

不同条件对阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成的影响

郝旭昇, 张晓荣, 郭都, 郑占文, 孙怡, 夏效东, 石超

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 本研究旨在探究不同生长温度(12 °C、25 °C、37 °C)、培养基质(胰蛋白胨大豆肉汤、婴幼儿乳粉肉汤)和接触材料(不锈钢、玻璃、硅胶)对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29004 生物被膜形成的影响。研究首先通过活菌计数法评估不同条件下阪崎克罗诺肠杆菌粘附及生物被膜中的活菌量反映菌体粘附及成膜能力; 随后借助场发射扫描电镜观测不同因素对菌体生物被膜微观结构的影响; 最后分析不同条件下形成的生物被膜对三种季胺类消毒剂的抗性。结果表明: 25 °C和 37 °C下阪崎克罗诺肠杆菌的粘附菌量和生物被膜形成量高于 12 °C, 菌体在胰蛋白胨大豆肉汤中的生物被膜形成量高于在婴幼儿乳粉肉汤中的形成量, 37 °C时硅胶材料表面粘附菌量高于不锈钢和玻璃材料, 其他条件下菌体在三种材料表面粘附和生物被膜形成量无明显差异; 阪崎克罗诺肠杆菌在 25 °C和 37 °C形成了致密且立体的生物被膜结构, 12 °C生物被膜为单层结构, 三种材料表面生物被膜结构呈现出明显差异; 阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜对消毒剂的抗性取决于菌体的生长温度、接触材料及消毒剂的种类。综上所述, 生长温度、培养基质和接触材料对阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成均有影响, 调节生长条件和选择接触材料对于控制阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的形成具有重要意义。

关键词: 阪崎克罗诺肠杆菌; 生物被膜; 生长温度; 接触材料; 消毒剂; 场发射扫描电镜

文章编号: 1673-9078(2018)10-179-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.025

Effects of Different Conditions on the Biofilm Formation of *Cronobacter Sakazakii*

HAO Xu-sheng, ZHANG Xiao-rong, GUO Du, ZHENG Zhan-wen, SUN Yi, XIA Xiao-dong, SHI Chao

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The present study investigated biofilm formation of *C. sakazakii* ATCC 29004 at various growth temperatures (12 °C, 25 °C and 37 °C), incubation medium (tryptone soya broth and infant formula broth) and surface material (stainless steel, glass and silicone). Firstly, attachment and biofilm formation were evaluated by viable counting method. The micro-structure of biofilm formed by *C. sakazakii* were confirmed by field emission scanning electron microscope. In addition, the effects of growth temperature and surface type on the biofilm resistance to disinfectants were also determined. The results showed that higher temperatures (25 °C and 37 °C) induced stronger attachment and biofilm formation than 12 °C, the bacterial biofilm formed better in tryptone soy broth than in infant formula broth. The silicone surface had significantly stronger attachment than stainless steel and glass at 37 °C, but there was no differences in attachment and biofilm formation on different materials at other conditions. *C. sakazakii* formed flat and thin biofilms when growing at 12 °C, but *C. sakazakii* formed compact and thick biofilms at 25 °C and 37 °C. The biofilm structure were different at three different surface materials. The biofilm resistance to disinfectants is affected by growth temperature, incubation medium and surface type. The results indicated that the growth temperature, incubation medium and surface material were important to control biofilm formed by *C. sakazakii*.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; biofilm; growth temperature; surface material; disinfectants; field emission scanning electron microscope

阪崎克罗诺肠杆菌 (*Cronobacter sakazakii*, *C.*

收稿日期: 2018-06-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2452017228); 中国博士后科学基金项目(2017M623256)

作者简介: 郝旭昇(1996-), 男, 本科, 研究方向: 食源性致病菌生物被膜的清除

通讯作者: 石超(1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食源性致病菌的控制

sakazakii) 是一种无芽孢、杆状、兼性厌氧、周生鞭毛的革兰氏阴性菌, 属于肠杆菌科克罗诺菌属^[1]。阪崎克罗诺肠杆菌是近年来备受关注的一种食源性条件致病菌, 它能导致新生儿及免疫力低下的成人患有可致命的菌血症、脑膜炎和坏死性小肠结肠炎, 致死率高达 50%^[2,3]。据报道, 阪崎克罗诺肠杆菌常从土壤、奶粉、肉类、奶酪、谷物、巧克力工厂和奶粉加工厂等样品及环境中分离得到^[4,5], 婴幼儿配方乳粉及其相

关生产设备被认为是阪崎克罗诺肠杆菌传播、污染的主要途径^[6]。

生物被膜是指在细菌与接触表面或细菌本身之间相互作用下,菌体通过增殖、分泌胞外基质而形成的具有一定空间结构的聚集体^[7]。生物被膜导致更多致病菌的粘附并造成交叉污染,中国食源性疾病预防网显示,27%的食品污染是由食品生产、加工、储存设备表面的生物被膜所造成^[8]。除此之外,生物被膜为致病菌提供了物理屏障,保护其免受消毒剂、热等环境压力的损伤和机体免疫杀伤^[9],这使得病原菌致病能力增强,人体感染风险增大。研究显示,阪崎肠杆菌可在多种材料表面粘附并形成生物被膜^[10],这使得阪崎克罗诺肠杆菌易于定植在婴幼儿食品加工设备、婴幼儿食品包装器具、食用器皿、搅拌工具的表面,这增大了它感染婴幼儿的风险^[11]。

