

冷却猪肉及托盘表面细菌生物被膜分析和肉源荧光假单胞菌的鉴定与被膜研究

刘永吉^{1,2}, 谢晶¹, 赵丽珺¹, 董韩博¹

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306) (2. 韶关学院英东食品科学与工程学院, 广东韶关 512005)

摘要: 为研究冷却猪肉及其接触面中细菌生物被膜能力并探讨肉类特定腐败菌的生物被膜特征, 分析了腐败的冷却肉和销售托盘表面的细菌生物被膜形成能力; 利用形态学观察、16S rDNA 分析和 VITEK2 微生物鉴定系统鉴定了冷却肉中一株生物被膜能力较强的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*); 测定了该菌在培养基和猪肉浸提液中的生物被膜能力; 用激光共聚焦和扫描电子显微镜观测了其生物被膜的结构特征。结果发现: 冷却肉中及其销售托盘表面的细菌能够形成生物被膜的比例较高, 37% 和 45% 的细菌具有较强生物被膜形成能力。肉源性荧光假单胞菌能够在培养基和肉液中形成大量生物被膜, 具有较强的生物被膜能力。显微成像结果表明荧光假单胞菌在培养 6 h 后有明显黏附, 18 h 后多糖分泌增多、菌体堆积并形成具有生物功能的立体生物被膜。这些特点可能有利于荧光假单胞菌在冷却肉表面黏附并成为优势腐败菌。

关键词: 生物被膜; 冷却肉; 托盘接触面; 荧光假单胞菌; 结构特征; 细菌鉴定

文章编号: 1673-9078(2016)6-42-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.008

Biofilm-Forming Ability of Bacteria from Chilled Pork and Tray Surfaces and Biofilm Characteristics of Meat-Related *Pseudomonas fluorescens*

LIU Yong-ji^{1,2}, XIE Jing¹, ZHAO Li-jun¹, DONG Han-bo¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Henry Fok School of Food Science and Engineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract: The biofilm-forming ability of bacteria in chilled pork and on tray surfaces, and the biofilm characteristics of specific spoilage bacteria in meat were analyzed. One strain in chilled meat with a strong biofilm-forming ability was identified as *Pseudomonas fluorescens* by morphological observation, 16S rDNA sequence analysis, and a VITEK2 microbial identification system. The biofilm-forming ability of this meat-related specific spoilage bacterium was measured in tryptic soy broth (TSB) and pork extract. Additionally, the structural characteristics of biofilms were evaluated by confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy. A high percentage of the bacteria in chilled pork and on tray surfaces were capable of forming biofilms, and 37% and 45% of bacteria from chilled pork and tray surfaces showed strong biofilm-forming abilities, respectively. *Pseudomonas fluorescens* formed large amounts of biofilm in both TSB culture and pork extract. The microscopic imaging results showed an apparent adhesion of *Pseudomonas fluorescens* after six hours of culture, and increasing polysaccharide secretion, bacterial accumulation, and formation of three-dimensional biofilms with biological function were observed after 18 hours. These features may be beneficial for the meat-related *Pseudomonas fluorescens* to adhere to chilled meat surfaces and become the dominant spoilage bacteria.

Key words: biofilms, chilled pork, tray surface, *Pseudomonas fluorescens*, structural characteristics, bacterial identification

多种食源性细菌具有形成生物被膜的能力。这些食源性腐败菌和致病菌一旦在食品或食品接触面上形成

收稿日期: 2015-08-22

基金项目: 国家“十二五”支撑计划课题 (2013BAD19B06)

作者简介: 刘永吉 (1983-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事食品加工与微生物方面研究

通讯作者: 谢晶 (1968-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事食品保鲜与食品冷冻冷藏方面研究

成生物被膜, 它们就具有更强的适应性和抵抗力。这使常规的抑菌、杀菌、清洗和消毒措施失去应有效果; 进而更容易导致食品腐败和食源性疾病的发生, 还会导致食品设备的清洗困难、腐蚀、传热传质受影响等多种危害^[1-3]。这些危害在肉制品^[4,5]、乳制品^[6,7]、禽肉、水产品 and 即食食品等^[8]多类食品工业中都引起了广泛关注。但目前关于食源性细菌生物被膜的研究多集中在致病菌, 而对腐败菌生物被膜的研究相对较少,

