培养至稳定期,然后将其制成与0.5麦氏比浊液相同浊度的菌悬液。将菌悬液按1∶1 000稀释接种至含不同浓度苯扎溴铵(BE)的培养基中,混匀,37 ℃培养18 h,观察结果。MIC值为试验中无可见菌生长的苯扎溴铵浓度[6-7]。

1.5 不同浓度消毒剂对生物成膜的影响

由MIC值设定不同的苯扎溴铵浓度,37 ℃培养48 h,来探索消毒剂对生物成膜的影响。

2 结果与讨论

2.1 培养基中葡萄糖和氯化钠浓度对食源微生物生物成膜的影响

氯化钠和葡萄糖对12株菌的成膜影响分别见图1,2。

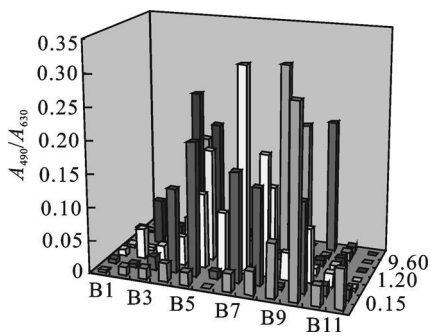


图1 NaCl质量浓度对菌体成膜的影响

Fig.1 Biofilm formation of stains at 25 ℃ at different sodium concentrations

对3株铜绿假单胞菌和2株菌金色葡萄球菌来讲,随着NaCl质量浓度的增加,3株菌的成膜能力

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加强, 在 2 4 g/ dL 成膜能力达到最大, 之后随着 NaCl 质量浓度的增加, 成膜能力下降。而葡萄球菌 B6 和鲍曼不动杆菌 B7, B8 的最适成膜浓度在 0. 6 g/ dL。3 株乳杆菌随着 NaCl 质量浓度的增加, 成膜能力下降, 可见, 高质量浓度的 NaCl 抑制其成膜。在葡萄糖影响菌体成膜的因素探讨中, 发现 12 个菌株中, 除了一株鲍曼不动杆菌 B7 随着葡萄糖质量浓度增加成膜能力下降外, 在一定的葡萄糖质量浓度范围内, 随着葡萄糖质量浓度的升高, 成膜能力加强。在最适成膜质量浓度之后, 随着质量浓度增加, 成膜能力下降。而不同的菌株最适成膜对应的葡萄糖质量浓度不同, 没有种属的规律。

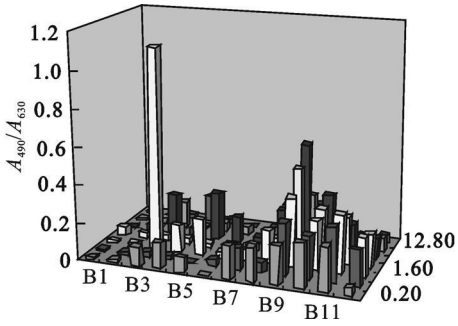


图 2　葡萄糖质量浓度对菌体成膜的影响

Fig. 2　Biofilm formation of stains at 25 ℃ at different glucose concentrations

2 2　培养条件生物被膜生长的影响

培养的温度对生物被膜形成影响见图 3。由结果可知, 在各个菌株中, 25、30、37、42 ℃ 4 个温度中, 其中铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和乳杆菌随着培养温度的增加, 成膜能力增强, 42 ℃下的成膜能力最大。而金色葡萄球菌随着温度的升高成膜能力下降。

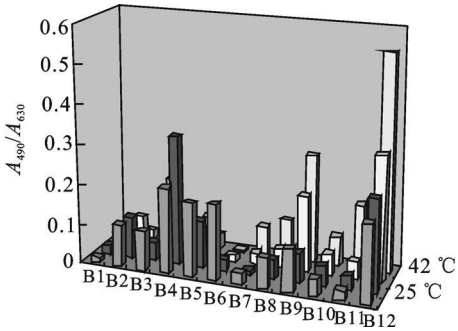


图 3　培养温度对菌体成膜的影响

Fig. 3　Biofilm formation of stains at different temperature

在不同的 pH 值下生物被膜的形成见图 4。3 株铜绿假单胞菌随着 pH 值的增大成膜能力下降。而 3 株乳杆菌随着 pH 值的增加成膜能力增强。金黄色葡萄球菌和 3 株鲍曼不动杆菌在中性条件下成膜能力较好。

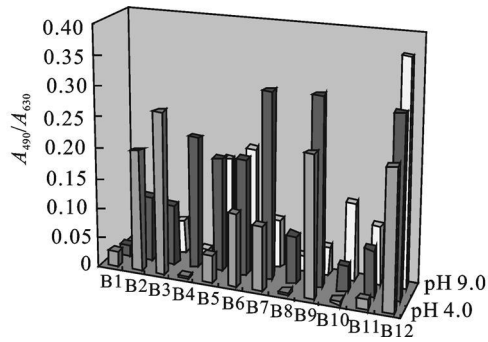


图 4　pH 值大小对菌体成膜的影响

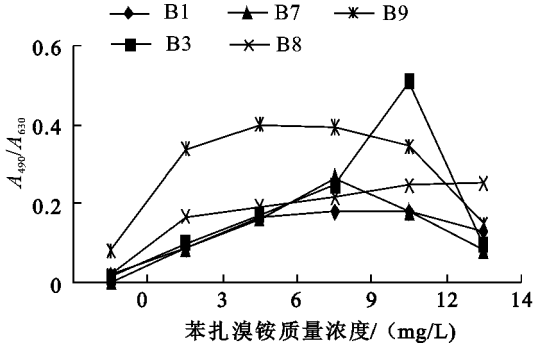
Fig. 4　Biofilm formation of stains at different pH

