

腐败牛奶中三种细菌生物被膜特性探究

周文渊, 张宏梅, 姜燕, 黄慧嫦, 陈胜华, 廖丁妹, 郭凯, 张文艳, 杨安林

(广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 生物被膜的形成给牛奶保藏和保鲜带来极大的隐患,探讨牛奶腐败过程中生物被膜形成特性以及寻求有效的抑制生物被膜的方法具有重要意义。本实验通过微孔板法模拟牛奶腐败过程, 研究食源性金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌和大肠杆菌在牛奶中生物被膜形成能力、生物被膜中活菌数目与种间群体感应信号分 AI-2 活力三者之间的关系。随后利用 AI-2 抑制剂呋喃酮, 检测三种细菌生物被膜形成能力及 AI-2 活力变化。最后证明, 三种细菌生物被膜形成能力、生物被膜中活菌数目以及 AI-2 活力顺序均是金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>沙门氏菌。添加呋喃酮之后, 三种细菌的生物被膜形成能力以及 AI-2 活力均下降, 其中金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力下降为原来的 25%。因此表明, 此三种细菌生物被膜形成能力的大小可能是通过调节生物被膜中 AI-2 的活力实现的。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌; 沙门氏菌; 细菌生物被膜

文章编号: 1673-9078(2014)1-87-90

Biofilm Characteristics of Several Foodborne Bacteria in Spoiling Milk

ZHOU Wen-yuan, ZHANG Hong-mei, JIANG yan, HUANG Hui-chang, CHEN Sheng-hua, LIAO Ding-mei, GUO Kai, ZHANG Wen-yuan, YANG An-lin,

(Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Bacterial biofilm brought great threat in milk preservation. Thus it is very important to research the formation features of biofilm during milk corruption and find an effect way to eliminate the biofilm. The relationship between the biofilm formation ability, the viable count in the biofilm and the AI-2 activity of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Escherichia coli* in the process of milk spoilage were investigated by the method of microtitreplate. The change of biofilm and AI-2 activity after the addition of furanone was tested. Then the gradient concentrations of furanone indicated the relevance between the furanone and the quantity of bacteria in the biofilm. The results showed that the sequence of three bacteria for biofilm formation ability, the viable count in the biofilm and the AI-2 activity was *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Salmonella*. Besides, the biofilm formation ability and AI-2 activity both declined after adding furanone, and the biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* reduced to 25%. Thus the results indicated that the ability of biofilm formation might be regulated by the AI-2 activity which was secreted by the viable isolates in the biofilm.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Salmonella*; biofilm

生物被膜是微生物为适应胁迫环境、形成有利于生存的特殊生长状态。是由自身分泌胞外粘质物(如多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等)包裹的, 具有高度组织化的多细胞群体结构^[1-2]。生物被膜的形成机制非常复杂, 近来研究表明其形成与群体感应系统的调控密切相关。1993年, 在哈氏弧菌中发现信号分子(Autoinducer-2, AI-2), 其化学结构是呋喃酮酰硼酸二酯^[3], 其属于种间传递信号分子。目前发现该信号分

收稿日期: 2013-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(31301480); 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)

作者简介: 周文渊(1990年-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食源微生物耐药机制

通讯作者: 张宏梅(1975年-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食源微生物耐药机制

子及其合成酶 LuxS 保守且存在于超过 60 种微生物中, 大量研究已经证明 AI-2 不仅在细菌与细菌之间, 甚至在细菌与真菌之间的通讯也起到非常重要作用^[4]。在 Stankowska 的研究中已经报道了 AI-2 与生物被膜形成的关系, 探讨了群体感应抑制分子在其生物被膜的形成中具有重要的作用^[5]。由于生物被膜的形成在卫生医疗以及食品安全等领域具有严重威胁, 因此前人做了大量的研究来抑制生物被膜形成, 如利用抗菌肽、香精油类等抑制生物被膜的研究^[6-7]。近年来, 越来越多的科学家将目光投注到群体感应抑制分子呋喃酮上, 证实呋喃酮可以作为合成 AI-2 中前提物质 DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione) 的结构类似物, 抑制群体感应信号分子 AI-2 的合成, 在控制相关食源菌生物被膜形成方面, 具有重要的作用^[8]。