而且以食品为直接介质的生物被膜研究更少。

冷却肉在我国的消费量很高,但冷却肉在分割过程中比表面积逐渐增大,在加工和陈列销售过程中与多种接触面接触,容易被自身和接触面上的细菌污染而腐败。在冷却肉的腐败过程中,假单胞菌(*Pseudomonas spp*)始终是优势腐败菌^[9,10];这可能与其较强的竞争能力和低温适应性有关^[11,12]。此外,假单胞菌属的多种细菌能够形成生物被膜^[13],也能够在食品或食品接触面上形成生物被膜^[4,14],这有利于其黏附、适应环境并成为优势腐败菌。其中,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是冷却肉类最主要的腐败菌之一^[10,15],具有较强的生物被膜能力,而且不同来源的荧光假单胞菌生物被膜形成能力差别较大^[16,17]。尽管荧光假单胞菌的生物被膜已有较多研究,但食源性荧光假单胞菌的生物被膜研究仍然不多,且多数集中在牛奶中的荧光假单胞菌^[18]。国内对肉源荧光假单胞菌生物被膜形成能力、三维结构特点等的报道较少,研究肉制品中荧光假单胞菌的生物被膜能够丰富对该特定腐败菌的认识。

本研究旨在分析评估冷却肉中和其销售托盘表面的细菌生物被膜形成能力,鉴定并研究冷却肉中生物被膜形成能力较强的荧光假单胞菌生物被膜,观察荧光假单胞菌生物被膜在激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜下的发展过程和结构特点,并测定其在猪肉提取液中的被膜能力,为认识冷却肉及其销售环境中的生物被膜风险和肉源性荧光假单胞菌的生物被膜特征提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

猪大排里脊购于当地某大型超市,冷藏箱运回实验室,将肉块置于无菌塑料盒中,覆盖聚乙烯膜于 4 ± 1 °C贮藏。

销售环境中的托盘为某大型超市冷藏柜中盛放冷却肉的在用塑料托盘,托盘是超市中可反复使用的展放冷鲜肉的大托盘(长约55 cm,宽约40 cm)。

1.1.2 主要设备与试剂

营养琼脂培养基、胰酪胨大豆肉汤(Tryptic soy broth, TSB)培养基、氧化酶试剂,青岛海博科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;引物由上海生物工程有限公司合成;FITC-conA (Fluoresce inisothiocyanate-conjugated concanavalin A, FITC-ConA),美国Sigma公司。

DHP-9162 电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;Mastercycler@proS PCR仪,德国Eppendorf公司;VITEK®2 Compact自动微生物鉴定系统,法国生物梅里埃公司;Zeiss LSM 710激光共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM),德国Carl Zeiss公司;S-3400N扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM),日本HITACHI公司。

1.2 方法

1.2.1 冷却猪肉中和托盘中的细菌采样与分离

取在 4 ± 1 °C贮藏至有明显感官腐败的猪肉,按照GB4789.2-2010《食品卫生微生物学检验:细菌总数测定》介绍的方法取样测定菌落总数。取合适梯度的平板,挑取所有菌落,三次划线分离,纯化后用TSB培养基过夜活化单菌落,甘油管-20 °C保存菌种。

在超市中取刚刚盛放过冷却肉的托盘(随机选2个托盘),用无菌生理盐水湿润的棉球擦拭托盘,每个托盘2个点取样点,取样点为托盘中间1/3处和2/3处(较长方向)各1点,每个点的面积约5 cm²。在取样点用1个棉球反复擦拭,将棉球放入装有无菌生理盐水中,振荡混匀。吸取1 mL悬液进行稀释,3个合适的稀释梯度,倾注平板记数。按照上述方法分离、纯化、保存菌种。

1.2.2 冷却猪肉中和托盘中细菌的生物被膜形成能力分析

将获得的所有菌株,参照文献^[19,20]用微孔板结晶紫染色法进行生物被膜形成能力定性、定量测定。将两次过夜活化的菌悬液调整至菌密度OD₆₀₀值约为0.5,移取5 μL菌液至含有195 μL TSB培养基的96孔酶标板中,每种菌至少做4个平行样,并作空白对照和重复实验。将孔板30 °C培养24 h,待细菌形成生物被膜后移出浮游菌,用生理盐水清洗孔板三次除净浮游菌,用200 μL甲醇固定15 min,移去甲醇并晾干。每孔加入200 μL的1%结晶紫溶液染色5 min,染液移出后流水清洗孔板至滴水无色。将孔板自然晾干后每孔加入33%的乙酸200 μL,用酶标仪测定655 nm处的吸光度。所有的测试均每组求平均值,以空白培养基作为阴性对照,阈值(A_c)定义为阴性控制A₀值的2倍。根据实测得A值,把细菌形成生物被膜能力的菌株分为不形成生物被膜菌株(A≤A₀),生物被膜形成能力较弱菌株(A₀≤A≤A_c),生物被膜形成能力中等菌株(A_c≤A≤2A_c),以及生物被膜形成能力较强菌株(2×A_c≤A)^[21]。