食源性致病菌在加工接触面形成生物被膜是一个动态演变过程^[12],在该过程中诸多因素均会对菌体粘附和生物被膜产生重要影响。许多研究表明,细菌得失电子的能力、表面疏水性能、菌体的聚集性和泳动能力与细菌的粘附和生物被膜的形成相关^[13]。除菌体自身特性外,生长温度、营养基质、pH值、NaCl浓度、接触面的材质类型等因素也会影响细菌的粘附和生物被膜形成过程^[11,14]。探明影响菌体粘附及生物被膜形成的因素及规律对理解菌体生物被膜的形成过程和控制生物被膜具有重要的意义。

目前关于阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的研究主要集中在评价病原菌生物被膜的形成能力,但对不同条件(生长温度、培养基质、接触材料)对菌体生物被膜的形成及对消毒剂的抗性的影响缺乏探讨。基于目前存在的问题,本研究以阪崎克罗诺肠杆菌为研究对象,以12℃、25℃和37℃为生长温度,以胰蛋白胨大豆肉汤和婴幼儿乳粉肉汤为培养基质,以不锈钢、玻璃、硅胶三种材料为接触材料,探究以上不同条件对菌体粘附和生物被膜形成的影响;同时,借助场发射扫描电镜观测阪崎克罗诺肠杆菌在不同培养温度和材料表面形成生物被膜的空间结构;最后,分析不同条件对菌体耐受三种季胺类消毒剂的影响。本研究旨在发现生长温度、培养基质和接触材料对阪崎克罗诺肠杆菌菌体粘附及生物被膜形成的影响规律,为阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌种、培养基与化学试剂

阪崎克罗诺肠杆菌(*C. sakazakii*) ATCC 29004

购于美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

二甲基亚砜(色谱纯)、玻璃珠(直径为425-600 μm)、苯扎氯铵、双十烷基二甲基氯化铵、吐温80、皂素、无水硫代硫酸钠、L-组氨酸、卵磷脂购于美国sigma试剂公司;丙酮、戊二醛购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

细菌生化培养箱 SPX-250B,上海南荣实验室设备有限公司;离心机 5804R,德国 Eppendorf 公司;场发射扫描电子显微镜 S-4800,日本 Hitachi 公司。

1.3 方 法

1.3.1 菌株活化与菌悬液制备

菌株活化与菌悬液制备参考石超等^[15]的方法,将菌体使用磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffer solution, PBS, pH=7.2)清洗并悬浮,调整菌悬液中菌体浓度约为 10^8 CFU/mL。最后将菌悬液稀释10000倍,使菌体浓度为 10^4 CFU/mL备用。

1.3.2 不同营养基质及温度下稳定期菌体的制备

试验参照 Kim 等^[11]的方法制备稳定期菌体。首先将婴幼儿配方乳粉与蒸馏水以1:10(m/v)的比例混合,加热到50至60℃下溶解,121℃下高压灭菌15 min后制备为婴幼儿乳粉肉汤(Infant formula broth, IFB)。随后分别取一定量1.3.1中制备的菌悬液接种于其百倍体积的TSB或IFB中,置于12℃、25℃及37℃下培养,在37℃下于TSB和IFB中均培养1 d,25℃下于TSB和IFB中各培养2 d,12℃下于TSB培养6 d,IFB培养8 d,使各处理组下菌体生长达到稳定期(菌悬液浓度约为 10^9 CFU/mL)。

1.3.3 阪崎克罗诺肠杆菌的粘附定量检测

试验前须对三种接触材料进行清洗,具体程序如下:将不锈钢(食品级304不锈钢,50 mm×20 mm,4号光洁面)、玻璃(钢化高温高压玻璃,50 mm×20 mm)、硅胶(医用食品级)置于丙酮溶液中超声10 min,使用无菌水漂洗后再用无水乙醇浸泡,随后取出样品用蒸馏水再次洗涤,高压蒸汽灭菌15 min后备用。取1.3.2中菌悬液30 mL于载有不锈钢,玻璃,硅胶的离心管中至恰好浸没接触材料上端,将其于12℃、25℃及37℃下恒温静置,分别于1、2、4、8、12和24 h规定时间内取样,依次用400 mL无菌水漂洗15 s,200 mL无菌水漂洗5 s,随后将样品放入含有3 g玻璃珠及30 mL PBS的离心管中,充分涡旋5 min以使粘附菌体

脱落。取涡旋后上清液，使用 PBS 进行 10 倍梯度稀释，后将其涂布于 TSA 平板上，于 37 °C 下恒温培养 24 h 后计算菌体数量，结果以 log CFU/cm² 表示。

1.3.4 阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成的定量检测

将 1.3.2 中制备的菌悬液离心(4000 r/min, 15 min, 4 °C)后，去上清，使用 PBS 洗涤菌体沉淀三次，随后使用一定量 PBS 悬浮菌体，并调整菌体浓度为 10⁷ CFU/mL。将不锈钢、玻璃、硅胶置于含有 30 mL 菌悬液的离心管中，于 4 °C 下静置 24 h，随后取出样品分别使用 400 mL 无菌水漂洗 15 s、200 mL 无菌水漂洗 5 s，将洗涤后的样品放入含有 30 mL TSB 或 IFB 的离心管中，于 12 °C、25 °C 及 37 °C 下恒温静置培养，分别于 0、2、4、6、8 和 10 d 规定时间内取样，再次使用前述方法清洗样品，将不锈钢，玻璃，硅胶三种生物被膜形成材料放入含有 3 g 玻璃珠和 30 mL PBS 的离心管中，充分涡旋 5 min 以使粘附菌体脱落。吸取涡旋后的上清液，使用 PBS 进行 10 倍梯度稀释后涂布，将 TSA 平板置于 37 °C 下恒温培养 24 h，计算菌体数量，结果以 log CFU/cm² 表示。

