

食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及相关基因的检测

张鹏飞, 王婷, 钟楠, 张伟松, 王新

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了解食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 生物被膜形成能力及其相关基因携带情况。采用刚果红琼脂法和 96 孔板法测定 22 株食源性 MRSA 菌株 (包括: 原料乳分离株 4 株, 鸡肉、速冻水饺和即食食品分离株各 6 株) 的生物被膜形成能力, 同时通过 PCR 方法对 MRSA 菌株生物被膜形成相关的 15 个基因进行检测分析。22 株 MRSA 菌株中, 刚果红琼脂法和 96 孔板法分别检测出 21 株 (95.45%) 和 22 株 (100.00%) 有生物被膜形成能力。96 孔板法测定菌株生物被膜形成能力弱、中等和强的检出率分别为 54.55%、40.91% 和 4.55%。MRSA 菌株生物被膜相关基因 *clfA*、*fib* 和 *eno* 的携带率最高均为 95.45%, 其次是 *clfB* (90.91%)、*fnbB* (54.55%)、*icaBC* 和 *ebpS* (都为 45.45%)、*agr* (27.27%)、*icaAD* 和 *cna* (都为 22.73%)、*fnbA* (13.64%)、*sar*、*bbp* 和 *sigB* (都为 4.55%)。此外, 来自原料乳和即食食品的 MRSA 菌株较生鸡肉和速冻水饺 MRSA 菌株生物被膜形成能力强 ($p < 0.05$)。结果表明, 96 孔板法能够进行定性和定量检测生物被膜的形成, 而刚果红琼脂法只能定性检测生物被膜的形成, 两者的定性检测结果存在一定的差异。通过 96 孔板法定量检测的结果表明食源性 MRSA 菌株普遍能形成生物被膜, 其中存在一些生物被膜形成能力强的 MRSA 菌株, 同时大部分 MRSA 菌株不依赖 *ica* 途径形成生物被膜, 提示产肠毒素 MRSA 菌株形成生物被膜定植在食品加工过程的环境中, 不易清除, 成为食品安全中的潜在隐患。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 生物被膜; 生物被膜形成相关基因

文章编号: 1673-9078(2020)10-41-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0370

Detection of Biofilm Formation and Biofilm-related Genes of Food-borne Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ZHANG Peng-fei, WANG Ting, ZHONG Nan, ZHANG Wei-song, WANG Xin

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

Abstract: In order to investigate understand the biofilm-forming ability and carried biofilm-associated genes of food-borne methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), the biofilm-forming abilities of twenty-two food-borne MRSA strains (including 4 isolated from raw milk, 6 from raw chicken, 6 from quick-frozen dumplings and 6 from ready-to-eat foods) were analyzed using the Congo red agar (CRA) method and 96-well plate method. In the meantime, fifteen biofilm-associated genes of the MRSA strains were detected by PCR. Among the 22 MRSA strains, 21 strains (95.45%) and 22 strains (100.00%) were found by the Congo red agar and 96-well plate methods to exhibit a biofilm-forming ability. The 96-well plate method showed that the detection rates of the strains with weak, medium and strong biofilm-forming abilities were 54.55%, 40.91% and 4.55%, respectively. The rates for the MRSA strain to carry the biofilm-related genes, *clfA*, *fib* and *eno* were found the highest (95.45%), followed by *clfB* (90.91%), *fnbB* (54.55%), *icaBC* and *ebpS* (both 45.45%), *agr* (27.27%), *icaAD* and *cna* (both 22.73%), *fnbA* (13.64%), and *sar*, *bbp* and *sigB* (all 4.55%). In addition, the MRSA strains from raw milk and ready-to-eat foods had stronger

引文格式:

张鹏飞, 王婷, 钟楠, 等. 食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成及相关基因的检测[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 41-49

ZHANG Peng-fei, WANG Ting, ZHONG Nan, et al. Detection of biofilm formation and biofilm-related genes of food-borne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 41-49

收稿日期: 2020-04-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31871894; 31271858); 国家自然科学基金联合基金项目 (U1703119); 陕西省社会发展领域攻关项目 (2018SF-110)

作者简介: 张鹏飞 (1993-), 男, 博士研究生, 研究方向: 病原微生物检测

通讯作者: 王新 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性病原微生物及其分子生物学和食品安全

biofilm-forming abilities than those from raw chicken and quick-frozen dumplings ($p < 0.05$). The results showed that the 96-well plate method can allow qualitative and quantitative detections of biofilm formation, while the Congo red agar method can only qualitatively detect the formation of biofilms. There were significant differences between the results of the qualitative tests obtained by the two methods. The results of the quantitative detection by the 96-well plate method showed that the food-borne MRSA strains can generally form biofilms, with some MRSA strains exhibiting strong biofilm-forming ability. Most MRSA strains did not rely on the *ica* pathway to form biofilms, suggesting that enterotoxin-producing MRSA strains can form a biofilm and colonize in the environments of food processing. Owing to the difficulty with their removal, the MRSA strains may become food safety hazards.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; biofilm; biofilm-related genes