1.2.3 冷却肉猪肉生物被膜能力较强的一株细

菌的鉴定

根据生物被膜形成能力的分析结果,选取生物被膜能力较强的一株细菌,进行革兰氏染色、形态观察、氧化酶实验和葡萄糖氧化发酵实验等基本生化鉴定。

随后进行 16SrDNA 鉴定确定细菌所在的属。用细菌 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。用细菌通用引物,上游引物(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'; 下游引物(1492R): 5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3'; 以细菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 0.25 μL *Taq* 酶, 5 μL 10 \times PCR buffer, 4 μL dNTP mixture, 引物各 2 μL , 100~150 ng 模板 DNA, 无菌双蒸水补至 50 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后,送上海生物工程有 限公司测序。测序结果在 GenBank 中进行 Blast。下载相似序列,采用 MAGE6.0 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,根据结果判断细菌所在的属。

最后对细菌进行 VITEK 2 Compact 鉴定确定细菌所在的种。将纯化的菌在营养琼脂上活化,挑数个菌落形态相同的新鲜菌落于 3 mL 无菌生理盐水管中。混匀菌液,用比浊仪校正浊度达到 0.5~0.63。将菌液管及 VITEK 2 革兰氏阴性杆菌鉴定卡(VITEK 2 Gram-Negative Identification Card, GN)卡置于载卡架上,由仪器自动完成测定。根据仪器鉴定结果判断细菌所在的种。

1.2.4 不同时间的生物被膜量测定

按照 1.2.2 的方法接种平板,将孔板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养分别培养 6 h、12 h、18 h 和 24 h,培养结束后移取菌液测定对应时间的菌密度 OD_{600} ,并按照上述方法染色后测定生物被膜值,并做对照空白试验和重复实验。

1.2.5 生物被膜结构和胞外多糖的激光共聚焦成像

激光共聚焦显微镜是实时观察细菌生物被膜的有效手段,可不破坏细菌生物被膜的基本结构。将过夜化后的菌液稀释至 $\text{OD}_{600}=0.5$,1%接种于含无菌盖玻片(12 mm \times 12 mm)和 2 mL TSB 培养基的 24 孔板中。将 24 孔板至于 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别培养 6 h、12 h、18 h 和 24 h 后将菌液轻轻吸出,用 0.05 mol/L 的 PBS 清洗 3 次,每次 3~5 min。然后用 2.5%戊二醛固定 2 h 并再次用 PBS 清洗;从玻片边缘吸干水份后,在玻片上滴加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 FITC-conA 覆盖^[22],置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min。用 PBS 冲洗后制作载玻片,用卡尔蔡司 710 激光共聚焦显微镜采集图像,并用仪器自带软

件处理图片。

1.2.6 生物被膜形结构的扫描电镜观察

用扫描电子显微镜下观察生物被膜的微观结构^[23]。将过夜化后的菌液稀释至 $\text{OD}_{600}=0.5$,1%接种于含无菌盖玻片(12 mm \times 12 mm)和 2 mL TSB 培养基的 24 孔板中。将 24 孔板至于 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别培养 6 h、12 h、18 h 和 24 h 后将菌液吸出,用 0.05 mol/L 的 PBS 清洗 3 次,每次 3~5 min。加入 2.5%戊二醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,再次用 0.05 mol/L PBS 清洗 3 次。依次用 50%、70%、80%、90%、95%乙醇脱水各 10 min,100%乙醇脱水 3 次,每次 10 min。最后将盖玻片用 CO_2 临界点干燥仪干燥,喷金,扫描电镜观察。

1.2.7 猪肉提取液中生物被膜形成规律测定

猪肉提取液的制作:取 100 g 新鲜猪大排背脊肉,加入 500 mL 水,匀浆两次,每次 30 s;将匀浆液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 5000 g 离心 15 min,取上清;将上清液过 0.22 μm 的滤膜后备用。

将过夜化后的菌液稀释至 $\text{OD}_{600}=0.5$,取 5 μL 稀释后的菌液至含有 195 μL 猪肉提取液的 96 孔板中,将孔板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养分别培养 6 h、12 h、24 h 和 48 h,培养结束后移取菌液测定对应时间的菌密度 OD_{600} ,按照 1.2.2 中的测定生物被膜形成能力,并做空白对照和重复实验。

1.2.8 数据统计与分析

实验数据用 Excel 软件汇总,显著性分析采用 SPSS 19.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) 分析软件单因素 ANOVA 中的 Tukey 检验,显著性水平设定为 $p<0.05$,使用 OriginPro 8.0 (OriginLab Co. Northampton, USA) 制图。