牛奶是日常食品消费中最容易发生腐败的食品之

一, 其腐败现象随处可见。控制牛奶腐败的难点之一是控制菌体生物被膜形成。很多学者在探索牛奶中生物被膜形成时, 分离鉴定出金黄色葡萄球菌, 肠炎沙门氏菌以及大肠杆菌是腐败牛奶生物被膜中主要细菌, 在实验室条件下对其进行逐一研究^[9]。然而牛奶腐败过程中各组分变化复杂, 可能都会对菌体生物被膜形成能力造成影响。因此探讨腐败牛奶中多种食源性细菌生物被膜特性对于生物被膜研究而言, 是十分必要的。呋喃酮类物质广泛存在于草莓、葡萄、橙橘、芒果等多种天然水果中, 是一种食品中常见的安全香精成分之一。因此, 本实验选用牛奶腐败中常见的食源性病原菌(金黄色葡萄球菌, 肠炎沙门氏菌以及大肠杆菌)为研究对象, 通过模拟牛奶腐败过程, 测定牛奶中不同细菌生物被膜形成特征以及种间信号分子 AI-2 活力变化, 然后探讨牛奶中加入呋喃酮对 AI-2 活力和生物被膜形成能力的影响, 为在食品加工过程中预防牛奶腐败、控制生物成膜形成奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 肠炎沙门氏菌 ATCC14028 和大肠杆菌 ATCC8739 为作者实验室 TSB 培养基(胰蛋白胨大豆肉汤培养基)-80 °C 下冻存; 哈氏弧菌 BB170 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC), 于 AB 培养基^[10]中培育孵化; 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB 培养基)、Hektoen Enteric 琼脂培养基、Baird-Parker 琼脂基础培养基以及伊红美蓝琼脂培养基购自中国青岛海博微生物科技有限公司; 呋喃酮(4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮)(纯度≥99%)购自阿拉丁试剂(中国上海)有限公司; 牛奶(中国伊利)购自中国广州大学城世博超市。

1.2 方法

1.2.1 生物成膜形成能力(B值)测定

参考文献^[11]并稍作改进, 将过夜培养的三种细菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 肠炎沙门氏菌 ATCC14028 和大肠杆菌 ATCC8739 活化, 37 °C 下培养 20 h 后, 配成 OD₆₀₀ 值为 0.1 (约为 1.5×10⁸ cfu/mL), 然后按 1:100 接种于事先装有 100 μL 牛奶培养基的标准 96 孔板中。分别在 30 °C 过夜培养 48 h 后, 用酶标仪(美国, Bio-rad)测定波长 630 nm 处的光密度值 A₁, 未接种空白培养基的为 A_{1c}, 测试后, 倒掉培养基, 用蒸馏水洗涤 3 次去除浮游菌, 微孔板在室温下干燥 2 h, 加入 10 g/L 结晶紫 100 μL/孔, 放置 20 min 后, 蒸馏水水

洗 6~7 次去除孔壁染色直至水洗液为无色, 孔板在室温下干燥 30 min, 加入 95% 乙醇 100 μL/孔, 微量震荡器上震荡 30 min 后, 用酶标仪测定 A₂、A_{2c}。实验平行三次。粘附率 B 值计算为

$$B = \frac{A_2 - A_{2c}}{A_1 - A_{1c}}$$

1.2.2 生物被膜中活菌数检测

取三种细菌菌悬液(约为 1.5×10⁸ cfu/mL) 10 μL 接种于含牛奶 1 mL 的 24 孔板中, 同时放入不锈钢片(0.5 cm×0.5 cm), 然后在 30 °C 下分别培养 48 h, 取出不锈钢片, 放入盛有 5 mL 灭菌的 PBS 的无菌溶液中进行冲洗, 轻轻翻转 5 次, 弃去 PBS, 重复冲洗 3 次后取出, 用无菌纱布吸干多余的液体, 洗掉浮游菌。用消过毒的棉棒轻轻擦刮, 然后将其与擦刮棒一起放入盛有 4 mL 灭菌的 PBS 的试管中, 将试管放在试管架上, 浸没在超声水浴中震荡 10 min (42~47 Hz、20 °C) 后, 再漩涡震荡 2 min。每个试管溶液在 PBS 中做系列 10 倍稀释, 选择适宜稀释度, 分别取 1 mL 稀释液加入无菌培养皿中, 并分别倾注冷却至 45 °C 的 Hektoen Enteric 琼脂培养基、Baird-Parker 琼脂基础培养基以及伊红美蓝琼脂培养基 20 mL, 37 °C 培养 48 h, 观察菌落生长情况, 作细菌计数。