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是一种常见的食源性致病菌, 容易造成人的食物中毒和感染。自抗生素广泛使用以来, 病原体在选择性压力下不断进化, 导致新的耐药性致病菌的出现和传播。由于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 除对 β -内酰胺类抗生素耐药, 对非 β -内酰胺类抗生素也有较强的耐药性, 很快在食物中流行^[1,2]。据统计, MRSA 已从世界各地的许多食品中分离出来, 包括鸡肉、鱼、猪肉、牛奶、饺子、冰淇淋等^[3-8]。目前, MRSA 在食物中的污染率还比较低, 但不能忽视其通过食物链进行传播。此外, 在食品加工过程中, MRSA 菌株很容易形成生物被膜, 使其能在不利的食品加工环境中存活。形成生物被膜后的 MRSA 菌株, 除具有高度的耐药性外还能逃避清除^[9]。若含有形成生物被膜的菌体的食物被人体食用后, 能逃避机体免疫作用而长期存活, 引起慢性感染, 加大了食源性疾病的治疗难度^[9]。

生物被膜的形成是一个复杂的过程, 受多种因子的影响, 其中细胞间多糖黏附素 (polysaccharide intercellular adhesin, PIA) 作为生物被膜的组分, 起着调控细菌细胞间粘附增殖, 促进生物被膜的形成过程中细菌的聚集^[10,11]。而 PIA 的表达又依赖 *ica* 操纵子的调控, *ica* 主要由 *icaA*、*icaB*、*icaC* 和 *icaD* 组成, 通过诱导葡糖胺转移酶的合成, 在生物被膜形成的黏附过程中起着重要作用^[10]。*ica* 的表达又受多种因子调控, 如 σ 因子 *sigB*, 葡萄球菌辅助调节子 *sar* (staphylococcal accessory regulator) 和辅助基因调节因子 *agr* (accessory gene regulator)^[12]。此外, 作为微生物表面识别粘附基质分子 (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, MSCRAMMs) 的相关基因 *bap*、*fnbA*、*fnbB*、*clfA* 和 *clfB*, 在菌体生物被膜形成过程中也发挥着粘附和生长作用^[11,13]。

目前, 生物被膜的形成机制仍存在一些争议。此前报道认为, *ica* 操纵子 (*icaADBC*) 编码的 PIA 在生物被膜形成过程中起着关键性的作用^[10]。但也有研究

发现, 存在 *ica* 阳性却无生物被膜形成能力的金黄色葡萄球菌^[14], 造成这一结果的原因可能是基因至蛋白质水平的表达过程中受到其他基因的影响, 或者是因为参与生物被膜形成的蛋白数量众多, 调控机制复杂, 生物被膜形成可能存在其他途径等^[15]。另外, 在生物被膜形成过程中 MSCRAMMs 也起着非常重要的作用^[11]。通过编码黏附素聚簇因子等结合蛋白, 使细菌粘附在食品生产设备表面, 加大了清洗难度, 极易污染食品。因此, 对 MRSA 菌株生物被膜形成的研究已成为食品加工过程中的研究热点。

关于生物被膜形成的检测方法主要包括: 染色法、镜像法和分子生物学法^[13]。而染色法作为一种廉价、简便和常用的生物被膜半定量检测方法, 被广大研究者所采用, 但不同的染料其灵敏度又有所差异。刚果红法快速简单, 肉眼即可辨别结果, 然而其灵敏性较低, 多应用于判断菌株是否能形成生物被膜, 适合大批筛选生物被膜形成阴性菌株和阳性菌株。96 孔板结晶紫染色法定量检测菌株生物被膜形成能力简单、高效、可靠等优点, 然而在操作过程中也容易受人为因素的影响。因此, 在研究过程中, 需要将这两种方法结合起来, 可以更加有效地检测生物被膜的形成菌株, 以及量化不同菌株生物被膜形成能力的差异^[13,15]。

为了解不同来源 MRSA 菌株产生物被膜能力及菌株携带生物被膜形成相关基因, 本研究对分离自原料乳、鸡肉、速冻饺子和即食食品的 MRSA 分离株进行生物被膜形成能力和生物被膜相关基因检测。通过获取不同来源 MRSA 生物被膜形成能力及生物被膜相关基因的分布, 评估其内在风险, 为食品安全的把控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本次试验 22 株 MRSA 菌株来自实验室前期从陕西省鸡肉、原料乳、速冻饺子和即食食品中分离获得,

其中原料乳分离株 4 株, 鸡肉、速冻饺子和即食食品分离株各 6 株。所有菌株均储存在 -80 °C 冰箱直至使用。

1.1.2 主要试剂

胰蛋白胍大豆琼脂 (Tryptic Soy Agar, TSA) 和胰蛋白胍大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB) 均购自北京陆桥技术股份有限公司; 盐酸、刚果红、乙醇、结晶紫、草酸铵和甲醇购自西陇化工股份有限公司; 氢氧化钠购自广东光华科技股份有限公司; 葡萄糖、氯化钾、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾购自广东省化学试剂工程技术研究开发中心; 96 孔板购自西安沃尔森生物技术有限公司; PCR 所用试剂购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司; 细菌 DNA 提取试剂盒购自杭州博日科技有限公司和引物均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.1.3 主要仪器与设备