2 结果与分析

2.1 冷却肉中及其托盘表面细菌的生物被膜形成能力分析

细菌形成生物被膜后更容易在食品和各种食品接触面上黏附^[8],也更容易导致交叉污染,所以细菌生物被膜被认为是导致食品质量安全问题的潜在风险。为分析和评估实际环境下冷却肉中及其接触面环境中细菌形成生物被膜的情况,以腐败冷却肉和实际的销售托盘表面的细菌为对象进行了研究,结果如表 1 所示。从腐败的冷却猪肉中(菌落总数为 2.5×10^9 CFU/g)分离了 78 株细菌。其中有 62 株菌生物被膜形成阳性,阳性率为 79%;有 29 株菌具有较强的生物被膜形成能力,占总数的 37%。从冷却肉的盛放销售托盘表面

(菌落总数为 3.6×10^4 CFU/cm²) 分离得到 69 株细菌。其中有 52 株生物被膜形成阳性, 阳性率为 75%; 有 31 株菌具有较强的生物被膜形成能力, 占总数的 45%。冷却肉托盘表面中具有较强生物被膜形成能力的细菌比例略高于冷却肉中具有较强生物被膜能力的细菌。研究结果与他人推断的“多数细菌以生物被膜状态群居生长”^[24]相一致。但有研究从中国大白菜中分离了 15 株腐败菌并研究了它们的生物被膜能力, 但只有少量细菌具有较强的生物被膜形成能力^[25]。本研究腐败猪肉种细菌的取样点在腐败后期, 尽管取样点能够代表腐败菌的生物被膜形成比例, 但也存在部分菌是同一株菌的不同克隆的可能(可能导致所得到的百分值略较高)。如何避免这种问题, 值得后续研究注意。

表 1 冷却肉中及其托盘表面细菌的生物被膜形成能力分布表

	生物被膜形成能力			
	强	中	弱	无
冷却猪肉中	29(37%)	21(27%)	12(15%)	17(21%)
销售托盘表面	31(45%)	13(19%)	8(12%)	17(25%)

2.2 产生物被膜能力较强的菌株鉴定

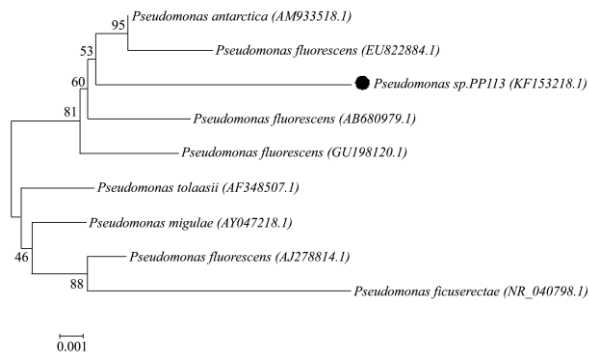


图 1 *Pseudomonas sp.* 113 的 16SrDNA 序列的系统发育树
Fig.1 Phylogenetic tree of *Pseudomonas sp.* 113 based on 16S rDNA gene sequences

根据成膜能力大小, 实验对一株生物被膜能力较强的菌株进行了全面鉴定。该菌简单的生理生化鉴定结果显示: 该菌为革兰氏阴性杆菌、氧化酶阳性、O/F 实验阴性、有鞭毛能够运动且可以产荧光素。进一步

根据 16SrDNA 测序结果 (GenBank 登录号: KF153218), 将待测菌的 16SrDNA 序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 搜索, 从搜索结果中选取相似性 99% 以上的代表菌株构建了系统发育树, 结果如图 1。从检索结果和构建的发育树判断, 该菌属于假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*), 且可能与荧光假单胞菌具有较近的进化关系。综合生理生化和 16SrDNA 鉴定结果, 将该菌认定为 *Pseudomonas sp.* 113。

假单胞菌属细菌不同种之间的相似性较大, 简单生理生化鉴定不能完全确定细菌所属的种 (species), 而 16S rDNA 鉴定结果也只能确定细菌的属。利用 VITEK 2 细菌自动鉴定系统可快速测定目标菌株的多种生化反应特点, 并与数据库中的标准菌株生化反应特点进行相似行比对。该系统可靠性较高, 李婷婷等^[26]用此系统鉴定了三文鱼中的优势腐败菌荧光假单胞菌。*Pseudomonas sp.* 113 的 VITEK 2 鉴定结果如表 2 所示, 该菌的 GN 卡具体反应信息如表 3 所示。该菌的实测反应与荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 的典型反应谱符合程度高达 99%, 且鉴定信息可信度极好。综合判断, 这株具有较强生物被膜形成能力的细菌是荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*), 认定为 *Pseudomonas fluorescens* 113。