1.3.5 场发射扫描电镜观察生物被膜微观结构

参照石超等^[15]和王虎虎^[16]的方法，利用场发射扫描电镜观察生物被膜微观结构，并略有修改。菌悬液制备参照 1.3.2，使用 PBS 洗涤菌体并调整菌悬液浓度为 10⁷ CFU/mL。将菌悬液加入分别载有不锈钢、玻璃、硅胶的离心管中，于 4 °C 下恒温静置 24 h，使用蒸馏水两次漂洗后将样品放入含有 TSB 的离心管中，在 12 °C，25 °C 及 37 °C 下培养 48 h。规定时间下取样漂洗，经 2.5% 戊二醛溶液 4 °C 固定过夜后，使用无菌水和 PBS 依次洗涤，随后使用 1% (V/V) 钼酸将菌体再次固定 5 h，利用不同浓度梯度 (30%、50%、70%、80%、90% 和 100%) 的乙醇进行洗脱，每次处理时间为 10 min。最后将处理后的样品镀金，使用场发射扫描电镜 (4000×) 观察 12 °C、25 °C 和 37 °C 下不锈钢、玻璃、硅胶表面细菌生物被膜的微观结构。

1.3.6 细菌生物被膜对消毒剂抗性的测定

细菌生物被膜对消毒剂抗性的测定参照 Abdallah 等^[17]的方法，并略作修改。首先，菌液制备同 1.3.2，取上述菌液离心 (4000 r/min, 15 min, 4 °C) 后，去上清，使用 PBS 洗涤菌体沉淀三次后，使用一定量 PBS 悬浮菌体，并调整菌体浓度约 10⁷ CFU/mL。取上述菌悬液于分别载有不锈钢、玻璃、硅胶的离心管中，4 °C 下静置 24 h，使用无菌水漂洗样品两次。随后将其放入含有 30 mL TSB 的离心管中，分别于 12 °C、

25 °C 及 37 °C 下恒温培养，48 h 后取出样品，使用蒸馏水漂洗两次，分别浸没于三种消毒剂液体 (30 mL) 中 15 min (消毒剂产品见表 1)，随后取出样品浸没于中和液 (L-组氨酸 1 g/L, 皂素 30 g/L, 卵磷脂 30 g/L, TSB 30 g/L, 吐温 80 30 g/L, 无水硫代硫酸钠 5 g/L) 中以终止消毒剂作用。将样品置于装有 3 g 玻璃珠，30 mL PBS 的离心管中充分涡旋，吸取菌悬液进行 10 倍梯度稀释后涂布，将平板置于 37 °C 恒温培养箱中，于 24 h 后取样计算菌体数量，结果以 logCFU/cm² 表示。

表 1 消毒剂产品的种类和特性

Table 1 Type and characteristic of disinfectant products

消毒剂种类	抗菌成分	终浓度/(10 ⁶ g/mL)	处理时间 /min
产品 1	双十烷基二甲基氯化铵	137.5	15
产品 2	苯扎氯铵	625	15
产品 3	双十烷基二甲基氯化铵	125	15
	苯扎氯铵	475	

1.4 数据处理

数据表示为平均值±标准差 (n=3)，同时使用 SPSS 软件 (version 20.0, Inc., Chicago, IL) 进行统计分析，并采用 Duncan's ANOVA 进行结果间显著性检验，p≤0.05 为显著。

2 结果与讨论

2.1 生长温度、培养基质和接触材料对阪崎克罗诺肠杆菌粘附的影响

阪崎克罗诺肠杆菌在 12 °C、25 °C 及 37 °C 条件在三种材料表面粘附的定量检测结果如图 1 所示。结果表明：培养温度对菌体粘附有显著影响。在 TSB 和 IFB 两种培养基质中，12 °C 下阪崎克罗诺肠杆菌粘附菌量均明显低于 25 °C 及 37 °C。12 °C 下菌体在 TSB 中 1 h 粘附菌量约 4.5 log CFU/cm²，在 IFB 中 1 h 粘附菌量约为 3.2 log CFU/cm²，而在 25 °C 和 37 °C 下阪崎克罗诺肠杆菌的粘附能力接近，起始粘附菌量约 5.0 log CFU/cm²。

同时，根据图 1 我们发现，阪崎克罗诺肠杆菌的粘附菌量受培养基质影响。在 12 °C 条件下，菌体在 TSB 中的粘附菌量在检测的 24 h 内高于其在 IFB 中的粘附菌量。