移液枪和高速离心机购自德国 Eppendorf 公司, PCR 仪、凝胶成像仪和酶标仪购自美国伯乐 (Bio-rad) 公司, 隔水式恒温培养箱购自上海精宏实验设备有限公司和高压灭菌锅购自上海申安高压仪器设备有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 刚果红琼脂法定性检测 MRSA 菌株生物被膜形成能力

刚果红琼脂法 (Congo Red Agar, CRA) 检测 MRSA 菌株形成生物被膜能力, 具体操作步骤如下: 将活化后的单个 MRSA 菌落接种于刚果红培养基上, 37 °C 培养 24 h 后, 室温放置 72 h; 产生生物被膜的菌落为黑色, 不产生生物被膜的菌落为红色, 试验重复 3 次。参考 Arciola 等^[16]所述的方法, 根据产生生物被膜菌落黑色的深浅, 将产生生物被膜阳性菌株又细分为三类: 浅黑 (wb, weak black)、黑色 (b, black) 和深黑 (vb, very black), 浅黑、黑色和深黑菌株形成生物被膜能力依次定性为由弱到强。

1.2.2 96 孔板法定量检测 MRSA 生物被膜形成能力

1.2.2.1 菌株培养及细菌基因组 DNA 提取

将冻存于 -80 °C MRSA 菌株活化于 TSA 平板, 挑取单菌落接种于 5 mL 的 TSB 溶液中, 37 °C, 180~220 r/min 培养 16~18 h 使细菌处于对数生长后期, 培养后的菌液经 5000×g 离心 10 min, 去除上清液, 使用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤菌体沉淀, 反复洗涤两次后, 测定并调整 PBS 悬浮菌

体液的 OD_{600nm}=0.5, 使菌液浓度约为 10⁸ CFU/mL 待用。

将上述菌悬液取 1 mL 于无菌 EP 管内, 12000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 余下操作严格按 Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取。最后将提取的 DNA 模板保存于 -20 °C 冰箱中待用。

1.2.2.2 生物被膜形成能力检测

参照 Fox 等^[17]所述的方法, 采用 96 微孔板法对 22 株食源性 MRSA 菌株的生物被膜形成能力进行结晶紫定量检测。具体步骤如下: 首先将 200 μL 含 0.25% 葡萄糖和 0.5% 氯化钠的 TSB 稀释液加入 96 孔板, 接着加入 2 μL 上述菌悬液, 混匀, 37 °C 恒温培养。72 h 后弃去培养液, 用 0.1×PBS (pH=7.2) 反复洗涤 3 次, 除去杂质和游离细菌。然后在相应各孔中加 200 μL 乙醇固定生物被膜, 10 min 后弃去, 晾干后贴壁加入 200 μL 0.1% 结晶紫, 染色 5 min, 弃去染液, 用无菌水反复洗涤 2 次, 晾干。接着每孔加入 200 μL 乙醇, 溶解 20 min 后用酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度 (OD) 值, 其中未接种菌株的孔作为空白对照, 每组三个平行, 试验重复 3 次。

参照 Stepanovic 等^[18]所述的方法, 根据临界 OD_c 值 (空白孔的平均值加上其 3 倍的标准差) 可反映生物被膜与接触表面粘附的牢固程度, 具体分为四个等级: 0D≤0D_c 为不粘附 (0), 0D_c<0D≤20D_c 为弱粘附 (+), 20D_c<0D≤40D_c 为中等粘附 (++) , 0D>40D_c 为强粘附 (+++)。

1.2.3 生物被膜相关基因检测

运用 PCR 技术对上述 22 株食源性 MRSA 菌株 DNA 模板进行 15 种生物被膜相关基因检测。其中 15 种生物被膜相关基因包括: 调节生物被膜形成基因 (*sar*, *agr* 和 *sigB*); 微生物表面识别粘附基质分子基因 (*fmbA*, *fmbB*, *can*, *eno*, *bab*, *ebpS*, *fib*, *bbp*, *clfA* 和 *clfB*) 和编码 *ica* 操纵子基因 (*icaAD* 和 *icaBC*)。PCR 反应体系如下: DNA 模板 3 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 μL, dNTP 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.125 μL、上下游引物各为 0.3 μL, ddH₂O 15.275 μL。PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min、退火 1 min、72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。各引物及退火温度如表 1 所示。最终将 PCR 扩增产物上样于含溴化乙锭 (EB) 的 1% (m/V) 琼脂糖凝胶, 120 V, 90 mA 条件下电泳 30 min, 采用凝胶成像系统在紫外光下观察结果。