2.3 肉源性荧光假单胞菌生物被膜形成规律

特点

培养不同时间后, 该肉源性荧光假单胞菌的菌密度和生物被膜形成量如图 2 所示。随培养时间的延长, 荧光假单胞菌的菌密度符合细菌的典型增长模式, 6 h 后处于对数增长期的前期, 12 h 时为对数增长中后期, 18 h 后接近稳定期。荧光假单胞菌的生物被膜形成量随时间延长而显著增加, 培养 24 h 后生物被膜的形成量 (OD_{655 nm}) 达到 1.418 ± 0.122 。这些结果与激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜的观察结果基本一致。该肉源荧光假单胞菌在 TSB 中的生物被膜能力强于从乳制品设备表面分离得到的假单胞菌的被膜能力^[18]。

表 2 *Pseudomonas sp.* 113 的 VITEK2 系统鉴定结果

Table 2 Identification of *Pseudomonas sp.* 113 by VITEK 2 Compact system

菌株	中文名称	英文名称	百分概率	鉴定可信度	Bionumber
113	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%	Excellent identification	0001051000101000

表3 *Pseudomonas sp* 113 在 VITEK2 的 GN 卡生化反应信息结果

Table 3 Biochemical details of *Pseudomonas sp* 113 on the GN card

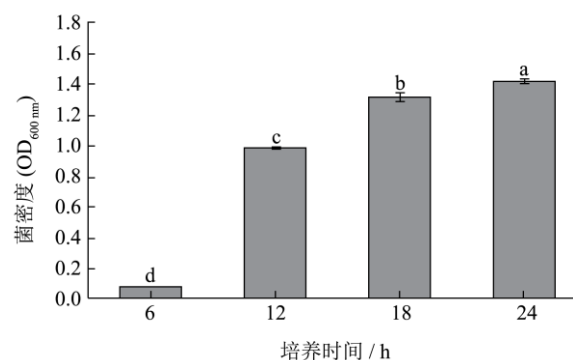
孔号	名称及缩写	113	孔号	名称及缩写	113
2	丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 (APPA)	-	33	蔗糖 (SAC)	-
3	侧金盏花醇 ADO	-	34	D-塔格糖 (dTAG)	-
4	吡咯烷基芳胺酶 (PyrA)	-	35	D-海藻糖 (dTRE)	-
5	L-阿拉伯醇 (IARL)	-	36	柠檬酸钠盐 (CIT)	-
7	D-纤维二糖 (dCEL)	-	37	丙二酸盐 (MNT)	-
9	β -半乳糖苷酶 (BGAL)	-	39	(5KG)	-
10	H ₂ S 产生 (H ₂ S)	-	40	乳酸盐产碱 (ILATk)	-
11	β -N-乙酰葡萄糖苷酶 (BNAG)	-	41	α -葡萄糖 (AGLU)	-
12	谷氨酰芳胺酶 (AGLTp)	-	42	琥珀酸盐产碱 (SUCT)	-
13	D-葡萄糖 (dGLU)	+	43	N-乙酰- β -半乳糖氨酶 (NAGA)	-
14	γ -谷氨酰转移酶 (GGT)	-	44	α -半乳糖苷酶 (AGAL)	-
15	葡萄糖发酵 (OFF)	-	45	磷酸酶 (PHOS)	-
17	β -葡萄糖苷酶 (BGLU)	-	46	氨基乙酸芳胺酶 (GlyA)	-
18	D-麦芽糖 (dMAL)	-	47	鸟氨酸脱羧酶 (ODC)	-
19	D-甘露醇 (dMAN)	-	48	赖氨酸脱羧酶 (LDC)	-
20	D-甘露糖 (dMNE)	-	53	组氨酸同化 (IHISa)	-
21	β -木糖苷酶 (BXYL)	-	56	COURMARATE (CMT)	-
22	β -丙氨酸芳胺酶 (BALap)	+	57	β -葡萄糖苷酸酶 (BGUR)	-
23	L-脯氨酸芳胺酶 (ProA)	+	58	O/129 耐受 (O129R)	-
26	脂酶 (LIP)	-	59	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 (GGAA)	-
27	古老糖 (PLE)	-	61	L-苹果酸盐同化 (IMLTa)	-
29	酪氨酸芳胺酶 (TyrA)	-	62	ELLMAN (ELLM)	-
31	尿素酶 (URE)	-	64	L-乳酸盐同化 (ILATa)	-
32	D-山梨醇 (dSOR)	-			

注：“113”代表细菌“*Pseudomonas sp* 113”“-”表示阴性结果，“+”表示阳性结果。

2.4 肉源荧光假单胞菌生物被膜的激光共聚焦实时观察

细菌的胞外多糖是生物被膜的主要成分，是维持生物被膜结构和功能的重要成分。荧光染料 FITC 标记的 ConA 可与细菌的胞外多糖特异结合并发出绿色荧光。用 FITC-ConA 将荧光假单胞菌的生物被膜染色标记后，激光共聚焦显微镜观察结果如图 3 所示。培养 6 h 后荧光假单胞菌开始聚集（图 3A），其胞外多糖和菌体呈散落状分布，只在部分区域形成少量堆积。12 h 后细菌聚集明显，胞外多糖和菌体开始堆状分布且周围布满孔隙，生物被膜立体结构（图 3B）呈堆状连结。18 h 后菌落融合发展，多糖和菌体不均布满整个区域（图 3A），生物被膜立体结构呈毯状平铺。24 h

