

405 nm LED 处理对不锈钢片表面金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用

李佳辉, 黄艺潇, 马声, 谢雅雯, 杨艳鹏, 李振业, 郭新宇, 郭都, 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: 该研究探究了 405-nm LED (light-emitting diode) 对不锈钢片表面金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用。首先测定了 405-nm LED 对不锈钢表面金黄色葡萄球菌生物被膜中活菌的灭活效果, 随后通过分析 405-nm LED 处理后金黄色葡萄球菌生物被膜对消毒剂的耐受性、生物被膜化学成分以及生物被膜微观结构的变化研究 405-nm LED 对不锈钢表面金黄色葡萄球菌生物被膜可能的清除机理。结果表明, 405-nm LED 处理能够显著降低生物被膜内的活菌量: 在 4、10 和 25 °C 下使用 LED 处理 4 h 后, 活菌量与对照组相比分别降低了 2.03、2.08 和 3.00 log CFU/cm²; 405-nm LED 处理还降低了处理后的生物被膜细胞对消毒剂的耐受性; 破坏了生物被膜立体构象的完整性和立体结构; 降低了生物被膜主要组分的含量 (胞外多糖和胞外蛋白质)。以上研究结果表明, 405-nm LED 可以有效清除不锈钢片表面的金黄色葡萄球菌生物被膜, 其有潜力进一步开发作为新型生物被膜清除方法用于控制金黄色葡萄球菌生物被膜的污染。

关键词: 金黄色葡萄球菌; LED; 生物被膜; 胞外聚合物

文章编号: 1673-9078(2022)01-63-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0404

Removal of *Staphylococcus aureus* Biofilm on the Surface of Stainless Steel by Treating with 405 nm LED

LI Jiahui, HUANG Yixiao, MA Sheng, XIE Yawen, YANG Yanpeng, LI Zhenye, GUO Xinyu, GUO Du, XIA Xiaodong, SHI Chao*

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

Abstract: In this study, the effect of a 405-nm light-emitting diode (LED) on the removal of the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) biofilm formed on the surface of stainless steel was investigated. Firstly, the inactivation effect of 405-nm LED illumination on the viable cells in the *S. aureus* biofilm formed on stainless steel was determined. Then, the possible mechanisms underlying the biofilm clearance effects of LED were investigated through analyzing the resistance of *S. aureus* biofilm to disinfectants, chemical composition of the biofilm and the changes in the microstructure of biofilms after the 405-nm LED treatment. Results showed that the 405-nm LED treatment could significantly reduce the number of viable biofilm cells: The 4 h LED treatment at 4 °C, 10 °C and 25 °C led to decreases in viable cells in the biofilm by 2.03 log CFU/cm², 2.08 log CFU/cm² and 3.00 log CFU/cm², respectively, compared with the control group; the 405-nm LED treatment also decreased the tolerance of the treated biofilm cells to disinfectants, destroyed the integrity and three-dimensional structure of the biofilm's stereoscopic conformation, and reduced the contents of the main components of the biofilm (extracellular polysaccharides and extracellular proteins). The above research results indicated that the 405-nm LED illumination could effectively clear the *S. aureus* biofilm on the surface of stainless steel

引文格式:

李佳辉, 黄艺潇, 马声, 等. 405 nm LED 处理对不锈钢片表面金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 63-72

LI Jiahui, HUANG Yixiao, MA Sheng, et al. Removal of *Staphylococcus aureus* biofilm on the surface of stainless steel by treating with 405 nm LED [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 63-72

收稿日期: 2021-04-13

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2019NY-118); 陕西省博士后科研项目资助 (2018BSHEDZZ150); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31801659)

作者简介: 李佳辉 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与营养, E-mail: 18392505738@163.com; 共同第一作者: 黄艺潇 (1997-), 男, 本科生, 研究方向: 食品安全与营养, E-mail: 2249626682@qq.com

通讯作者: 石超 (1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性物质的抗菌功能, E-mail: meilixinong@126.com

sheets, and has the potential to be further developed as a new biofilm removal method for the control of *S. aureus* biofilm contamination.

Key words: *Staphylococcus aureus*; LED (light-emitting diode); biofilm; EPS

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是属于微球菌科葡萄球菌属的革兰氏阳性细菌, 其无鞭毛、无荚膜、呈葡萄状排列^[1]。该菌广泛存在于空气、尘埃、水以及人和动物的排泄物中, 食品受其污染的概率相当高, 若不慎食用, 可引起食物中毒和毒素休克综合症。典型的金黄色葡萄球菌食物中毒发病非常迅速, 主要症状包括腹泻、恶心和呕吐等, 严重者可使人致命^[2]。在我国, 每年约有 20%到 25%的细菌食物中毒病例是由金黄色葡萄球菌引起的^[3]。我国将其与沙门氏菌、副溶血性弧菌列为三大食源性致病菌, 其已成为食品质量安全检测的重要指标。

生物被膜是细菌菌体相互黏附或黏附于接触表面被胞外分泌的聚合物包裹而形成的具有一定空间结构的聚集体^[4]。生物被膜复杂的空间结构和细胞外聚合物可以保护细菌免受干燥、高温、高压和消毒剂等环境压力的损伤和机体免疫杀伤^[5]。此外, 细菌感染宿主后, 生物被膜可以将其转移到宿主体内其他的部位, 导致反复感染并增加死亡人数。生物被膜的细胞外聚合物基质主要成分为胞外多糖、胞外蛋白质和胞外 DNA^[4]。金黄色葡萄球菌的广泛传播和危害与其生物被膜的形成密不可分。金黄色葡萄球菌可以黏附在生物和非生物表面上形成生物被膜, 使其对诸如渗透压和消毒剂等恶劣的环境条件具有更高的抵抗力^[6]。据报道, 金黄色葡萄球菌生物被膜在乳品厂、渔业产品和食品接触表面(不锈钢、塑料等)中均具有较高的检出率^[7]。食品接触表面形成的生物被膜用常规的方法难以彻底清除, 而消毒剂、高渗透压等不良环境又会诱导生物膜产生更强的耐受能力, 对食品工业造成了极大的威胁^[8]。304 不锈钢是食品加工机械设备的主要材质类型, 因此, 以 304 不锈钢片作为生物被膜形成表面, 寻求有效的金黄色葡萄球菌生物被膜控制方法, 降低其生物膜细胞对消毒的抵抗力, 对于保障食品安全和公共卫生具有重要的意义。