表 1 生物被膜相关基因引物及退火温度

Table 1 Oligonucleotide primers of biofilm-formation genes used in PCR

基因	引物序列 (5'-3')	大小/bp	退火温度/°C	参考文献
<i>bap</i>	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	971	62	[19]
	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC			
<i>icaAD</i>	CCTAACTAACGAAAGGTAGG	1266	55	[20]
	TTAGCGTTGGGTATTCCCTC			
<i>icaBC</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	1118	55	[20]
	GCACGTAATATACGAGTTC			
<i>sar</i>	CGGTACCGTTGATTTGGGTAGTATGC	867	55	[20]
	TTGCCATGGTAAAACCTCCC			
<i>agr</i>	GTGCCATGGGAAATCACTCCTTCC	976	55	[20]
	TGGTACCTCAACTTCATCCATTATG			
<i>sigB</i>	CGGATCCGGTGTGACAATCAGTATGAC	937	55	[20]
	CGGAATTCGCGACATTTATGTGGATACAC			
<i>fnbA</i>	GTGAAGTTTTAGAAAGGTGGAAAGATTAG	643	62	[21]
	GCTCTGTAAAGACCATTTTTCTTCAC			
<i>fnbB</i>	GTAACAGCTAATGGTCAATTGATACT	524	62	[21]
	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC			
<i>clfA</i>	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292	62	[22]
	CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG			
<i>clfB</i>	ACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC	205	62	[22]
	TTCGCACTGTTTGTGTTTGAC			
<i>cna</i>	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423	55	[21]
	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC			
<i>eno</i>	CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	302	55	[21]
	ACGTGCAGCAGCTGACT			
<i>ebpS</i>	CTTAACAGTTACATCATGTTTATCTTTG	186	55	[21]
	CATCCAGAACCAATCGAAGAC			
<i>fib</i>	GCTCTGTAAAGACCATTTTTCTTCAC	404	62	[21]
	CTACAACACTACAATTGCCGTC AACAG			
<i>bbp</i>	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	575	62	[21]
	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG			

1.2.4 图表绘制方法与数据统计

所有数据采用 excel 2016 软件进行数据统计分析并运用 word 2003 进行三线表绘制。采用 Minitab 15

软件对试验数据进行统计分析，采用卡方 (χ^2) 检验进行差异显著性分析。

表 2 CRA 方法鉴定 MRSA 产生物被膜能力

Table 2 The biofilm-formation ability of 22 MRSA isolates by CRA assay

CRA*	检出率 (%) / 检出株数 (株)				
	原料乳(n=4)	生鸡肉(n=6)	即食食品(n=6)	速冻饺子(n=6)	总计(n=22)
wb	25.00 (1/4)	83.33 (5/6)	50.00 (3/6)	0.00 (0/6)	40.91 (9/22)
b	25.00 (1/4)	16.67 (1/6)	33.33 (2/6)	66.67 (4/6)	36.36 (8/22)
vb	50.00 (2/4)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	33.33 (2/6)	18.18 (4/22)
r	0.00 (0/4)	0.00 (0/6)	16.67 (1/6)	0.00 (0/6)	4.55 (1/22)

注: wb: 浅黑; b: 黑色; vb: 深黑; r: 红色。

2 结果与讨论

2.1 刚果红定性结果

如表 2 所示,22 株 MRSA 菌株中,95.45%(21/22) 的 MRSA 菌株能够形成黑色菌落,判定为生物被膜形成菌株,其中较多为浅黑色菌落的菌株(40.91%, 9/22),其次为黑色菌落菌株(36.36%, 8/22)和深黑色菌落菌株(18.18%, 4/22)。1 株来自即食食品的菌株形成红色菌落,判定为不能形成生物被膜菌株。

2.2 96 孔板法定量检测 MRSA 生物被膜形成能力

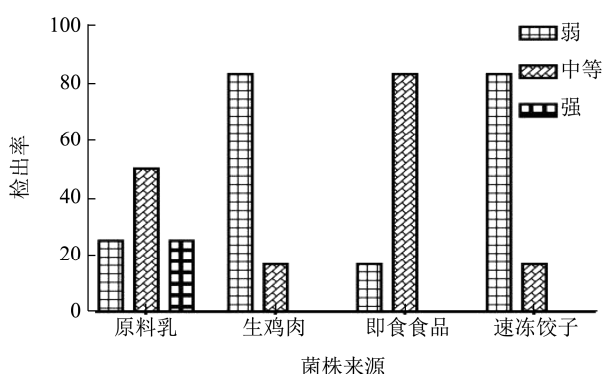


图 1 MRSA 菌株生物被膜形成能力

Fig.1 The biofilm formation of MRSA isolates

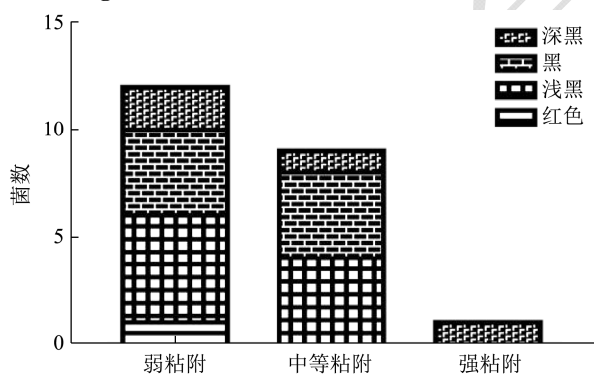


图 2 刚果红和 96 孔板法菌株生物被膜形成能力比较

Fig.2 Comparison of biofilm formation ability between Congo red agar and microtiter plate assay