后荧光假单胞菌进一步堆积，体积变厚，生物被膜结构沟壑分化明显（图 3A）；基本发展成为成熟的生物被膜。本研究并未观察到荧光假单胞菌形成蘑菇状生物被膜结构。该肉源荧光假单胞菌在 6 h 就开始在接触面上有黏附。这可能因为荧光假单胞菌具有很强的黏附能力，能快速黏附到接触面上^[27]。



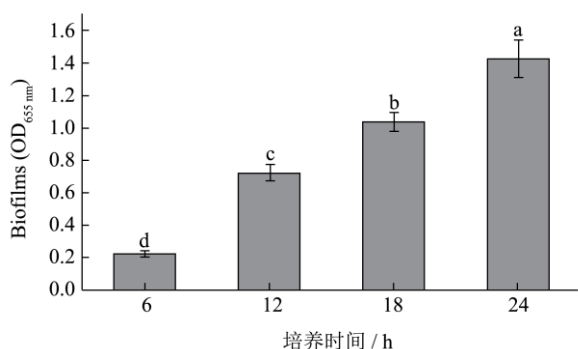


图2 不同时间荧光假单胞菌的生物被膜形成量

Fig.2 Amount of biofilm formed by *Pseudomonas fluorescens* over time

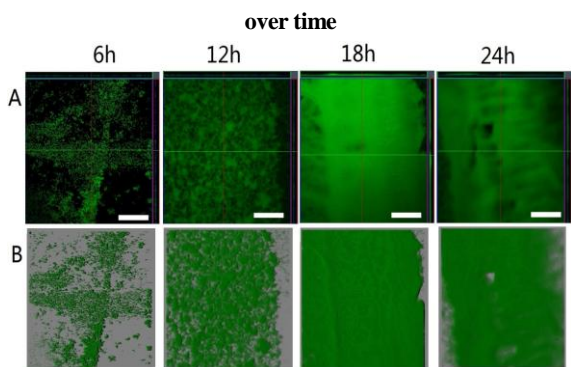


图3 激光共聚焦显微镜下荧光假单胞菌的生物被膜结构图和胞外多糖聚集图

Fig.3 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of biofilm structures and the extracellular polysaccharide accumulation of *Pseudomonas fluorescens*

注: (A) 为比邻荧光图像, (B) 为 3D 阴影图, 标尺为 100 μm。

2.5 肉源荧光假单胞菌生物被膜微观结构的 SEM 观察

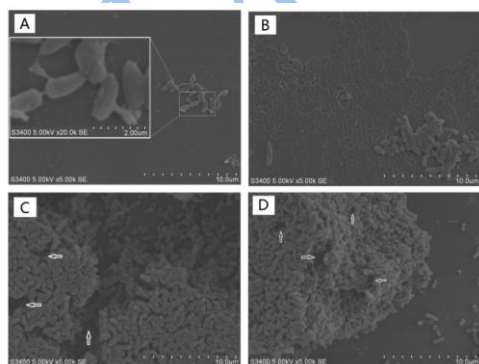


图4 扫面电镜下荧光假单胞菌的生物被膜结构变化图

Fig.4 Scanning electron microscopy (SEM) images of *Pseudomonas fluorescens* biofilms

注: (A), (B), (C), (D) 分别为培养 6h、12h、18h 和 24h 的扫描电镜图, 其中 (A) 中的小图代 A 图的表局部放大

图。

激光共聚焦显微镜可实时观察生物被膜的整体发展和结构, 而 SEM 可以在高倍镜下观察生物被膜的微观结构。荧光假单胞菌的 SEM 成像结果如图 4 所示。在 6 h 后荧光假单胞菌的菌体少量链接在一起, 细菌表面和菌体之间有胞外分泌物堆积 (图 4A) 或链接 (图 4A, 放大部分); 18 h 和 24 h 后菌体大量堆积, 生物被膜体积变大, 且集聚体之间有明显的沟壑, 见图 4C 及箭头处; 生物被膜内部有孔状的类似通道的结构, 见图 4D 及箭头处。生物被膜内部的这种结构可能有利于细菌营养物质、水的吸收和代谢物的排泄 [28]。