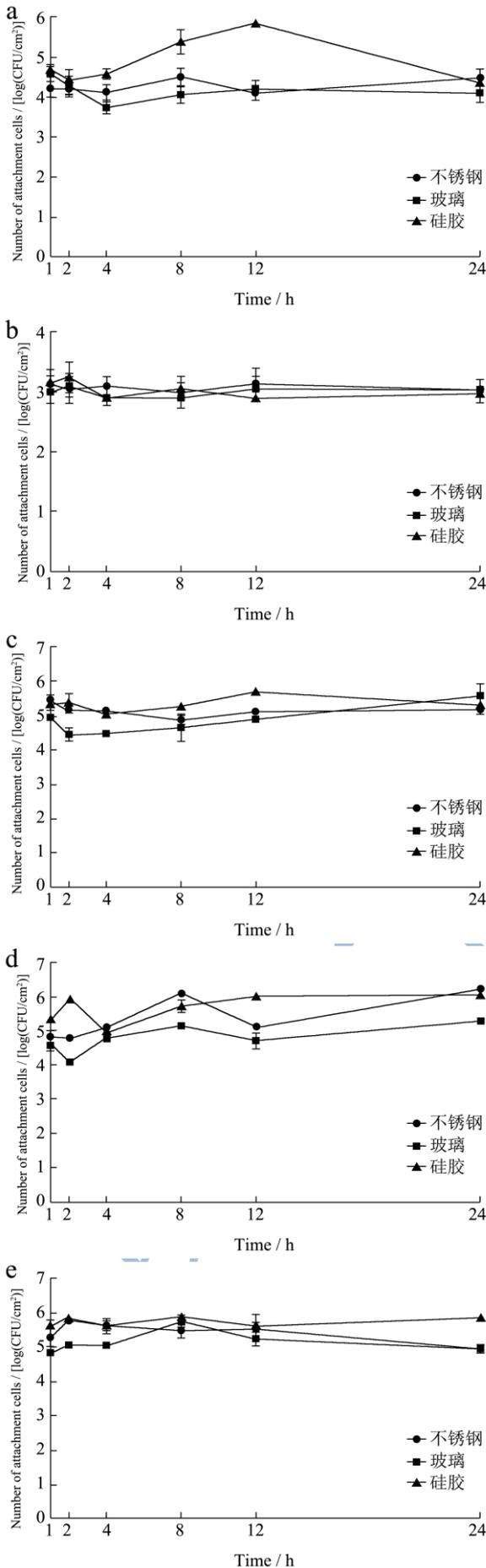


图1 阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29004 在不锈钢、玻璃、硅胶表面的粘附菌量

Fig.1 The cell number of *C. sakazakii* ATCC 29004 attached to the surface of stainless steel, glass and silicone

注: a-f 生长温度分别为 12 °C、25 °C、37 °C; 下标 1、2 培养基质分别为 TSB 和 IFB。

在 25 °C 条件下, 菌体在 TSB 中在三种材料表面的粘附菌量在 24 h 时相近, 约 5.2 log CFU/cm²。菌体在 IFB 中的粘附菌量在三种材料表面存在差异, 其中在不锈钢和硅胶表面的粘附菌量约为 6.0 log CFU/cm², 在玻璃表面的粘附菌量约为 5.3 log CFU/cm²。在 37 °C 条件下, 菌体在不锈钢和硅胶材料表面在 IFB 中的粘附菌量均大于在 TSB 中的粘附菌量。此外, 材料表面对于菌体粘附也有一定的影响。由图 1c 和 1f 可知, 菌体在 37 °C 条件下的 TSB、IFB 中, 硅胶表面粘附菌量最大, 玻璃的粘附菌量最小。在 25 °C IFB 中 (图 1d), 阪崎克罗诺肠杆菌也表现出在玻璃表面的粘附能力最弱。在其他条件下, 菌体在三种材料表面的粘附菌量无明显差异。综上所述, 阪崎克罗诺肠杆菌在 37 °C 条件下的 IFB 中, 硅胶表面的粘附菌量最大。

2.2 生长温度、培养基质和接触材料对阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成的影响

阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成定量检测结果如图 2 所示。结果表明, 温度对阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的形成有显著影响。与 25 °C 和 37 °C 相比, 阪崎克罗诺肠杆菌在 12 °C 下的初始粘附菌量最少, 且该温度下生物被膜形成最为缓慢, 8d 后生物被膜形成量趋于稳定。在 25 °C 的 TSB 和 IFB 中, 菌体在三种材料表面的生物被膜形成量在 0~2 d 快速增加, 随后趋于稳定。37 °C 条件下不同介质、不同材料中阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成量均在第 2 d 达到最大值, 随后呈下降趋势。对比 2 d 内生物被膜形成量, 菌体在 25 °C 的 TSB 中的生物被膜形成能力最强。

同时,由图2可知,阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的形成受培养基质影响。在本研究检测的3个温度条件下,阪崎克罗诺肠杆菌在TSB中生物被膜形成能力强于IFB。此外,除在37℃的IFB中,菌体在10d的成膜量在玻璃表面最小,其他条件下,菌体在三种表面的生物被膜形成量无稳定的变化趋势,最终表现出各材料表面生物被膜在第10d的形成量几乎相同。