根据各菌株 OD 值与临界 OD_c 比较结果如图 1 所示,所有 MRSA 菌株均能形成生物被膜。其中形成生物被膜能力弱的菌株最多,为 54.55%(12/22),其次为形成生物被膜能力中等的菌株 40.91%(9/22)和形成生物被膜能力强的菌株 4.55%(1/22)。这一结果与刚果红琼脂试验的检查结果存在一定的差异,魏莲花等^[23]也发现刚果红试验的特异度不高,与本试验的检测结果具有一致性。造成这一结果的原因可能是

细菌生物被膜的形成主要通过 PIA 介导,相互聚集^[24],而这一过程是比较复杂的,因此在检测生物被膜形成能力时,最好将两种方法相结合。

此外, Arciola 等^[16]研究发现,菌株在刚果红培养基菌落颜色的深浅,与形成生物被膜的强弱有关,其中非常黑和黑色的菌落为生物被膜形成较强的菌株,而浅黑色的菌落被认为是生物被膜形成较弱的菌株。在本研究中,96 孔板法判断生物被膜形成强的菌株与刚果红培养基判断生物被膜形成强的菌株并不一致。如图 2 所示,发现菌落颜色与粘附能力并不呈现一定的相关性,这与 Arciola 等^[16]报道的结果并不一致。然而,菌株在刚果红菌落颜色的深浅与粘附性是否存在相关性及这一规律是否适合不同来源菌株,还需要我们进一步去证实。

不同来源菌株形成生物被膜的能力存在一定差异,分离自原料乳和即食食品的 MRSA 菌株较生鸡肉和速冻水饺的 MRSA 菌株形成生物被膜能力强 ($p < 0.05$)。生鸡肉和速冻饺子中生物被膜形成能力弱的 MRSA 菌株较多,均为 83.33%(5/6),即食食品和原料乳中生物被膜形成能力中等的 MRSA 菌株较多,分别为 83.33%(5/6)和 50.00%(2/4)。本研究从原料乳 MRSA 菌株中检测到一株生物被膜形成能力强的菌株。综上所述,不同食物来源的 MRSA 菌株生物被膜形成能力存在较大差异。因此,在对不同食物生产相关设备进行清洗时,不能一概而论,对存在产生物被膜强的菌株污染的设备要加大清洗力度。

2.3 生物被膜相关基因的检测情况

对 22 株 MRSA 菌株进行 15 种生物被膜形成相关基因检测,发现除 *bap* 基因外,其它所测基因均检出,其中 *clfA*、*fib* 和 *eno* 基因的检出率最高,均为 95.45%(21/22),其次为 *clfB* 90.91%(20/22),*fnbB* 54.55%(12/22),*icaBC* 和 *ebpS* 45.45%(10/22),*agr* 27.27%(6/22),*icaAD* 和 *can* 均为 22.73%(5/22),*fnbA* 13.64%(3/22),*sar*、*bbp* 和 *sigB* 均为 4.55%(1/22)。此外,每株 MRSA 菌携带 3~8 种不等的生物被膜形成相关基因,共有 20 种生物被膜基因谱型。其中,基因谱 *eno-ebpS-icaBC-fib-clfA-clfB* 和 *eno-ebpS-fib-clfA-clfB* 检出率最高,均为 9.09%(2/22)。

不同来源 MRSA 菌株编码 *ica* 操纵子基因、生物被膜调控基因和 MSCRAMMs 基因检出情况差异显著 ($p < 0.05$)。对于编码 *ica* 操纵子基因,速冻饺子和即食食品 MRSA 菌株 *icaBC* 基因携带率最高,分别为 83.33%和 50.00%,同时原料乳和速冻饺子 MRSA 菌株中 *icaAD* 基因携带率最高,分别为 50.00%和

33.33%。对于生物被膜调控基因,原料乳中 MRSA 菌株不携带任何生物被膜调控基因,速冻饺子 MRSA 菌株只携带 *sar* 基因 (16.67%, 1/6), 生鸡肉 MRSA 菌株中只携带 *agr* 基因 (33.33%, 2/6) 和即食食品 MRSA 菌株携带 *agr* (66.67%, 4/6) 和 *sigB* (16.67%, 1/6)。对于 MSCRAMMs 基因,原料乳、生鸡肉和速冻饺子 MRSA 菌株对 *fib*, *eno*, *clfB* 和 *clfA* 基因携带率最高,均为 100.00%, 即食食品中 *fnbB* 出现频率最高,为 100.00%, 其次为 *fib*, *eno* 和 *clfA*, 均为 83.33%。