目前控制细菌生物被膜的方法主要包括外源性清洁剂、环氧乙烷、蒸汽高压灭菌、过氧化氢等离子体和辐照等^[9]。然而, 这些方法具有破坏食品的商品价值以及营养价值, 并对生产加工设备造成一定的腐蚀从而影响热传导效应等缺点^[10]。因此, 寻求安全、高效而又不导致耐药的新型生物被膜灭菌方法已经成为研究热点。发光二极管 (Light Emitting Diode, LED) 是一种能够在短波长范围内发射出单色光的半导体装置, 它具有能耗低、稳定性高、寿命长、体积小、形

状多样、对食品成分损伤小等优点^[11]。然而, LED 装置仍存在一些局限性, 如配套的食品设备成本较高、穿透力较弱、杀菌效率仍有待提高等^[12]。近年来一些研究表明, 波长范围为 400~520 nm 的 LED 光对食品和包装材料表面黏附的变异链球菌、蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌和单增李斯特菌均具有显著的灭活效果, 其中 405-nm LED 灭活效果最为显著^[13-15]。

基于此, 本研究将探究 405-nm LED 这一新型非热杀菌方式对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用。研究选用 304 不锈钢片作为生物被膜形成的介质, 因为它是食品加工、储存及运输过程中最常使用的材料。选取 4 °C、10 °C 和 25 °C 作为照射温度, 分别用于模拟食品储存中的低温环境、食品加工环境和室内环境温度。研究通过检测 405-nm LED 作用后菌体生物被膜中活菌量的变化及其对常见消毒剂耐受性变化来探究 405-nm LED 对金黄色葡萄球菌生物被膜的清除作用, 在此基础上, 通过观察 405-nm LED 对菌体生物被膜微观结构、立体结构以及生物组分的影响来探究其清除机理, 旨在为 405-nm LED 进一步应用于食品工业中控制金黄色葡萄球菌生物被膜提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、材料与试剂

金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 购于美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)。

玻璃微珠 (直径为 425~600 μm) 购于美国 Sigma 公司。

胰蛋白胨大豆琼脂 (Tryptone soya agar, TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptone soya broth, TSB) 培养基北京陆桥技术有限公司; 苯扎氯铵 (Benzalkonium chloride, CAS 63449-41-2) 购于北京 J&K 科技有限公司 (HPLC≥98%); 双氯苯双胍己烷 (Chlorhexidine, CAS 55-56-1) 购于成都百斯特试剂有限公司 (HPLC≥99%); 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

405-nm LED 集成灯珠深圳博雅科技有限公司; 5804R 低温冷冻离心机德国 Eppendorf 公司; 分光光度计 Smart Spec™ plus 美国 Bio-Rad 公司; 傅里叶红外变换光谱仪 Vetex70 美国 Bruker 公司; S-4800

场发射扫描电子显微镜日本 Hitachi 公司; 激光共聚焦显微镜 Nikon A1 日本尼康公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化及菌液制备

将冻存于-80 °C 冰箱的金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 采用划线法于 TSA 上活化, 37 °C 条件下培养 18 h 后, 用接种环挑取单菌落于 30 mL TSB 中, 并置于 37 °C 恒温摇床中振摇 (120 r/min) 培养 18 h。将培养后的菌悬液离心 (8000×g, 5 min, 4 °C) 并除去上清液, 随后用磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 7.2) 洗涤菌体两次。最后使用 PBS 重悬浮菌体, 并稀释菌悬液至 $OD_{600\text{nm}}=0.4$, 此时菌液浓度约为 2×10^8 CFU/mL。

1.3.2 405-nm LED 生物被膜清除装置的构建

405-nm LED 生物被膜清除装置的设计参照 Ghate 等^[16]的方法。使用 405-nm 辐射计 (UHC405, UVATA Ltd., Hongkong) 测定 LED 的辐照强度为 26 ± 2 mW/cm²。使用 ABS 树脂材料搭建作用舱, 顶部安装 LED 光源, 并粘附散热板和电扇以便去除装置产生的热量。为保护 405-nm LED 光源, 电路串联 5 Ω 电阻。将 405-nm LED 光源与不锈钢板固定架之间的距离设置为 4.5 cm, 以确保 405-nm LED 能够照射至整个钢片表面。装置的最上方安装散热风扇, 装置中安装热电偶传感器实时监测不锈钢片在 405-nm LED 照射过程中的温度变化。

1.3.3 试验中对照组孵育温度的确定

取不锈钢片于固定槽中, 在 4 °C、10 °C、25 °C 下置于 LED 装置下照射, 利用数显温度计检测 LED 照射过程中不锈钢表面的温度变化。为保证对照组和实验组的处理温度一致, 试验过程将生物被膜清除实验组置于 4 °C、10 °C、25 °C 恒温培养箱中, 对照组避光放置在对应温度的恒温培养箱中。

1.3.4 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 生物被膜形成能力评估

金黄色葡萄球菌生物被膜形成参考 Kang 等^[17]的方法。将 1.3.1 节中最终得到的菌悬液转移至含无菌不锈钢片的 50 mL 离心管中, 在 4 °C 条件下孵育 24 h, 使菌体在不锈钢表面粘附。从离心管中取出不锈钢片, 用 400 mL 或 200 mL 无菌蒸馏水依次轻洗 15 s 或 5 s, 将不锈钢片放入 30 mL TSB 中, 25 °C 培养 6 d。每隔 1 d, 对不锈钢表面的生物被膜形成能力进行测定。具体方法如下: 将样品取出并放入含有 30 mL PBS 和 3 g 玻璃珠的离心管中, 涡旋 5 min, 使黏附在不锈钢材料表面的菌体充分脱落。随后吸取 1 mL 吹打均匀的

菌液进行连续 10 倍稀释, 并取不同浓度的稀释液 100 μL 涂布至 TSA 平板, 37 °C 下培养 24 h 后计数, 计数结果以 log CFU/cm² 表示。本研究中, 生物被膜中活菌数量上升至最大活菌数量时, 即认为达到成熟。

1.3.5 405-nm LED 处理对不锈钢片表面金黄色葡萄球菌生物被膜中活菌数量的影响

参考 Kim 等^[18]的方法, 对不锈钢表面生物膜中的金黄色葡萄球菌在 LED 处理下存活的情况进行了测定。按照 1.3.4 节中的方法制备生物被膜并选取培养 3 d 的成熟生物被膜进行后续研究。用无菌镊子将粘附有成熟生物被膜的不锈钢片取出, 用 400 mL 无菌水中漂洗 15 s, 然后在 200 mL 无菌水中漂洗 5 s。随后将样品放置于无菌培养皿中, 分别在 4、10、25 °C 下使用 405-nm LED 处理 0、30、60、120、240、360 min, 同时将对照组样品分别放入 12.5、15.5、29.5 °C 恒温培养箱。一定时间后, 将样品取出并放入含有 30 mL PBS 和 3 g 玻璃珠的离心管中, 涡旋 5 min, 使黏附在不锈钢材料表面的菌体充分脱落。随后吸取菌液进行连续 10 倍稀释, 并取不同浓度的稀释液 100 μL 涂布至 TSA 平板, 37 °C 下培养 24 h 后计数, 计数结果以 log CFU/cm² 表示。