2.5 荧光假单胞菌在猪肉提取液中生物被膜能力研究

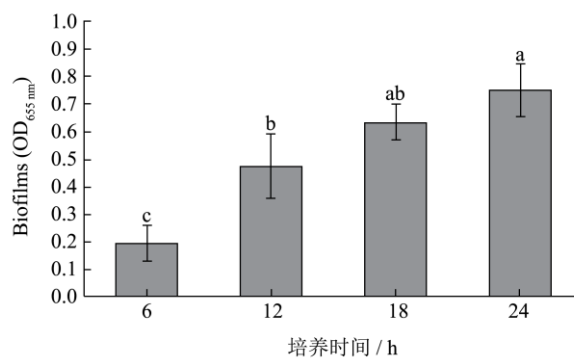
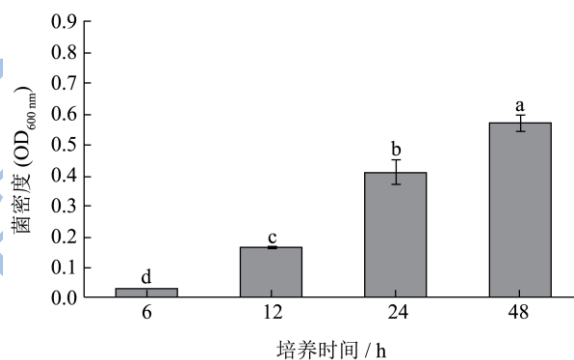


图5 荧光假单胞菌在肉液中的生物被膜形成能力

Fig.5 Biofilm-forming ability of *Pseudomonas fluorescens* in meat extract

以无菌的猪肉浸提液为培养基, 研究了荧光假单胞菌在食品体系中的生物被膜能力, 结果如图 5 所示。该肉源性荧光假单胞菌能够在猪肉提取液中形成生物被膜。荧光假单胞菌在猪肉提取液中的增长速度 (图 5) 明显低于在 TSB 培养基中的增长速度 (图 2), 48 h 后 OD_{600nm} 达到 0.567±0.028。荧光假单胞菌在肉浸提液中的对数增期较缓慢, 在测定的时期内不呈“S”型增长; 与其它研究结果类似 [29], 这可能与肉浸提

液的营养、pH 值等因素有关。随着菌密度的增加,细菌生物被膜的产量逐渐增加,48 h 后达到 OD_{655nm} 达到 0.7481 ± 0.099 。假单胞菌在猪肉提取液中的生物被膜产量低于在 TSB 培养基中对应时期的生物被膜产量。这可能是由于生物被膜的形成与菌密度的高低、环境条件的影响有关^[30]。而且细菌生物被膜的形成受多种因素的影响^[31];其中,营养条件能够明显导致假单胞菌浮游菌和生物被膜菌数量的不同,进而影响它们的生物被膜能力^[32];如培养基的碳源、pH 值等都会影响荧光假单胞菌的生物被膜形成情况^[33]。

3 结论

冷却肉及其销售托盘表面的细菌能够形成生物被膜的比例较高,具有较强生物被膜形成能力细菌比例分别占总数的 37% 和 45%;这对冷却肉质量安全的控制是较大风险。鉴定的肉源性荧光假单胞菌具有较强的生物被膜形成能力,培养 6 h 后开始明显黏附;18 h 后多糖分泌增多、菌体堆积并形成具有立体结构的生物被膜。荧光假单胞菌在猪肉提取液中也同样具有较强的生物被膜形成能力。这些特点可能有利于荧光假单胞菌在冷却肉表面黏附并成为优势腐败菌。本研究为进一步研究冷却肉及其接触环境中的细菌生物被膜提供了依据,也有利于进一步研究肉源性荧光假单胞菌的生物被膜及其致病特征。