目前,关于生物被膜形成的机制仍存在争议。生物被膜的形成仍然是一个复杂的过程,涉及多种基因的表达和调控,其中细胞间多糖黏附素 PIA (polysaccharide intercellular adhesin) 是生物被膜形成过程中细菌聚集的重要因子^[10,11,25]。现已证实 PIA 与致病性有一定相关性。而 PIA 的表达主要由胞间黏附素 (intercellular adhesion, *ica*) 操纵子编码^[10,11]。产生物被膜金黄色葡萄球菌普遍携带 *ica* 基因,被认为是生物被膜形成的必要因素。在本研究中,22 株形成生物被膜的菌株中 59.09% 的菌株携带 *ica* 操纵基因 (*icaAD* 和 *icaBC*), 该结果与李丽等^[22]报道的类似,这也证实大部分菌株是通过 *ica* 依赖途径形成生物被膜。然而,近些年陆续有报道^[14]指出,敲除 *ica* 基因的金黄色葡萄菌仍能形成生物被膜,这与本研究 40.91% 的生物被膜阳性菌株不携带任何 *ica* 基因相

符。由此表明,生物被膜的形成也存在 *ica* 非依赖机制^[14,26]。

此外, *ica* 的表达又受 σ 因子 *sigB*、葡萄球菌辅助调节子 *sar* 和辅助基因调节因子 *agr* 的调控^[12]。不同的是,在本研究中携带 *icaAD* 和/或 *icaBC* 基因的 11 株菌株中,只有三株 MRSA 同时携带 *agr*、*sar* 或 *sigB* 基因。李丽等^[22]的研究也指出,携带 *ica* 相关基因的菌株不一定携带 *sigB*、*sar* 或 *agr* 基因。这提示 *ica* 的表达并非只受 *sigB*、*sar* 和 *agr* 调控基因调控,可能还存在其它的调节系统。

除 PIA 外, MSCRAMMs 在生物被膜形成过程中也起着非常重要的作用^[11]。10 个 MSCRAMMs 相关基因检测中共有 9 个相关基因检出,检出率较高,且不同来源菌株携带情况有所差异。其中原料乳、生鸡肉和速冻饺子 MRSA 菌株对 *fib*, *eno*, *clfB* 和 *clfA* 基因携带率最高,而即食食品 MRSA 菌株对 *fnbB*, *fib*, *eno* 和 *clfA* 基因携带率最高。由此表明,不同来源 MRSA 菌株携带 MSCRAMMs 相关基因有所差异^[27,28], 这可能由于菌体为适应不同的环境,而导致基因的携带存在差异。此外,作为诱导生物被膜生长的 *bap* 基因,除在奶牛患乳房炎的分离株中有检出外,很少在别的来源菌株中检出^[29,30], 在本研究中 *bap* 基因也无检出。综上表明,不同来源细菌可能通过变化携带 MSCRAMM 基因,适应不同的环境条件。

表 3 生物被膜形成相关基因检出情况

Table 3 The prevalence of biofilm-related genes of different resource in MRSA

基因	菌株来源				总计(n=22)
	原料乳(n=4)	生鸡肉(n=6)	即食食品(n=6)	速冻饺子(n=6)	
<i>sar</i>				1 (16.67%)	1 (4.55%)
<i>agr</i>		2 (33.33%)	4 (66.67%)		6 (27.27%)
<i>sigB</i>			1 (16.67%)		1 (4.55%)
<i>bap</i>					
<i>fnbB</i>	1 (25.00%)		6 (100.00%)	5 (83.33%)	12 (54.55%)
<i>fnbA</i>				3 (50.00%)	3 (13.64%)
<i>epbS</i>	3 (75.00%)	5 (83.33%)	1 (16.67%)	1 (16.67%)	10 (45.45%)
<i>icaBC</i>	1 (25.00%)	1 (16.67%)	3 (50.00%)	5 (83.33%)	10 (45.45%)
<i>icaAD</i>	2 (50.00%)	1 (16.67%)		2 (33.33%)	5 (22.73%)
<i>fib</i>	4 (100.00%)	6 (100.00%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)	21 (95.5%)
<i>cna</i>		2 (33.33%)	3 (50.00%)		5 (22.73%)
<i>eno</i>	4 (100.00%)	6 (100.00%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)	21 (95.45%)
<i>clfB</i>	4 (100.00%)	6 (100.00%)	4 (66.67%)	6 (100.00%)	20 (90.91%)
<i>clfA</i>	4 (100.00%)	6 (100.00%)	5 (83.33%)	6 (100.00%)	21 (95.45%)
<i>bbp</i>		1 (16.67%)			1 (4.55%)

表4 生物被膜基因谱及生物被膜形成能力

Table 4 Distribution of biofilm-related gene profiles and biofilm formation of the MRSA strains