1.3.6 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜中菌体的消毒剂敏感性的影响

样品制备同 1.3.4 中方法所示。为研究 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物膜的消毒剂敏感性影响, 首先将附着在不锈钢片表面的成熟生物膜使用 400 mL 或 200 mL 无菌水连续冲洗 15 s 或 5 s, 随后使用 LED 处理样品 0.5、1 和 2 h, 未经 LED 照射的样品 (对照组) 放入相应温度培养箱中避光培养相同时间。然后将样品转移到含有 30 mL 苯扎氯铵 (20×10^{-6}) 或双氯苯双胍己烷 (20×10^{-6}) 溶液的试管中, 未经消毒剂处理的样品放入 30 mL PBS 中。样品静置 10 min 后取出并浸没于 30 mL 中和液 (吐温 80 30 g/L, 皂素 30 g/L, 无水硫代硫酸钠 5 g/L, L-组氨酸 1 g/L, 卵磷脂 30 g/L, TSB 30 g/L) 中以终止消毒剂的作用, 随后使用 400 mL 无菌水漂洗样品 15 s, 200 mL 无菌水漂洗 5 s, 将样品分别放入装有 30 mL PBS 和 3 g 玻璃珠的离心管中, 充分涡旋 5 min。吸取涡旋后的菌悬液进行连续 10 倍稀释, 并取 100 μL 不同浓度的稀释液涂布至 TSA 平板, 置于 37 °C 下培养 24 h 后计数, 计数结果以 log CFU/cm² 表示。

1.3.7 红外光谱法测定 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜组成成分的影响

参考 Wang 等^[19]的方法, 利用傅里叶变换近红外光谱 (Attenuated total reflection-Fourier transform

infrared spectroscopy, ATR-FTIR) 测定 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜中各组分的影 响。成熟生物被膜的制备如 1.3.3 节中所示。将菌体生物被膜置于 4、10、25 °C 环境中, 并使用 405-nm LED 处理样品 2 h, 对照组分别置于 12.5、15.5、29.5 °C 下培养相同的时间。随后用 0.85% (m/V) NaCl 溶液漂洗三次以除去黏附不牢固的菌体, 室温风干后备用。ATR-FTIR 光谱仪的分辨率设定为 2 cm⁻¹, 扫描次数为 128 次, 检测 1700~800 cm⁻¹ 范围内的信号, 每个样品的检测重复三次。使用无菌不锈钢材料用来扣除光谱背景。用 GraphPad Prism 8.0 软件 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) 对处理后的数据进行分析。

1.3.8 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜微观结构的影响

1.3.8.1 场发射扫描电子显微镜观察

参照 1.3.4 中的方法制备成熟的生物被膜, 随后使用无菌水进行漂洗。将样品分别置于 4、10、25 °C 环境中使用 405-nm LED 处理 2 h, 对照组置于 12.5、15.5、29.5 °C 下处理相同时间。随后使用 2.5% (V/V) 的戊二醛在 4 °C 条件下将样品固定过夜, 并用无菌水和 PBS 洗涤。将样品置于 1% (V/V) 的锇酸中再次固定 5 h, 依次用 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% (V/V) 的乙醇梯度洗脱 10 min 后, 真空干燥过夜。最后, 对样品进行喷金处理, 使用 S-4800 扫描电镜拍摄图像, 观察 LED 作用后金黄色葡萄球菌生物被膜微观结构的变化。

1.3.8.2 激光共聚焦显微镜观察

参照 1.3.4 中的方法制备成熟的生物被膜, 使用无菌水进行漂洗后, 将样品分别置于 4、10、25 °C 环境中使用 405-nm LED 处理 2 h, 对照组置于相应温度处理相同时间。使用 SYTO 9/PI 的混合荧光染料覆盖不锈钢片表面, 室温避光孵育 5 min, 随后用无菌蒸馏水轻柔洗涤不锈钢片, 将不锈钢片于室温避光放置自然干燥后, 于激光共聚焦显微镜下观察生物被膜的立体结构并拍照分析。

1.3.9 数据处理与分析

每个处理组均设定实验组和对照组, 重复测定三次。使用 SPSS (版本 20.0; SPSS, Inc., Chicago, IL) 对数据进行统计分析, 显著性检验采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异显著 (*), $p < 0.01$ 为差异极显著 (**).

2 结果与讨论

2.1 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 生物被膜形

成周期

本研究通过平板菌落计数法测定了金黄色葡萄球菌在不锈钢表面形成生物被膜的活菌量, 反映生物被膜的成熟度。由图 1 可知, 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 培养 1 d 后, 活菌数量达到了 4.9 log CFU/cm², 在 1~3 d 生物被膜中活菌数量呈现出上升的趋势, 在第 3 d 时达到最大活菌数量 6.5 log CFU/cm², 即达到成熟。在随后的 3~6 d, 生物被膜中的活菌量呈现下降趋势。因此后续试验采用培养至 3 d 的成熟生物被膜进行试验。

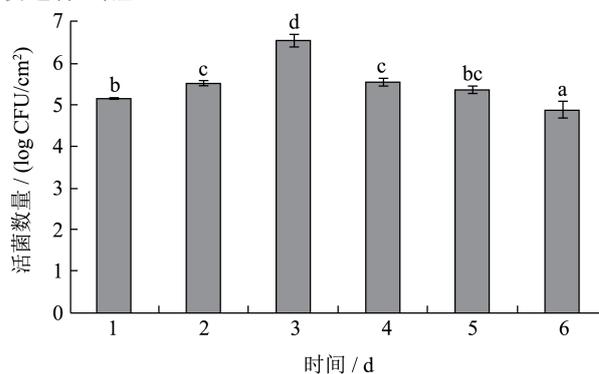
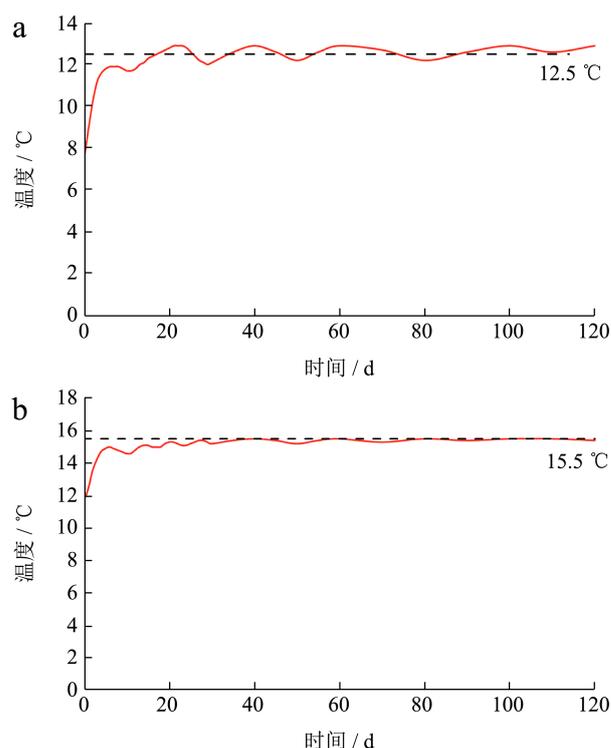