参考文献

- [1] Winkelstroter L K, Teixeira F B D, Silva E P, et al. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology [J]. *Microbial Ecology*, 2014, 68(1): 35-46
- [2] Van Meerven E, De Weirdt R, Van Coillie E, et al. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer [J]. *Pathogens and Disease*, 2014, 70(3): 332-338
- [3] 李燕杰,杨公明,朱小花,等.从生物被膜看食品机械安全性设计准则的必要性[J].*农业工程学报*,2008,24(11):302-307
LI Yan-jie, YANG Gong-ming, ZHU Xiao-hua, et al. Reconsidering safety design criteria for food machinery in terms of biofilm [J]. *Transactions of the CSAE*, 2008, 24(11):302-307
- [4] Giaouris E, Heir E, Hebraud M, et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods [J]. *Meat Science*, 2014, 97(3): 298-309
- [5] 王静慧,韩剑众,曲道峰.肉制品生产中细菌生物被膜的危害及其控制[J].*食品科学*,2012,33(21):351-354
- [6] WANG Jing-hui, HAN Jian-zhong, QU Dao-feng. Hazard and control of bacterial biofilm in the meat industry [J]. *Food Science*, 2015, 33(6): 14-18
- [7] Anand S, Singh D, Avadhanula M, et al. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(1): 18-33
- [8] Teh K H, Flint S, Palmer J, et al. Biofilm - An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(1): 32-40
- [9] 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
- [10] Remenant B, Jaffres E, Dousset X, et al. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties [J]. *Food Microbiol*, 2015, 45(Pt A): 45-53
- [11] Nychas G J, Skandamis P N, Tassou C C, et al. Meat spoilage during distribution [J]. *Meat Sci.*, 2008, 78(1-2): 77-89
- [12] Eberl H J, Collinson S. A modeling and simulation study of siderophore mediated antagonism in dual-species biofilms [J]. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2009, 6(1): 30
- [13] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(1-2): 79-97
- [14] Mann E E, Wozniak D J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(4): 893-916
- [15] Van Houdt R, Michiels C W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1117-31
- [16] Belak A, Kovacs M, Hermann Z, et al. Molecular analysis of poultry meat spoiling microbiota and heterogeneity of their proteolytic and lipolytic enzyme activities [J]. *Acta Alimentaria*, 2011, 40: 3-22
- [17] Workentine M L, Wang S Y, Ceri H, et al. Spatial distributions of *Pseudomonas fluorescens* colony variants in mixed-culture biofilms [J]. *Bmc. Microbiology*, 2013, 13
- [18] Simos M, Simos L C, Vieira M J. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128(2): 309-316
- [19] Aswathanarayan J B, Vittal R R. Attachment and biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 isolated from a dairy processing line [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2014, 23(6): 1903-1910

- [19] Pickering B S, Smith D R, Watnick P I. Glucose-specific enzyme IIA has unique binding partners in the vibrio cholerae biofilm [J]. MBio, 2012, 3(6): e00228-12
- [20] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation [J]. J. Microbiol. Methods, 2000, 40(2): 175-9
- [21] Elsayy A, Almehdar H, Redwan E M. Biofilm formation inhibition of multidrug-resistant of clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* by lactoferrin [J]. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2013, 7(1): 129-132
- [22] Quiles F, Polyakov P, Humbert F, et al. Production of extracellular glycogen by *Pseudomonas fluorescens*: spectroscopic evidence and conformational analysis by biomolecular recognition [J]. Biomacromolecules, 2012, 13(7): 2118-27
- [23] Simões M, Simões L C, Machado I, et al. Control of flow-generated biofilms with surfactants [J]. Food and Bioproducts Processing, 2006, 84(4): 338-345
- [24] Donlan R M, Costerton J W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2): 167-193
- [25] Bae Y M, Zheng L, Hyun J E, et al. Growth characteristics and biofilm formation of various spoilage bacteria isolated from fresh produce [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(10): 2072-2080
- [26] 李婷婷, 丁婷, 邹朝阳, 等. 0℃冷藏下三文鱼片菌相变化规律及特定腐败菌的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2015, 31(4): 36-41
LI Ting-ting, DING Ting, ZOU Zhao-yang, et al. Differential prevalence of spoilage bacteria in salmon fillets during refrigerated storage and identification of predominant spoilage bacterial species [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(4): 36-41
- [27] Midelet G, Carpentier B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food [J]. J. Appl. Microbiol., 2004, 97(2): 262-70
- [28] Morales D K, Grahl N, Okegbe C, et al. Control of *candida albicans* metabolism and biofilm formation by *pseudomonas aeruginosa* phenazines [J]. mBio, 2013, 4(1): e00526-12
- [29] Lebert I, Begot C, Lebert A. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8~7.0), water activity (0.97~1.00) and temperature (7~25 °C) [J]. International Journal of Food Microbiology 1998, 39: 53-60
- [30] R Oliveira, Melo A O, R Salgueiro. Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* effects of pH and surface material [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1994, 2: 41-46
- [31] 李燕杰, 杜冰, 董吉林, 胡文峰, 等. 食品中细菌生物被膜及其形成机制的研究进展[J]. 现代食品科技, 2009, 4: 435-438+450
LI Yan-jie, DU Bing, DONG Ji-lin, HU Wen-feng, et al. The qualitative observation of biofilm formation for *Pseudomonas fluorescens* and its affective factors [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(6): 14-18
- [32] Crookes-Goodson W J, Bojanowski C L, Kay M L, et al. The impact of culture medium on the development and physiology of biofilms of *Pseudomonas fluorescens* formed on polyurethane paint [J]. Biofouling, 2013, 29(6): 601-615
- [33] 黄迅辰, 戴贤君. 荧光假单胞菌生物膜的定性观察及影响因素研究[J]. 食品科技, 2015, 40(6): 14-18
HUANG Xun-chen, DAI Xian-jun. The qualitative observation of biofilm formation for *Pseudomonas fluorescens* and its affective factors [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(6): 14-18