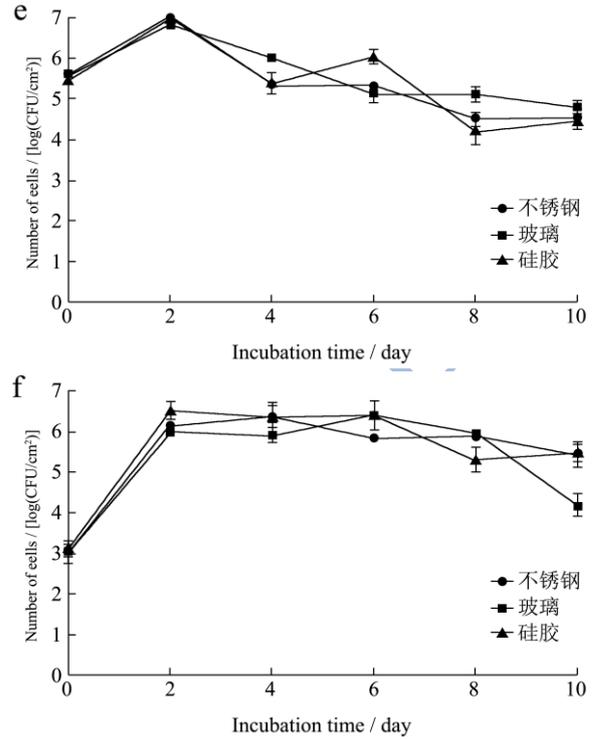
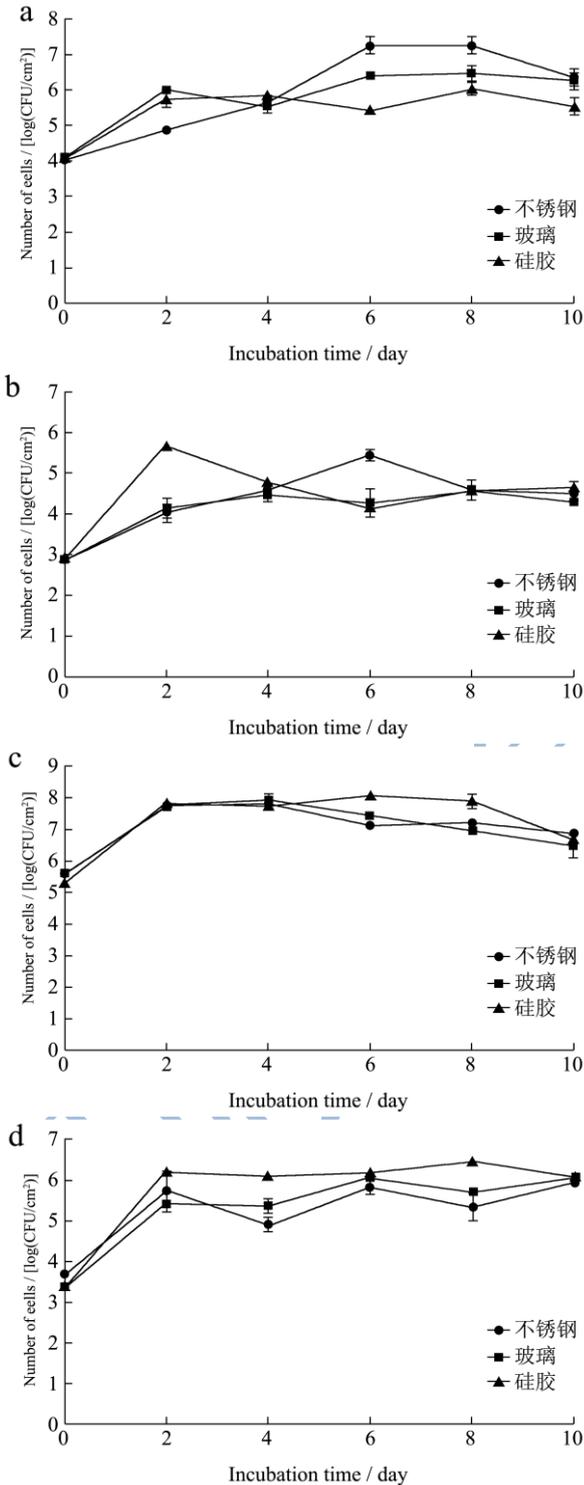


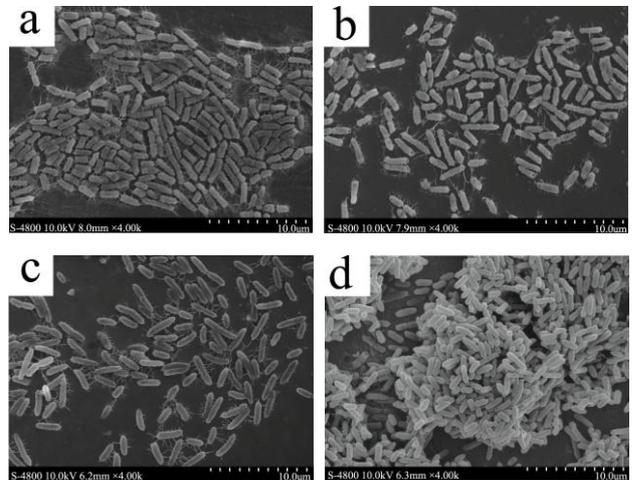
图2 阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29004 在不锈钢、玻璃、硅胶表面生物被膜的形成量

Fig.2 The cell number of biofilm formed by *C. sakazakii* ATCC 29004 on the surface of stainless steel, glass and silicone

注: a~f 生长温度分别为 12℃、25℃、37℃; 下标 1、2 培养基质分别为 TSB 和 IFB。

2.3 生长温度和接触材料对阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜微观结构的影响

试验利用场发射扫描电镜观察阪崎克罗诺肠杆菌在不锈钢、玻璃、硅胶表面生物被膜的微观结构,结果如图3所示。



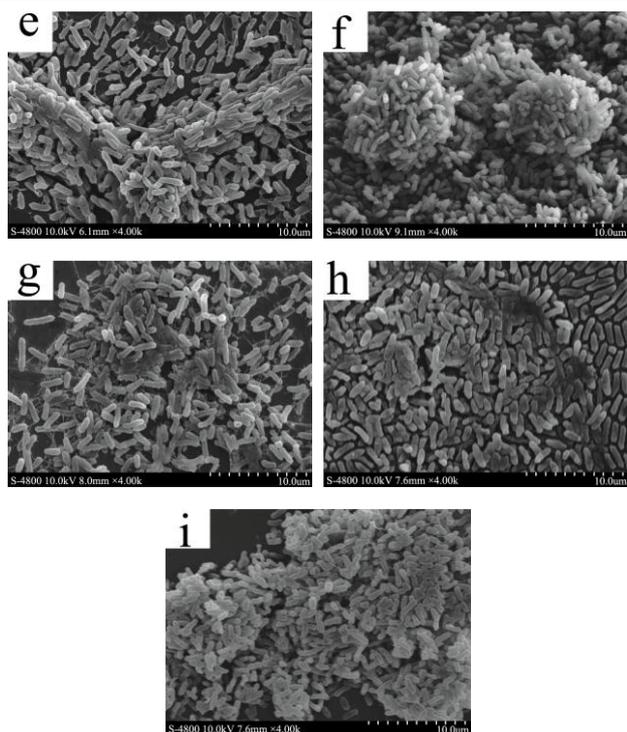


图3 阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29004 生物被膜的扫描电镜图
Fig.3 Scanning electron microscope images of biofilm formed by *C. sakazakii* ATCC 29004