图 1 不同培养天数金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 生物被膜活菌数量

Fig.1 The population of *S. aureus* ATCC 29213 biofilm cells in different days of culturing

2.2 试验中对照组孵育温度的确定



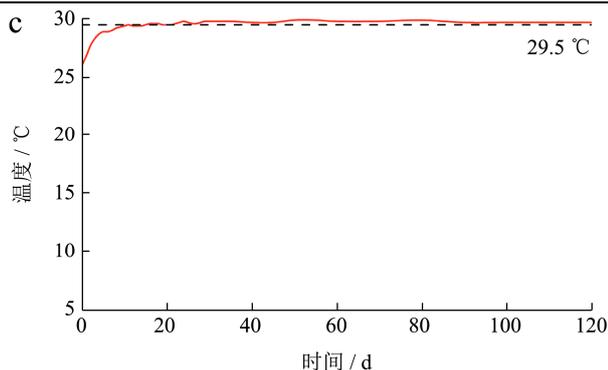


图2 不同温度下LED照射对不锈钢片表面温度的影响

Fig.2 The effect of LED illumination on the temperature of the stainless steel surface at different temperature

三个实验组(4、10和25 °C)下不锈钢片表面经LED照射后温度分别稳定在了12.5、15.5和29.5 °C(图2)。为了消除热效应对实验结果的影响,将非照射组的孵育温度调整为12.5、15.5和29.5 °C。

2.3 不同温度下405-nm LED处理对金黄色葡萄球菌生物被膜中活菌的灭活作用

生物被膜中的细菌与浮游态细菌相比较,其抵御不良环境的能力更强也更加难以杀灭^[20]。本研究利用平板活菌计数法确定了不同温度下405-nm LED处理对金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 生物被膜中活菌的灭活效果,结果如图3所示。实验结果表明,金黄色葡萄球菌生物被膜的初始活菌量在 $6.5 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 左右。在4、10和25 °C下,与对照组相比,405-nm LED处理30 min后,金黄色葡萄球菌生物被膜中的活菌数量均显著减少($p < 0.05$)。25 °C下LED处理4 h对金黄色葡萄球菌生物被膜中活菌的灭活效果最好(图3c)。在4、10和25 °C下LED处理4 h后,生物被膜中活菌量与对照组相比分别下降了2.03(图3a)、2.08(图3b)和3.00(图3c) $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 。Zheng等^[21]采用活菌计数法探究了CoQ0对副溶血性弧菌的灭活效果,结果发现使用4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CoQ0处理成熟的副溶血性弧菌生物被膜2 h后,生物被膜中的活菌量减少了约 $3.0 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 。Hussain等^[22]报道,在使用80 mg/L的微酸性电解水处理15 min后,成熟的蜡样芽孢杆菌 ATCC 10987 和 ATCC 14579 生物被膜活菌量分别减少了3.0和3.4 $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 。先前已有报道证实了LED灭活浮游态食源性致病菌的机制。Yang等^[23]和Kumar等^[24]证实了LED照射对铜绿假单胞菌、沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌均有较好的杀灭效果,并报道了LED处理后菌体细胞内DNA和细胞膜功能的丧失是由LED光诱导产生的ROS导

致的。因此,我们推测,尽管生物被膜可以保护一定数量的细菌免受外部不良环境的破坏,405-nm LED照射仍可以通过光诱导产生ROS来发挥其对生物被膜内金黄色葡萄球菌细胞的灭活功效。

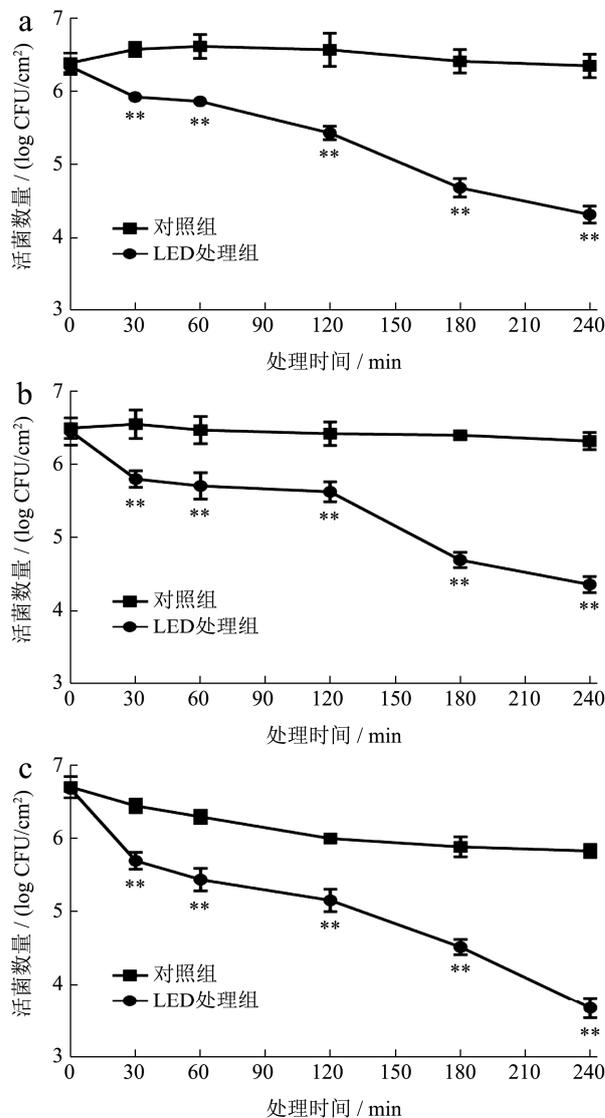


图3 不同温度下405-nm LED处理对不锈钢片表面金黄色葡萄球菌生物被膜中活菌的灭活效果

Fig.3 The inactivation efficacy and mechanism of a 405-nm LED against *S. aureus* biofilm formed on the surface of stainless steel