1.2.3 细菌 AI-2 活力研究

本方法参考文献^[12]并加以改进, 将已经活化的 AI-2 报告菌株 V.BB170 挑至 3 mL AB 培养液中, 于 30 °C 摇床转速 200 r/min 培养 16 h 至 OD₆₀₀ 为 0.9 左右。用新鲜的 AB 培养基以 1:5000 稀释 V.BB170 培养物。同时, 将三种测试菌株分别在牛奶以及溶解 10 μmol/mL 呋喃酮的牛奶条件下, 经过 37 °C 培养 48 h 后, 接着在 13000 r/min 下离心 5 min 后取上清, 该上清液用 0.22 μm 滤膜进行过滤后, 同时将培养好的报告菌哈氏弧菌 V.BB170 无细胞上清液作为阳性对照。将各种细菌的无细胞上清 10 μL 与稀释过的 V.BB170 培养物 100 μL 混合, 加入 96 孔板中, 于 30 °C 下震荡孵育, 用多功能酶标仪 Infinite200(瑞士, Tecan 公司)每隔 1 h 测一次发光值, 直至 5 h, 选出较稳定的发光值, 实验样品平行三份, 重复三次。

1.2.4 呋喃酮对细菌生物被膜形成能力的影响

参考文献^[13]并加以改进, 首先将呋喃酮用灭菌后双蒸水稀释成 60 和 600 μmol/L, 然后再进一步稀释成 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μmol/L 后取 100 μL 加入 96 孔板中。取相同体积的灭菌后双蒸水作为阴性对照, 接种各种细菌后培养 48 h。按方法 1.2.1 和 1.2.3 测定其 AI-2 活力以及生物被膜形成能力。

1.3 数据统计

统计学分析全部数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 通过 Grubbs 检验法取舍适当数据。

2 结果与分析

2.1 生物成膜能力(B 值)及其活菌数目测定

牛奶中接种多种常见食源性细菌(金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌), 随后在 30 °C 下培养后观察其腐败过程, 最后利用微孔板法测定其生物成膜能力以及生物膜中活菌数目见表 1。

表 1 各种在牛奶中成膜能力及其活菌计数情况

Table 1 The biofilm formation ability and the colony count of isolates in the milk

菌株	B 值	B 值(呋喃酮)	活菌数/(lgcfu/mL)
金黄色葡萄球菌 ATCC25923	0.78±0.009	0.18±0.013	5.46±0.057
大肠杆菌 ATCC8739	0.08±0.003	0.02±0.001	4.73±0.122
沙门氏菌 ATCC14028	0.05±0.006	0.01±0.002	4.31±0.091

如表 1 所示, 三种细菌中金黄色葡萄球菌的成膜能力最大, 其粘附率(B 值)分别是大肠杆菌和沙门氏菌的 10 倍和 16 倍, 这说明三种细菌中金黄色葡萄球菌在牛奶中更容易形成生物被膜。随后, 在牛奶中添加一定浓度的呋喃酮之后, 发现三种细菌的生物被膜形成能力均有所下降, 其中金黄色葡萄球菌的生物被膜形成能力下降最大, 变成原来的 25%。通过菌落计数法计算生物膜中活菌数目结果表明, 三种细菌中金黄色葡萄球菌在生物被膜中的活菌数目最大, 沙门氏菌的活菌数目最小。通过几种食源性细菌在牛奶中生物成膜能力以及活菌数目测定结果可以看出, 在生物膜中具有较大活菌数目的菌株, 其粘附率也较大。同时, 呋喃酮作为 AI-2 的抑制剂, 可以有效抑制三种细菌生物被膜形成。

2.2 细菌 AI-2 活力研究

通过报告菌株 V.BB170 的生物发光, 我们测定菌株的 AI-2 活力。将沙门氏菌 ATCC14028 的 AI-2 活力作为基数 1, 计算三种细菌分别在牛奶以及牛奶与呋喃酮混合物中培养后 AI-2 活力引起 V.BB170 发光相对值, 结果如图 1 所示。

从图 1 中可以看到, 沙门氏菌的 AI-2 活力相对值最小, 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 AI-2 活力分别是沙