来源	生物被膜基因谱	刚果红法 ^a	96孔板法 ^b
原料乳	<i>eno-epbS-icaAD-fib-fnbB-clfA-clfB</i>	wb	+
	<i>eno-epbS-icaAD-fib-clfA-clfB</i>	vb	++
	<i>eno-fib-clfA-clfB</i>	b	++
	<i>eno-epbS-icaBC-fib-clfA-clfB</i>	vb	+++
生鸡肉	<i>eno-epbS-icaBC-fib-clfA-clfB</i>	wb	+
	<i>eno-epbS-fib-clfA-clfB</i>	wb	+
	<i>eno-epbS-fib-clfA-clfB</i>	wb	+
	<i>cna-eno-epbS-icaAD-bbp-fib-clfA-clfB</i>	wb	+
	<i>eno-epbS-fib-agr-clfA-clfB</i>	b	+
	<i>cna-eno-fib-agr-clfA-clfB</i>	wb	++
即食食品	<i>fib-fnbB-clfA</i>	b	++
	<i>eno-fib-fnbB-agr-clfB</i>	wb	++
	<i>cna-eno-fnbB-agr-clfA-clfB</i>	wb	++
	<i>eno-ebpS-icaBC-fib-fnbB-clfA-clfB</i>	r	+
	<i>cna-eno-icaBC-sigB-fib-fnbB-agr-clfA</i>	b	++
	<i>cna-eno-icaBC-fib-fnbB-agr-clfA-clfB</i>	wb	++
	<i>eno-ebpS-icaAD-icaBC-sar-fib-clfA-clfB</i>	b	++
速冻饺子	<i>eno-icaBC-fib-fnbB-clfA-clfB</i>	b	+
	<i>eno-icaBC-fib-fnbA-fnbB-clfA-clfB</i>	b	+
	<i>eno-fib-fnbA-fnbB-clfA-clfB</i>	vb	+
	<i>eno-icaBC-fib-fnbA-fnbB-clfA-clfB</i>	vb	+
	<i>eno-icaAD-icaBC-fib-fnbB-clfA-clfB</i>	b	+

注: a: wb:浅黑; b: 黑色; vb: 深黑; r: 红色; +: 弱; ++: 中等; +++: 强。

3 结论

近年来,随着抗生素的大量使用,病原微生物在抗生素选择压力下,不断进化。超耐药MRSA菌株的普遍流行,引发人们的关注。产生物被膜的MRSA菌株不但可以在恶劣的环境中生存,还能屏蔽消毒剂作用,一旦食用被产生物被膜MRSA菌株污染的食物,将会给人类安全带来极大挑战。本研究通过对不同来源MRSA菌株生物被膜形成及相关基因检测,发现不同食物来源MRSA菌株普遍能形成生物被膜,且不同来源菌株生物被膜形成能力存在差异。对生物被膜相关基因检测,发现菌株生物被膜的形成存在ica非依赖机制,且ica表达也并非只受sigB, sar和agr调控基因调控。此外,不同来源MRSA菌株,生物被膜形成相关基因的携带情况也存在差异,由此推测不同来源细菌可能携带不同生物被膜形成相关基因,适应不同的环境条件。虽然,还不能明确解释MRSA菌株生物被膜的形成,随着人们对生物被膜的研究更加深入,已经明确一些调控因子在生物被膜形成过程中的作

用。这也提示是否可以选择一些天然物质,去干预相关调控基因的表达,进而去抑制菌株生物被膜的形成。

参考文献

- [1] Aung K T, Hsu L Y, Koh T H, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in retail food in Singapore [J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2017, 6(1): 94-97
- [2] Buyukcangaz E, Velasco V, Sherwood J S, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(7): 608-617
- [3] Kim Y B, Seo K W, Jeon H Y, et al. Characteristics of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat produced by different integrated broiler operations in Korea [J]. Poultry Science, 2018, 97(3): 962-969
- [4] Chaehong R, Gunjo W. Emergence and characterization of

- foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(12): 2285-2290
- [5] Ivbulė M, Edvīns M, Liene C, et al. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in slaughterhouse environment, pigs, carcasses, and workers [J]. Nephron Clinical Practice, 2017, 61(3): 267-277
- [6] Papadopoulos P N, Papadopoulos T, Angelidis A S, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece [J]. Food Microbiology, 2018, 69(2): 43-50
- [7] WANG Xin, LI Guang-hui, XIA Xiao-dong, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(4): 281-286
- [8] Al-Ashmawy M A, Sallam K I, Abd-Elghany S M, et al. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2016, 33(1): 49-53
- [9] 黄惟彬,黄静,朱家馨,等.临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜表型检测及其相关基因分析[J].实用医学杂志, 2015,31(5):830-833
- HUANG Wei-bin, HUANG Jing, ZHU Jia-xin, et al. Detection of biofilm formation and analysis of biofilm-associated genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical isolates [J]. The Journal of Practical Medicine, 2015, 31(5): 830-833
- [10] Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation [J]. Future Microbiol, 2013, 8(4): 509-524
- [11] 张伟松.食源性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及生物膜形成能力的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2014
- ZHANG Wei-song. Investigation on antimicrobial antimicrobial resistance and biofilm formation of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014
- [12] 吴帆.宁夏地区牛源金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因检测及耐药性研究[D].宁夏:宁夏大学,2017
- WU Fan. Study on detection of bofilm genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from cow in Ningxia [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2017
- [13] 刘美慧,李建科,刘柳.金黄色葡萄球菌生物膜形成相关基因及检测方法的研究进展[J].食品与发酵工业,2016,42(2): 265-269
- LIU Mei-hui, LI Jian-ke, LIU Liu. Perspectives on the related genes and detection methods of *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2): 265-269
- [14] 李冰,刘晓晨,李琳,等.金黄色葡萄球菌生物被膜基因型的分子鉴定[J].现代食品科技,2015,31(7):74-79
- LI Bing, LIU Xiao-chen, LI Lin, et al. Molecular identification of the genotype of *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 74-79
- [15] 李方去,杨锦红,王慧燕,等.两种临床标本中耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌生物膜形成能力的检测与其耐药特征的研究[J].中国微生态学杂志,2012,6:57-59,62
- LI Fang-qu, YANG Jing-hong, WANG Hui-yan, et al. The relationship between resistance spectrum and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two origins [J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 6: 57-59, 62
- [16] Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus [J]. Biomaterials, 2002, 23(21): 4233-4239
- [17] Fox L K, Zadoks R N, Gaskins C T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection [J]. Veterinary Microbiology, 2005, 107(3-4): 295-299
- [18] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci* [J]. Apmis, 2007, 115(8): 891-899
- [19] Cucarella C, Solano C, Valle J, et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(9): 2888-2896
- [20] 孙凤军,枉前,夏培元.临床分离金黄色葡萄球菌生物膜相关基因的 PCR 分析[J].第三军医大学学报,2009,31(15): 1447-1449
- SUN Feng-jun, WANG Qian, XIA Pei-yuan. PCR analysis of clinically isolated *Staphylococcus aureus* biofilm associated gene [J]. Journal of Third Military Medical University, 2009, 31(15): 1447-1449