注:图a~c分别为4 °C、10 °C、25 °C。

2.4 405-nm LED处理对金黄色葡萄球菌生物被膜消毒剂耐受性的影响

细菌的生物被膜可使细菌对消毒剂产生一定程度的抵抗力,这增加了使用消毒剂消除生物被膜的难度^[25]。同时消毒剂的过度使用可能会导致致病菌更强的抵抗力,并在环境中留下有害残留物^[26]。苯扎氯铵和

双氯苯双胍己烷是食品工业中常用的两种氯类消毒剂,对食源性致病菌有良好的杀灭效果。本研究中,我们探究了不同温度下,405-nm LED处理对不锈钢表面金黄色葡萄球菌生物被膜苯扎氯铵和双氯苯双胍己烷两种消毒耐受性的影响,结果如图4所示。由图可知,与对照组相比,三种温度下405-nm LED处理后,金黄色葡萄球菌生物被膜中的菌体对两种消毒剂处理均更加敏感。金黄色葡萄球菌对两种消毒剂的耐受能力随LED处理时间的增长而降低。4℃、10℃和25℃下,LED处理2h后的金黄色葡萄球菌再经消毒剂苯扎氯铵处理,生物被膜中的细菌数量与对照组相比分别减少了0.5(图4a)、0.6(图4b)和0.9(图4c) log CFU/cm²;LED处理2h后的金黄色葡萄球菌再经消毒剂双氯苯双胍己烷处理,生物被膜中的活菌数量与对照组相比分别减少了1.0(图4d),0.8(图4e)和1.1(图4f) log CFU/cm²。

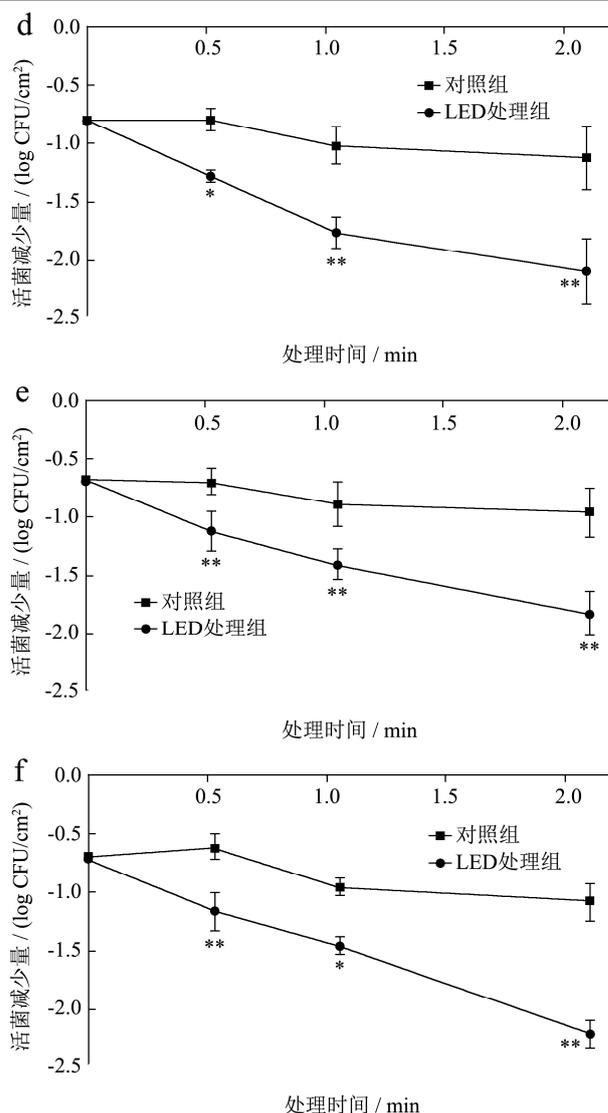
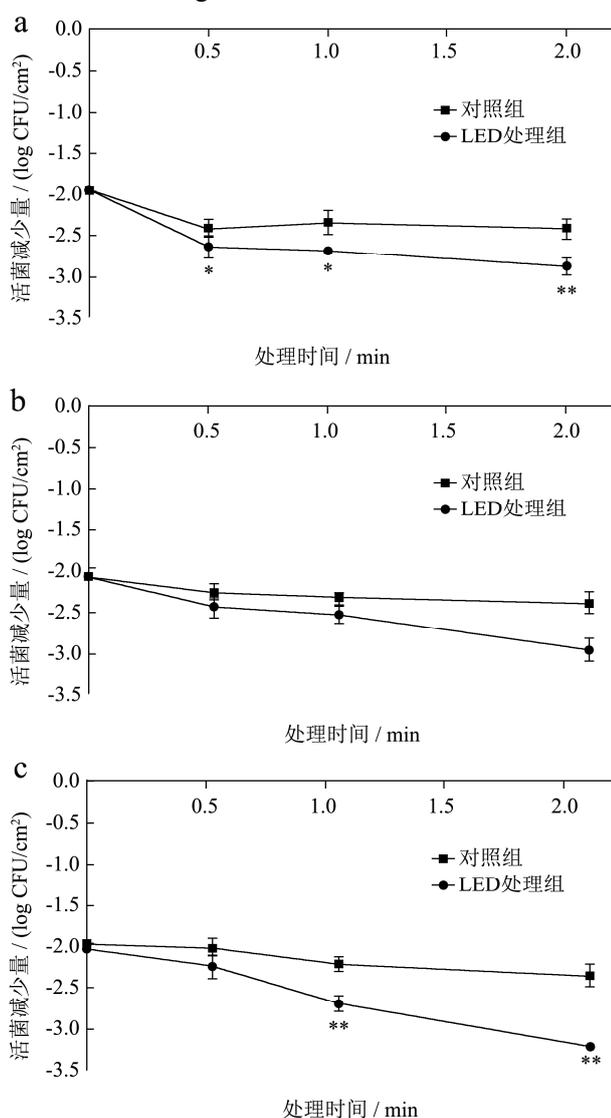


图4 不同温度下405-nm LED处理对金黄色葡萄球菌生物被膜中细菌消毒剂耐受性的影响

Fig.4 The effects of LED illumination on the disinfectant susceptibility of *S. aureus* ATCC 29213 biofilm cell