门氏菌的 1.26 和 1.24 倍。通过研究三种细菌 AI-2 活力, 我们发现三者的 AI-2 活力大小顺序是金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>沙门氏菌, 此顺序与生物被膜形成能力大小顺序以及活菌数目大小顺序一致。而且加入呋喃酮后, 三种细菌的 AI-2 活力均有所下降。并且, 下降之后其生物被膜形成能力以及 AI-2 活力依旧呈现一致变化。在本实验的三种细菌中, 大肠杆菌的生物被膜形成能力以及 AI-2 活力受呋喃酮抑制效果最明显。因此, 笔者认为三种细菌的生物被膜形成能力均通过生物被膜中活菌分泌的 AI-2 活力控制。

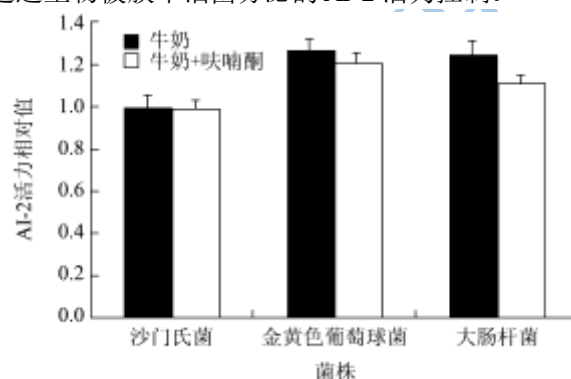


图 1 不同细菌 AI-2 活力相对值

Fig.1 The AI-2 activity relative value of isolates

2.3 呋喃酮抑制细菌生物形成能力

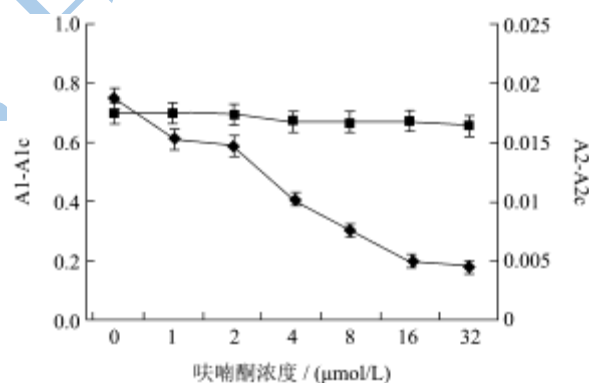


图 2 不同浓度呋喃酮下沙门氏菌 ATCC14028 浓度

Fig.2 The concentration of Salmonella in different concentrations of furanone

基于呋喃酮是菌体 AI-2 合成中的 4,5-羟基-2,3-戊二酮 (DPD) 的结构类似物, 可能抑制 AI-2 的生物合成。于是我们通过在牛奶中添加不同浓度的呋喃酮, 检测了 AI-2 在三种食源性细菌生物被膜形成过程中的作用。如图 2、3、4 所示, 图中 AI-A1c 表示微孔板中总菌数的 OD₆₃₀ 值, A2-A2c 表示微孔板中生物被膜中细菌的 OD₆₃₀ 值。结果表明呋喃酮并不影响沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌总菌数的变化, 但是, 随着加入呋喃酮浓度的增加, 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及大肠杆菌生物被膜内细菌浓度会不断

递减, 其中大肠杆菌受呋喃酮影响最大。当加入 32 $\mu\text{mol/L}$ 的呋喃酮时, 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及沙门氏菌生物被膜中细菌浓度分别为不加入呋喃酮时的 0.53、0.59 以及 0.25 倍。我们加入不同浓度的呋喃酮, 观察到呋喃酮会通过抑制生物膜中细菌的浓度 (A2-A2c), 抑制生物成膜能力, 而且, 此过程中, 总菌数基本不会改变。关于呋喃酮抑制生物被膜中细菌而对总菌数 (A1-A1c) 生长无影响的结果与 L.K Vestby 等人的研究一致^[6]。

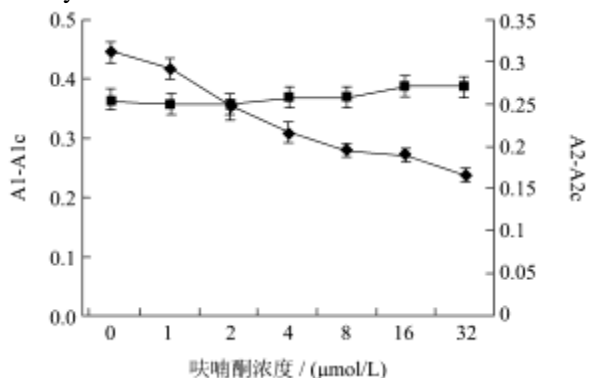


图 3 不同浓度呋喃酮下金黄色葡萄球菌 ATCC25923 浓度

Fig.3 The concentration of *Staphylococcus aureus* in different concentrations of furanone