2 3　菌株的季铵盐药敏实验

经药敏实验得知, B_4、B_5、B_6、B_{10}、B_{11}、B_{12} 这 6 株菌的 MIC 为 10 mg/ L, B_1、B_3、B_7、B8、B_9 这 5 株菌的 MIC 为 15 mg/ L, B_2 的 MIC 为 20 mg/ L。

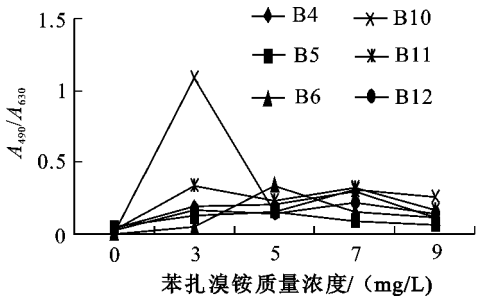
2 4　不同质量浓度消毒剂对生物成膜的影响

B_4、B_5、B_6、B_{10}、B_{11}、B_{12} 组在苯扎溴铵质量浓度为(0, 3, 5, 7, 9 mg/ L) , B_1、B_3、B_7、B8、B_9 组苯扎溴铵质量浓度梯度为(0, 3, 6, 9, 12, 14 mg/ L) , B2(0, 3, 7, 11, 15, 19 mg/ L) , 中的生物被膜形成情况见图 5。从结果看出, 所有的菌株均具有同样的成膜规律: 当消毒剂的质量浓度小于 MIC 时, 随着消毒剂质量浓度的增加, 细菌的生长的确受到部分抑制(各个菌体 A_{630} 依次减小) , 但是其成膜性能依次增强。如在 B2 组中, 在质量浓度小于 12 mg/ L 时, 随着季铵盐质量浓度的增加, 菌体生物被膜的形成能力加强; 在质量浓度大于 12 mg/ L 时, 生物被膜的形成受到抑制。在 B4 组中, 除了 B6 菌株外(最适成膜季铵盐质量浓度为 5 mg/ L) , 其它菌株在小于 7 mg/ L 时, 随着季铵盐质量浓度的增加, 菌体生物被膜的形成能力加强; 在质量浓度大于 7 mg/ L 时, 生物被膜的形成受到抑制添加消毒剂的实验组比未添加消毒剂的对照组生物成膜性都好。这与枉前等报道的亚抑菌质量浓度抗生素对生物成膜有促进作用的结论相似[8]。



(a)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



(b)

图 5 不同质量浓度的季铵盐对菌体成膜的影响

Fig. 5 Biofilm formation of stains at different quaternary ammonium compounds concentration

3 结 语

食源微生物生物被膜的形成受到多种因素的影响。添加葡萄糖有利于促进菌体生物膜形成, 高质量浓度葡萄糖成分抑制菌体成膜。低质量浓度的氯化钠可促进菌体形成生物膜, 但高于某质量浓度, 就抑制菌体成膜。42 ℃的培养温度有利于菌体生物膜大量形成, 低温不利于生物膜的形成。亚致死剂量的消毒剂刺激生物被膜的形成。因此, 在食品加工工业中, 为了有效预防自然环境中食源微生物造成食品的腐败变质, 应尽可能做好食品原材料的清洗或防腐处理, 可添加高质量浓度的氯化钠和保持低温来进行保藏。而且对于加工设备和包装材料也应进行清洗杀菌处理, 减少糖分残余。添加消毒剂的质量浓度也应避免亚致死剂量的处理, 降低生物被膜的形成。

参考文献(References):

[1] Elvers K T, Leeming K, Lappin H M. Binary and mixed population biofilms: Time-lapse image analysis and disinfect, n with biocides[J]. **J Industr Microbiol Biotechnol,** 2002 (29): 331- 338.

[2] 陈一资, 胡滨. 动物性食品中兽药残留的危害及其原因分析[J]. 食品与生物技术学报. 2009, 9(28): 162- 166.
CHEN Yi-zi, HU Bin. Reasons and harm of animal medicine remainderr to animal material food[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 9(28): 162- 166. (in Chinese)

[3] 段韵涵, 韩北忠, 杨葆华, 等. 培养条件对金黄色葡萄球菌生物被膜生长的影响[J]. 中国酿造, 2008(3): 17- 20.
Duan Yun-han, Han Bei-zhong, Yang Bao-hua, et al. Effect of cultivation conditions on growth of *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. **China Brewing,** 2008(3): 17- 20. (in Chinese)

[4] Tone M R, Solveig L, Askild H, et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions[J]. **International Journal of Food Microbiology,** 2007, 116: 372- 383.

[5] Lucia R, Gary A, Narelle F A. Comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method[J]. **J Microbio Method,** 2007(69): 44- 51.

[6] Chunhan KO, Chiyu Huang, Shoupin Hsieh, et al. Characterization of two quaternary ammonium chloride-resistant bacteria isolated from papermaking processing water and the biocidal effect on their biofilm formation[J]. **International Biodeterioration & Biodegradation,** 2007(60): 250- 257.

[7] Chiyu Huang, Shoupin Hsieh, Pei-An Kuo, et al. Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system[J]. **International Biodeterioration & Biodegradation,** 2009(63): 998- 1007.

[8] 枉前, 孙凤军, 夏培元. 亚抑菌浓度抗生素对细菌生物膜形成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(4): 200- 204.
WANG qian, SUN Feng-jun, XIA Pei-yuan. Effects of sub-MIC antibiotics on bacterial biofilms formation[J]. **Chinese Journal of Antibiotics,** 2009, 34(4): 200- 204. (in Chinese)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net