注:图a、d:4℃;图b、e:10℃;图c、f:25℃;图a-c为20×10⁶苯扎氯铵;图d-f为20×10⁶双氯苯双胍己烷。

在先前的研究中,Pileggi等^[27]发现蓝光照射能够增强粪肠球菌生物被膜对光敏剂的敏感性。另外,Harper等^[28]的研究证明了生物被膜基质内的胞外聚合物可以通过静电和空间相互作用来阻碍分子的扩散,这在一定程度提高了生物被膜对消毒剂的抗性。根据本研究的结果,我们推测,LED照射可能会通过破坏生物被膜的组成成分和结构特征,允许消毒剂分子进入细胞产生破坏作用进而降低生物被膜对消毒剂的抵抗力,生物被膜态菌体对消毒剂的耐受能力强弱的变化也受LED照射温度和消毒剂种类的影响。目前的研

究结果表明, 405-nm LED 可以应用于食品工业中控制食源性致病菌, 从而减少消毒剂的用量并增强消毒剂的生物被膜清除作用。

2.5 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜化学成分的影响

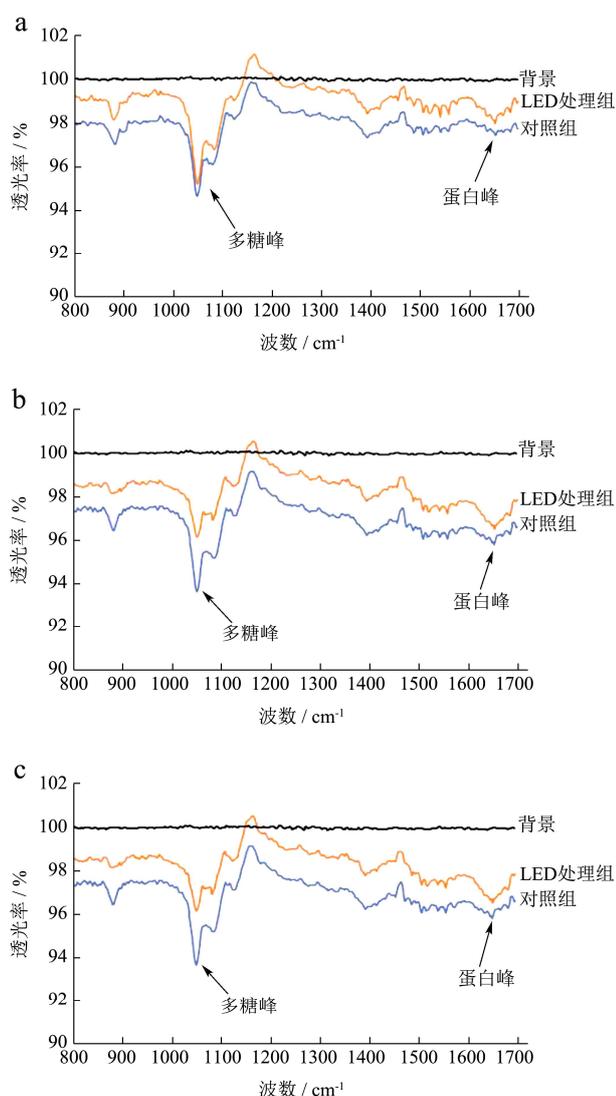


图5 不同温度下405-nm LED处理对金黄色葡萄球菌生物被膜化学成分的影响

Fig.5 Analysis of chemical information of *S. aureus* biofilm by ATR-FTIR

注: 图 a~c 分别为 4 °C、10 °C、25 °C。

生物被膜主要是由大量的胞外多糖、胞外 DNA 和蛋白质的混合物组成, 它们共同形成将菌体包绕其中的基质^[29]。生物被膜的整体结构和抗性表型是由生物被膜基质成分所决定的。本研究中, 利用 ATR-FTIR 测定了 LED 处理后金黄色葡萄球菌生物被膜成分的变化, 结果如图 5 所示。根据 ATR-FTIR 光谱中主要

波段对应的官能团可知, 1652 cm^{-1} 处出现的光谱峰是氨基化合物中 C=O 伸缩引起的, 代表蛋白质化合物; 在 1085 cm^{-1} 和 1051 cm^{-1} 处出现的光谱峰, 是多糖类物质中的 C-OH、C-O、C-C 伸缩以及 C-O-C、C-O 基团的分子环振动引起的, 代表了多糖化合物的变化。由图 5 可知, 三种温度下, LED 处理后的金黄色葡萄球菌生物被膜均出现多个波谱峰, 且与对照组相比, 峰的位置基本一致, 但峰强度具有较大差异。在 4 °C (图 4a)、10 °C (图 5b) 和 25 °C (图 5c) 条件下, 经 405-nm LED 进行 2 h 的处理后, 金黄色葡萄球菌生物被膜在 1652、1085 和 1051 cm^{-1} 处 (蛋白质、多糖) 的透光率均高于对照, 在 25 °C 时其透光率最大, 这表明 LED 处理降低了金黄色葡萄球菌生物被膜中蛋白质和多糖的含量, 影响了生物被膜中的化学成分组成。先前的研究中, Misba 等^[30]利用刚果红结合实验发现表型噻嗪染料可以降低肠球菌和肺炎克雷伯菌生物被膜的胞外多糖含量。Liu 等^[31]利用苯酚-硫酸法测定了 1.25 和 2.5 mg/mL 苯乳酸处理粪肠球菌后生物被膜中胞外多糖的变化, 结果发现其胞外多糖含量与对照组相比下降了 50% 以上。Lee 等^[32]观察到在用铜离子联合降亚精胺处理铜绿假单胞菌生物被膜后, 生物被膜基质中的蛋白质和多糖含量分别降低了 37% 和 69%。由于 LED 处理会诱导细胞内 ROS 的产生, 这可能会对不饱和脂肪酸、残基和胆固醇产生严重的氧化损伤, 从而导致膜通透性的改变^[33]。因此我们推测生物被膜中的 ROS 在积累到一定量之后, 会对胞外多糖和蛋白质造成氧化损伤, 从而影响生物被膜的化学组成、结构以及功能。

2.6 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜微观形态的影响

2.6.1 场发射扫描电镜分析

本研究利用场发射扫描电镜对金黄色葡萄球菌的生物被膜微观结构进行了观察, 结果如图 6 所示, LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜有明显的破坏作用。在三种温度下, 未经处理的金黄色葡萄球菌聚集成致密且高度堆积的典型生物被膜结构 (图 6a~c), 而经过 LED 处理 2 h 后, 未观察到金黄色葡萄球菌典型的生物被膜结构, 且菌体呈现出松散、无规律排列的状态, 无法形成聚集的细菌团簇, 而且粘附在不锈钢表面的细菌数量也明显减少 (图 6d~f)。此外, 随着温度的升高, 对照组和处理组生物被膜中的细胞密度逐渐降低 (图 6d~f), 这与生物被膜中活菌清除实验的结果一致 (图 3a~c)。