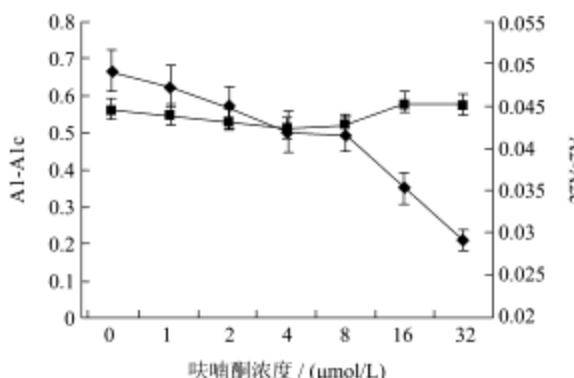


图 4 不同浓度呋喃酮下大肠杆菌 ATCC8739 浓度

Fig.4 The concentration of *E. coli* in different concentrations of furanone

3 结论

采用微孔板法模拟牛奶腐败条件, 测定金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌在牛奶腐败过程中的生物被膜形成能力、生物被膜中活菌数目。发现在生物被膜中具有较大活菌数目的菌株, 其粘附率也较大。随后在加入 AI-2 抑制剂呋喃酮后, 观察到三种细菌的 B 值以及 AI-2 活力均有所下降。并且, 下降之后其生物被膜形成能力以及 AI-2 活力依旧呈现一致变化。因此证明细菌生物被膜形成能力通过生物被膜中活菌分泌 AI-2 调控。最后通过加入梯度浓度呋喃酮, 检测到呋喃酮可以抑制生物被膜中细菌数目, 但对于总菌数变

化并无影响。

参考文献

- [1] Brugnoli LI, Lozano JE, Cubitto MA. Efficacy of sodium hypochlorite and quaternary ammonium compounds on yeasts isolated from apple juice [J]. Journal of Food Process Engineering, 2012, 35: 104-119
- [2] Buffet-Bataillon S, Branger B, Cormier M, et al. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes [J]. The Journal of hospital infection, 2011, 79: 141-146
- [3] Bassler B L, Wright M, Showalter RE, et al. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. Mol Microbiol [J]. 1993, 9: 773-786
- [4] Ahmed NA, Petersen FC, Scheie AA. AI-2 quorum sensing affects antibiotic susceptibility in *Streptococcus anginosus* [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60: 49-53
- [5] Stankowska D, Czerwonka G, Rozalska S, et al. Influence of quorum sensing signal molecules on biofilm formation in *Proteus mirabilis* O18 [J]. Folia Microbiologica, 2012, 57: 53-60
- [6] Kwiecinski J, Eick S, Wojcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase [J]. International journal of antimicrobial agents, 2009, 33: 343-347
- [7] Schlafer S, Raarup MK, Wejse PL, et al. Osteopontin reduces biofilm formation in a multi-species model of dental biofilm [J]. PloS one, 2012, 7: e41534
- [8] Jang YJ, Choi YJ, Lee SH, et al. Autoinducer 2 of *Fusobacterium nucleatum* as a target molecule to inhibit biofilm formation of periodontopathogens [J]. Archives of oral biology, 2013, 58: 17-27
- [9] Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, et al. The complex microbiota of raw milk [J]. FEMS microbiology reviews, 2013, 37: 664-698
- [10] Greenberg E, Hastings J, Ulitzur S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria [J]. Archives of Microbiology, 1979, 120: 87-91
- [11] Rode TM, 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: 372-383
- [12] Taga ME, Xavier KB. Methods for Analysis of Bacterial

Autoinducer-2 Production [J]. Current protocols in microbiology, 2005, 1C.1.1-1C.1.15

furane potentiates the effect of disinfectants on Salmonella in biofilm [J]. J. Appl. Microbiol., 2010, 108: 771-778

[13] Vestby LK, Lonn-Stensrud J, Moretro T, et al. A synthetic

现代食品科技