- [21] Seo Y S, Lee D Y, Rayamahji N, et al. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air [J]. Research in Veterinary Science, 2008, 85(3): 433-438
- [22] 李丽,杨宏军,刘代成,等.奶牛乳腺炎葡萄球菌生物被膜形成及相关基因分析[J].中国农业科学,2011,44(1):160-166
LI Li, YANG Hong-jun, LIU Dai-cheng, et al. Biofilm formation and analysis of associated genes involved in *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(1): 160-166
- [23] 魏莲花,陈晓青,李可可,等.金黄色葡萄球菌生物膜形成及相关基因分析[J].临床检验杂志,2019,37(1):38-40
WEI Lian-hua, CHEN Xiao-qing, LI Ke-ke, et al. Biofilm formation and analysis of associated genes involved in *Staphylococcus aureus* isolates [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2019, 37(1): 38-40
- [24] 李燕,李冬冬,陶传敏,等.表皮葡萄球菌生物膜形成及相关基因的检测及评价[J].中华医院感染学杂志,2010,20(4): 473-476
LI Yan, LI Dong-dong, TAO Chuan-min, et al. Detection and evaluation for biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* and related genes [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2010, 20(4): 473-476
- [25] 张洺嘉,谢明杰,黄芩素抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(3):334-340
ZHANG Ming-jia, XIE Ming-jie. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by baicalein [J]. Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology, 2018, 34(3): 334-340
- [26] Erfan A M, Marouf S H. Biofilm-producing *Staphylococcus aureus* screening in poultry farms and abattoirs reference laboratory for veterinary quality control on poultry production [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2016, 14(10): 273-279
- [27] Sahab, Atshan, Salman. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 1-10
- [28] Ghasemian A, Peerayeh S N, Bakhshi B, et al. Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. Iranian Biomedical Journal, 2016, 20(3): 175-181
- [29] 马伊萨兰,余博旸,陈娟,等.食源性金黄色葡萄球菌粘附素基因的检测及蛋白酶K和DNase I对菌株被膜形成的影响[J].食品工业科技,2016,37(17):185-189,266
MA Yisalan, YU Bo-yang, CHEN Juan, et al. Detection of adhesion genes of *Staphylococcus aureus* food isolates and the effect of proteinase K and DNase I on biofilm formation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(17): 185-189, 266
- [30] Vautor E, Abadie G, Pont A, et al. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 127(3): 407-411

(上接第 307 页)

- [18] 杨月欣,王光亚,潘兴昌,等.中国食物成分表(2018 版)[M].北京:北京大学医学出版社,2018
YANG Yue-xin, WANG Guang-ya, PAN Xing-chang, et al. Ingredient List of Chinese Food [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2018
- [19] Kikugawa K. Prevention of mutagen formation in heated meats and model systems [J]. Mutagenesis, 2004, 19(6): 431-439
- [20] Lan C, Kao T, Chen B, et al. Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 802(1): 27-37
- [21] Jinap S, Mohd-Mokhtar M S, Farhadian A, et al. Effects of varying degrees of doneness on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and beef satay [J]. Meat Science, 2013, 94(2): 202-207
- [22] 郑多多,张雪娇,王南,等.高效液相色谱法测定烧烤制品中 5 种杂环胺的含量[J].食品安全质量检测学报,2018,9(20): 35-41
ZHENG Duo-duo, ZHANG Xue-jiao, WANG Nan, et al. Determination of 5 kinds of heterocyclic aromatic amines in grilled meat by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(20): 35-41