2.6.2 激光共聚焦显微镜分析

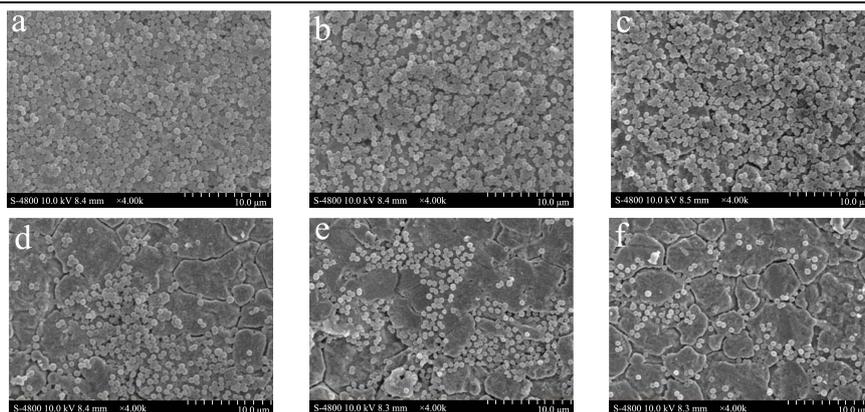


图6 扫描电镜观测不同温度下未经LED处理(a~c)和经LED处理2 h(d~f)后金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 生物被膜的微观结构
Fig.6 Scanning electron micrographs images at 4000× magnification of *S. aureus* ATCC 29213 biofilm with non-LED-illuminated and LED-illuminated for 2 h

注: 图 a、d: 4℃; 图 b、e: 10℃; 图 c、f: 25℃; 图 a~f 为放大倍数 4000 的扫描电镜照片。

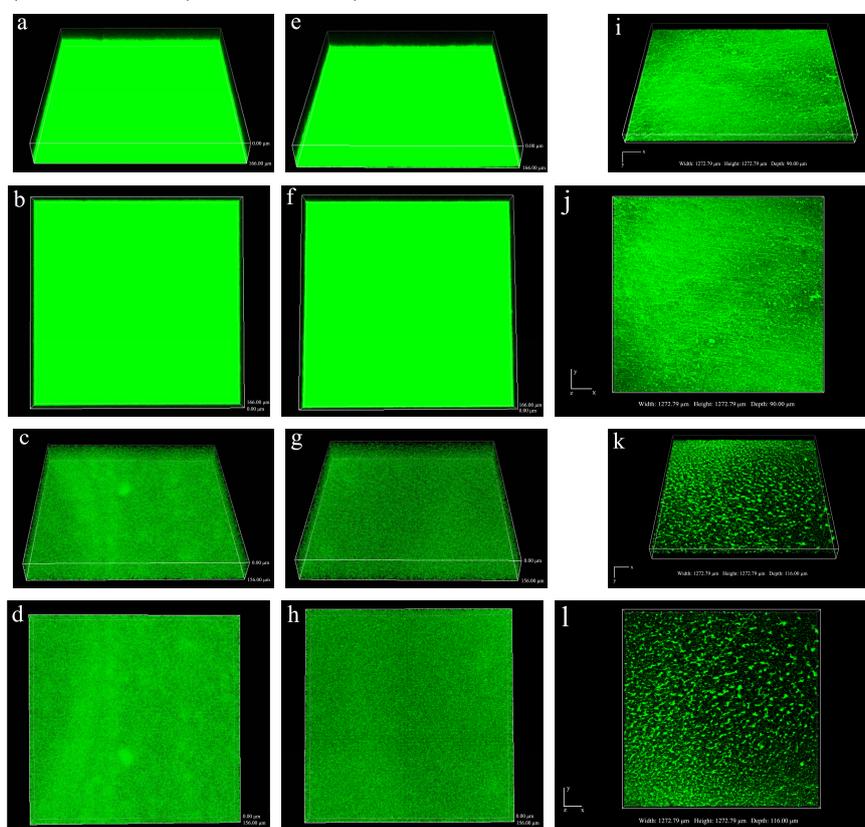


图7 激光共聚焦显微镜观测不同温度下未经LED处理(a、b、e、f、i、j)和经LED处理2 h(c、d、g、h、k、l)后金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 生物被膜的微观结构

Fig.7 Confocal laser scanning microscope images of *S. aureus* ATCC 29213 biofilm on stainless steel with non-LED-illuminated and LED-illuminated for 2 h

注: 图 a~d: 4℃; 图 e~h: 10℃; 图 i~l: 25℃; 图 a~l 为放大倍数 40 的共聚焦显微镜照片。

生物被膜的功能与其结构密不可分。本研究利用激光共聚焦显微镜观察 405-nm LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜结构的影响。结果如图 7 (a、b、e、f、i、j) 所示, 对照组中金黄色葡萄球菌生物被膜的整个视野具有均匀的亮绿色荧光和紧凑的结构, 生物被膜致密且呈现出完整的三维构象, 而在 LED 处理 2

h (c、d、g、h、k、l) 后, 生物被膜的绿色荧光强度明显下降, 生物被膜密度降低且生物被膜结构分散, 生物被膜之间有明显空隙且生物被膜细胞数量减少。同时, 随着 LED 处理时温度的升高, 生物被膜的破坏程度也增加, 这与场发射扫描电镜的观察结果一致(图 6D~F), 证实了 LED 处理对金黄色葡萄球菌生物被膜

的结构有明显的破坏作用。类似地, Bai 等^[34]也利用场发射扫描电镜图像证实了莽草酸可显著降低金黄色葡萄球菌生物被膜的粘附细菌数量和胞外聚集物的密度;王硕等^[35]利用场发射扫描电镜观察发现,反式肉桂醛处理能够使副溶血性弧菌形成的生物被膜变薄且结构变得松散;Wang 等^[19]利用激光共聚焦显微镜观察了 200 mg/L 次氯酸钠和 40 mg/L 酸性电解水处理后的荧光假单胞菌生物被膜发现其生物被膜厚度与密度均明显减小。因此,我们推测,LED 处理导致的生物被膜胞外基质和活菌比例的减少会改变生物被膜胞外分泌物互相粘连的“天然存在模式”,进而破坏生物被膜的立体结构,使生物被膜变得更加松散,易于清除。