注：标尺为 10 μm，放大倍数为 4000×；a~i 生长温度分别为 12 °C、25 °C、37 °C；下标 1、2、3 接触材料分别为不锈钢、玻璃、硅胶。

由图 3a、3b 和 3c 可知，12 °C 时阪崎克罗诺肠杆菌的生物被膜为单层结构，此时尚无细菌聚集体形成，胞外基质较少，生物被膜稀疏呈现薄层，视野中只有少量菌体粘连。此外，在三种表面下生物被膜微观结构有较为明显差别，不锈钢表面菌体最为密集（图 3-A₁），而玻璃和硅胶表面菌体较为分散。

由图 3d、3e 和 3f 可知，25 °C 下阪崎克罗诺肠杆菌在三种接触材料表面均能形成成熟的生物被膜，呈现出明显的三维空间结构，且多个小型聚集体通过菌体连接形成大型细菌聚集体，菌体以多层堆叠形式聚集在一起。同时，成熟生物被膜的微观结构在三种表面有明显的差别：硅胶表面的生物被膜极其致密，菌体“簇拥”形成三维空间结构（图 3f）；不锈钢表面生物被膜较为致密，菌膜层较厚，菌体以堆叠式形成三维空间结构（图 3d）；玻璃表面生物被膜则较为稀疏，胞外基质较少，菌膜层较薄，仍有较多的细菌以单层、散体的形式存在（图 3e）。

由图 3g、3h 和 3i 可知，37 °C 下阪崎克罗诺肠杆菌在三种表面以平铺堆叠式形成三维结构。硅胶和玻璃表面生物被膜较为致密，胞外基质较多，其中硅胶表面生物被膜的空间结构更加明显（图 3i）。

2.4 生长温度和接触材料对阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜对消毒剂抗性的影响

阪崎克罗诺肠杆菌的生物被膜对三种市售消毒剂的抵抗能力检测结果如表 2 所示。由结果可发现，阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜对消毒剂的抵抗能力受菌体生长温度和接触表面类型的影响，且与消毒剂类型有关。不锈钢、玻璃表面阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜对三种消毒剂的抵抗能力随生物被膜形成温度升高而增强，而硅胶表面生物被膜对消毒剂的抵抗能力表现出 25 °C 最强，37 °C 次之，12 °C 最差。

三种消毒剂对阪崎肠杆菌生物被膜的杀菌作用表现有异，但随温度升高呈现相同的变化规律。由表 2 可知，消毒剂产品 1 处理效果最差，其作用 15 min 后检出残余菌量最高达 54.7%；在三种消毒剂中产品 3 表现出最强的杀菌作用，处理 15 min 后最大活菌量仅为 5.1%。消毒剂产品 3 对阪崎肠杆菌生物被膜的去除能力强于产品 1 和产品 2，说明双十烷基二甲基氯化铵和苯扎氯铵对生物被膜的清除具有结合作用。

表 2 生长温度对阪崎肠杆菌生物膜抗消毒剂产品的影响
Table 2 Effect of growth temperature on the resistance of *C. sakazakii* biofilms to disinfectant products

温度 / °C	接触材料	细菌存活率		
		产品 1	产品 2	产品 3
12	不锈钢	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	玻璃	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	硅胶	21.4±0.6 ^{bB}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
25	不锈钢	11.6±0.7 ^{bB}	0.0016±0 ^{aA}	0.00021±0 ^{aA}
	玻璃	25.8±1.6 ^{bB}	0 ^{aA}	0 ^{aA}
	硅胶	53.6±1.3 ^{cC}	9.8±0.3 ^{cB}	5.1±0.1 ^{eA}
37	不锈钢	44.4±2.0 ^{cC}	33.3±4.1 ^{dB}	1.9±0.4 ^{cA}
	玻璃	54.7±5.5 ^{cC}	8.5±0.8 ^{cB}	3.0±0 ^{dA}
	硅胶	34.8±6.7 ^{dB}	3.5±0.7 ^{bA}	0.6±0.1 ^{bA}

注：同一纵列中的不同小写字母和同一行中的不同大写字母表示差异显著（ $p \leq 0.05$ ）。

3 讨论

本研究选取实验室培养基 TSB 和复原婴幼儿乳粉肉汤 IFB 为菌体培养基，以 37 °C（阪崎克罗诺肠杆菌适宜生长的温度）、25 °C（室温）和 12 °C（欧洲议会和理事会于 2004 年制定的食品卫生规则条例中食品工业操作环境温度）为菌体培养温度，以乳粉加工设备、奶瓶、婴幼儿鼻饲管等器具常用的三种材料（不锈钢、玻璃和硅胶）为本研究接触材料，探究