3 结论

综上所述,405-nm LED 处理对不锈钢表面的金黄色葡萄球菌生物被膜具有明显的清除作用。405-nm LED 照射可通过减少生物被膜活菌数量、破坏生物被膜的立体结构、改变生物被膜的组成成分来有效地对抗金黄色葡萄球菌生物被膜。同时,405-nm LED 处理还降低了金黄色葡萄球菌生物被膜对消毒剂(苯扎氯铵和双氯苯双胍己烷)的耐受能力,增强了消毒剂的清除效果。以上研究结果为 405-nm LED 应用于食品中控制金黄色葡萄球菌生物被膜提供了理论依据。因此,结合研究结果以及现有应用基础,本研究认为 LED 有潜力被开发作为预防和控制食品工业中金黄色葡萄球菌污染的新方法。

参考文献

- [1] Piçarra S, Lopes E, Almeida P, et al. Novel coating containing molybdenum oxide nanoparticles to reduce *Staphylococcus aureus* contamination on inanimate surfaces [J]. PLoS ONE, 2019, 14(3): e0213151
- [2] 朱海明,宋曼丹,赖蔚冬,等.金黄色葡萄球菌引起食物中毒的分析[J].中国热带医学,2006,6(3):523-524
ZHU Haiming, SONG Mandan, LAI Weidong, et al. Analysis of food poisoning due to contamination with *Staphylococcus aureus* [J]. China Tropical Medicine, 2006, 6(3): 523-524
- [3] 史昕平,陆利霞,熊晓辉.南京部分地区食品中金黄色葡萄球菌污染状况调查[J].食品安全质量检测学报,2018,9(4): 723-728
SHI Xinpeng, LU Lixia, XIONG Xiaohui. Investigation of *Staphylococcus aureus* pollution condition in food in several districts of Nanjing [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(4): 723-728
- [4] Simoes M, Simoes L C, Vieira M J. A review of current and emergent biofilm control strategies [J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(4): 573-583
- [5] Bridier A, Sanchez-Vizueté P, Guilbaud M, et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens [J]. Food Microbiology, 2015, 45: 167-178
- [6] Cha Y, Son B, Ryu S. Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13 [J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103245
- [7] Carvalho L, Alvim M, Fabri R, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation in Minas Frescal cheese packaging [J]. International Journal of Dairy Technology, 2021
- [8] Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, et al. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 825
- [9] White A, Burns D, Christensen T. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123(4): 504-515
- [10] Mun S, Jeong J S, Kim J, et al. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by dense phase carbon dioxide [J]. Biofouling, 2009, 25(5): 473-479
- [11] Huang X, Wang H, Yin S, et al. Sterilization system for air purifier by combining ultraviolet light emitting diodes with TiO₂ [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology Biotechnology, 2009, 84(10): 1437-1440
- [12] Aponiene K, Luksiene Z. Effective combination of LED-based visible light, photosensitizer and photocatalyst to combat Gram (-) bacteria [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2015, 142: 257-263
- [13] Gunther N W, Phillips J G, Sommers C. The effects of 405-nm visible light on the survival of *Campylobacter* on chicken skin and stainless steel [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2016, 13(5): 245-250
- [14] Terada C, Imamura T, Ohshima T, et al. The effect of irradiation with a 405 nm blue-violet laser on the bacterial adhesion on the osteosynthetic biomaterials [J]. International Journal of Photoenergy, 2018: 1-10
- [15] Kim M J, Marta M, Kumar A, et al. Antibacterial effect and mechanism of high-intensity 405±5 nm light emitting diode on *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* under refrigerated condition [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology, 2015, 153: 33-39
- [16] Ghate V, Ng K, Zhou W, et al. Antibacterial effect of light

- emitting diodes of visible wavelengths on selected foodborne pathogens at different illumination temperatures [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(3): 399-406
- [17] Kang J W, Lee H Y, Kang D H. Synergistic bactericidal effect of hot water with citric acid against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formed on stainless steel [J]. *Food Microbiology*, 2021, 95: 103676
- [18] Kim Y, Kim H, Beuchat L R, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using biofilms of non-pathogenic soil bacteria (*Streptomyces* spp.) on stainless steel under desiccated condition [J]. *Food Microbiology*, 2019, 79: 61-65
- [19] Wang H, Cai L, Li Y, et al. Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants [J]. *Food Control*, 2018, 91: 397-403
- [20] Bjarnsholt T, Buhlin K, Dufrene Y F, et al. Biofilm formation - what we can learn from recent developments [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2018, 284(4): 332-345
- [21] Zheng X, Guo J, Rao H, et al. Antibacterial and antibiofilm activity of coenzyme Q0 against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Control*, 2020, 109: 106955
- [22] Hussain M S, Kwon M, Park E, et al. Disinfection of *Bacillus cereus* biofilms on leafy green vegetables with slightly acidic electrolyzed water, ultrasound and mild heat [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2019, 116: 108582
- [23] Yang Y, Ma S, Xie Y, et al. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by 405-nanometer-light-emitting diode illumination [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86: e00092-20
- [24] Kumar A, Ghate V, Kim M J, et al. Antibacterial efficacy of 405, 460 and 520 nm light emitting diodes on *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(1): 49-56
- [25] Simoes M, Bennett R N, Rosa E A S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms [J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(6): 746-757
- [26] Li R, Kuda T, Yano T. Effect of food residues on efficiency of surfactant disinfectants against food related pathogens adhered on polystyrene and ceramic surfaces [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2014, 57(1): 200-206
- [27] Pileggi G, Wataha J C, Girard M, et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2013, 10(2): 134-140
- [28] Harper R A, Carpenter G H, Proctor G B, et al. Diminishing biofilm resistance to antimicrobial nanomaterials through electrolyte screening of electrostatic interactions [J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2019, 173: 392-399
- [29] Cappitelli F, Polo A, Villa F. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled [J]. *Food Engineering Reviews*, 2014, 6(1-2): 29-42
- [30] Misba L S, Khan A U. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2017, 18: 24-33
- [31] Liu F, Sun Z, Wang F, et al. Inhibition of biofilm formation and exopolysaccharide synthesis of *Enterococcus faecalis* by phenyllactic acid [J]. *Food Microbiology*, 2019, 86: 103344
- [32] Lee H J, Seo J, Kim M S, et al. Inactivation of biofilms on RO membranes by copper ion in combination with norspermidine [J]. *Desalination*, 2017, 424: 95-101
- [33] Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment [J]. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2003, 39(12): 1137-1150
- [34] Bai J R, Zhong K, Wu Y P, et al. Antibiofilm activity of shikimic acid against *staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2019, 95: 327-333
- [35] 王硕, 邓海潮, 郭都, 等. 反式肉桂醛对副溶血性弧菌毒力因子的抑制作用[J]. *食品科学*, 2020, 41(15): 88-95
WANG Shuo, DENG Haichao, GUO Du, et al. Anti-virulence effect of trans-cinnamaldehyde against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 88-95