不同因素对阪崎克罗诺肠杆菌菌体粘附和生物被膜形成的影响。

为深入探究不同培养条件对菌体的粘附能力的影响,本研究使用经过不同条件(TSB、IFB; 12 °C、25 °C、37 °C)培养后的阪崎克罗诺肠杆菌进行粘附实验,这使得菌体后续粘附过程环境与前期培养条件一致,从而能够完整反映培养条件对菌体粘附的影响。本研究使用进入稳定期初期的菌体(菌悬液浓度约为 10^9 CFU/mL)进行粘附试验,以避免经过不同条件培养后的菌体数量及生理状态的差异从而进行更加准确的比较。结果表明 12 °C 下阪崎克罗诺肠杆菌粘附菌量低于 25 °C 及 37 °C 的粘附菌量,且 12 °C 下生物被膜形成量也明显低于 25 °C 及 37 °C,其中,菌体在 25 °C 的 TSB 介质中的成膜量高于其在 37 °C 的成膜量。类似的, Han 等^[18]发现副溶血弧菌在 15~37 °C 的生物被膜形成量高于 4~10 °C,并且菌体在不锈钢表面的成膜量在 30 °C 最高,研究证明当培养温度从 4 °C 升高至 30 °C 时,菌体胞外蛋白酶活力增强,与生物被膜相关的群体感应信号分子 AI-2 产量增高,但在 37 °C 时酶活力减弱, AI-2 产量降低。Speranza 等^[19]检测了沙门氏菌在 20、30 和 40 °C 在蛋白胨水(1.0~2.5 g/L)中生物被膜的形成能力,结果表明,温度对沙门氏菌生物被膜形成能力影响较大,菌体在 30 °C 的成膜量高于 40 °C, 20 °C 的成膜量最低。研究者推测是由于菌毛和纤维素是沙门氏菌形成生物被膜的重要基质组分, *agfD* 启动子受到环境的影响因而影响菌毛形成,菌毛合成的温度是 28 °C 使得菌体在 30 °C 成膜量最高。Bonsaglia 等^[14]检测了单增李斯特菌在脑心浸液肉汤中不锈钢表面的成膜能力,结果表明,在研究检测的三个温度(4 °C、20 °C 和 35 °C)中,当温度为 25 °C 时菌体粘附能力最强。研究者认为是菌体鞭毛的合成影响了单增李斯特菌的菌体粘附。37 °C 条件下 *MogR* 抑制鞭毛相关基因的转录,因此菌体无鞭毛,且不能运动,但在 30 °C 条件时, *MogR* 被抑制从而使鞭毛基因转录。鞭毛在生物被膜形成的过程中具有重要的作用,其能够促进菌体的粘附和生物被膜的成熟。研究结果表明,纤维素和鞭毛有助于阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的形成,但是菌毛与其生物被膜形成没有相关性^[20]。此外,阪崎克罗诺肠杆菌胞外聚合物能够维持生物被膜的三维结构和生命周期,研究表明,在 0~30 °C 范围内,阪崎克罗诺肠杆菌在 27 °C 时胞外多糖合成量最大。

由本研究结果发现,阪崎克罗诺肠杆菌在 37 °C 条件下,在两种培养基质中均出现了在培养的第二天生生物被膜形成量最大,随后生物被膜量逐步减少(图 2-C₁

和图 2-C₂)。本研究结果与 Bonsaglia 等^[14]研究结果相似,单增李斯特菌在 35 °C 环境培养 48 h 后,生物被膜量降低。Jo 等^[21]发现阪崎克罗诺肠杆菌分离在硅胶、聚碳酸酯、不锈钢材料表面形成的生物被膜在 24 h 达到最大值,在随后检测的 144 h 内生物被膜量逐步降低。以上结果可能是由于在培养一定时间后,生物被膜的形成进入了主动分散阶段。随着生物被膜的成熟,生物被膜结构愈发复杂和庞大,但这使得营养物质难以进入到生物被膜内部,致使生物被膜从内部开始消散,同时外部的部分细菌聚集体或者单个菌体也开始从生物被膜上脱落、散播,脱落后的菌体成为浮游菌体后开始新一轮的生物被膜形成过程^[22]。

食品加工接触面材质类型也是影响菌体粘附数量和生物被膜形成的关键因素之一,本研究结果发现,阪崎克罗诺肠杆菌在 25 °C 环境的 IFB 中, 37 °C 的 TSB 和 IFB 中,其在玻璃表面粘附菌量最低,硅胶表面粘附菌量最高,但在其他条件,三种材料表面粘附菌量没有明显差异(图 2)。玻璃、不锈钢材料具有亲水性而硅胶材料具有疏水性,菌体在不同材料表面的粘附与材料的表面特性有关。我们的研究结果与 Kim 等^[11]研究结果类似,他们发现四株阪崎肠杆菌菌株在硅胶表面的粘附菌体高于在不锈钢表面的粘附菌体。De Oliveira 等^[23]研究结果表明沙门氏菌在不锈钢和玻璃表面的生物被膜形成量低于在 PVC 材料表面的生物被膜量。但也有研究表明菌体在亲水材料表面生物被膜的形成量高于疏水材料^[14,24]。

本研究结果表明,菌体在 TSB 中生物被膜的形成量高于在 IFB 中(图 2)。TSB 中的主要营养成分包括胰酪蛋白胨、大豆蛋白胨、氯化钠、葡萄糖以及磷酸盐,用来制备 IFB 的婴儿配方乳粉含脱脂牛奶、玉米糖浆、乳糖、大豆油、浓缩乳清蛋白等营养物质。已有研究表明, NaCl 和葡萄糖可以促进细菌生物被膜的形成^[25]。同时,我们推测,在 TSB 和 IFB 两种介质中生物被膜形成量的不同也归因于培养基质的营养物质、pH 值和溶液黏度等, TSB 相比 IFB 更利于阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜的形成。

本研究结果表明,阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜对消毒剂的抵抗能力与菌体培养温度有关,相较于 12 °C, 25 °C 和 37 °C 条件下形成的生物被膜对消毒剂的抗性更强(表 2), Abdallah 等^[17]研究结果表明,随培养温度升高,铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌形成的生物被膜对季胺类消毒剂的耐受能力增强。根据本文中中场发射扫描电镜观测结果,我们猜测生物被膜对消毒剂的抵抗能力取决于生物被膜的厚度和紧密度, 25 °C 和 37 °C 条件下形成的生物被膜较 12 °C 时更加立

体且致密,从而增强了生物被膜对消毒剂的抵抗能力。并且,由图2可知,37℃条件下菌体在生物被膜形成第二天时,三种材料表面生物被膜量基本一致,但经过消毒剂处理后,三种材料表面生物被膜量产生了差异。这说明,生物被膜对消毒剂的抵抗能力也与接触材料相关,除此之外,消毒剂的种类也与生物被膜对消毒剂的抵抗能力有关。

4 结论

阪崎克罗诺肠杆菌对非生物表面的粘附和生物被膜的形成受生长温度、培养基质和表面材料的影响。12℃下阪崎克罗诺肠杆菌粘附和生物被膜形成能力最弱,25℃和37℃生物被膜形成周期较快,菌体在TSB中生物被膜形成量高于其在IFB中;场发射扫描电镜观测生物被膜微观结构结果表明,生长温度和表面类型对菌体生物被膜的结构有显著影响,25℃和37℃下阪崎克罗诺肠杆菌均能形成成熟的生物被膜,具有立体且致密的结构,12℃时菌体生物被膜为单层结构;生物被膜对消毒剂的抗性受培养温度、表面类型和消毒剂种类的影响,12℃阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜对消毒剂的抵抗能力最弱,不锈钢、玻璃表面的生物被膜对消毒剂的抗性随温度升高而增强,硅胶表面生物被膜在25℃下对消毒剂的抗性最强。本研究为理解阪崎克罗诺肠杆菌生物被膜形成因素提供实验依据,有望为更新、制定婴幼儿配方乳粉加工、流通环节微生物安全标准提供参考,为乳粉加工、冲调等器具材料的选择提供理论依据。

参考文献

- [1] Stephan R, Grim C J, Gopinath G R, et al. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 3402-3410
- [2] Joshi S S, Howell A B, D'Souza D H. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins [J]. Food Microbiology, 2014, 39(5): 127-131
- [3] 刘咪,杨保伟,夏效东,等.阪崎克罗诺肠杆菌致病性机理研究进展[J].食品科学,2014,35(9):329-333
LIU Mi, YANG Bao-wei, XIA Xiao-dong, et al. Advances in pathogenicity mechanism of *Cronobacter sakazakii* [J]. Food Science, 2014, 35(9): 329-333
- [4] Beuchat L R, Kim H, Gurtler J B, et al. *Cronobacter sakazakii*, in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(2): 204-213
- [5] Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, et al. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments [J]. Food Control, 2007, 18(10): 1241-1245
- [6] Sonbol H, Joseph S, Mcauley C M, et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula and milk powder production factories [J]. International Dairy Journal, 2013, 30(1): 1-7
- [7] Bhinu V S. Insight into biofilm-associated microbial life [J]. Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology, 2006, 10(1): 15-21
- [8] 毛雪丹.2003-2008年我国细菌性食源性疾病流行病学特征及疾病负担研究[D].中国疾病预防控制中心,2010
MAO Xue-dan. Epidemiological characteristics and burden of disease of bacterial foodborne diseases in China from 2003 to 2008 [D]. Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2010
- [9] Borucki M K, Peppin J D, White D, et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7336-7342
- [10] Iversen C, Lane M, Forsythe S J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk [J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38(5): 378-382
- [11] Hoikyung K, Jee-Hoon R, Larry R B. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5846-5856
- [12] Renner L D, Weibel D B. Physicochemical regulation of biofilm formation [J]. Mrs Bulletin, 2011, 36(5): 347-355
- [13] Manuel S, Lúcia C S, Maria J V. A review of current and emergent biofilm control strategies [J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(4): 573-583
- [14] Bonsaglia E C R, Silva N C C, Júnior A F, et al. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures [J]. Food Control, 2014, 35(1): 386-391
- [15] 石超,孙慧慧,孙正,等.百里醌对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用[J].食品科学,2018,39(1):58-64
SHI Chao, SUN Hui-hui, SUN Zheng, et al. Antibacterial

-
- effects of thymoquinone on *Cronobacter sakazakii* [J]. Food Science, 2018, 39(1): 58-64
- [16] 王虎虎.肉源沙门氏菌生物菌膜的形成及转移规律研究 [D].南京:南京农业大学,2014
- WANG Hu-hu. Study on the formation and transferring of *Salmonella* Biofilms from meat sources [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [17] Abdallah M, Khelissa O, Ibrahim A, et al. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214: 38-47
- [18] Han N, Mizan M F R, Jahid I K, et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature [J]. Food Control, 2016, 70: 161-166
- [19] Speranza B, Corbo M R, Sinigaglia M. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(1): M12-M16
- [20] Hartmann I, Carranza P, Lehner A, et al. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2251-2261
- [21] Lindsey S B T. Maturation and survival of *Cronobacter* biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(5): 952-956
- [22] Srey, Sokunrotanak, Jahid, et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern [J]. Food Control, 2013, 31 (2): 572-585
- [23] De-Oliveira D C, Fernandes J A, Kaneno R, et al. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2014, 11(6): 478-483
- [24] Bonaventura G D, 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
- [25] Rode T M, Langsrud S, Holck A, et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(3): 372-383