

王凤婷, 靳盼盼, 刘芳, 等. 食源性阴沟肠杆菌生物膜形成能力[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 943-948.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.033

食源性阴沟肠杆菌生物膜形成能力

王凤婷^{1,2}, 靳盼盼^{1,2}, 刘芳¹, 孙芝兰¹, 王道营¹, 张芳³, 许晓曦², 徐为民¹
(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3.江苏省农业科学院中心实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 本试验对从冰鲜鸡肉中分离得到的1株阴沟肠杆菌成膜特性进行研究, 通过对其在培养12 h、24 h、48 h、72 h后细菌总数的变化, 微观结构观察及胞外多糖质量浓度的测定, 分析其在生物膜形成期间的变化规律, 进而为抑制生物膜形成的杀菌剂的研究提供基础。结果表明, 阴沟肠杆菌C4在培养过程中菌数增长较快, 成膜迅速, 12 h后细菌总数无显著($P>0.05$)变化; 扫描电镜和激光共聚焦显微镜的观察结果及胞外多糖质量浓度变化结果表明, 12 h至48 h细胞逐渐聚集成团, 相互之间联系紧密, 胞外分泌物质增多将细菌包裹, 72 h胞外分泌物质减少, 细胞集团间空隙减少, 形成致密结构。因此, 在生物膜抑制的研究中可着重关注减少胞外物质的分泌, 使细菌细胞裸露在外, 有助于生物膜内细菌的杀死。

关键词: 阴沟肠杆菌; 生物膜; 胞外分泌物质

中图分类号: Q939.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0943-06

Biofilm formation ability of a food-borne *Enterobacter cloacae*

WANG Feng-ting^{1,2}, JIN Pan-pan^{1,2}, LIU Fang¹, SUN Zhi-lan¹, WANG Dao-ying¹, ZHANG Fang³,
XU Xiao-xi², XU Wei-min¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Central Laboratory, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The biofilm-forming process of *Enterobacter cloacae* isolated from iced chicken meat was studied, and the changes of total bacteria, micro-structure and concentration of exopolysaccharide at 12 h, 24 h, 48 h and 72 h were investigated, the changes in the formation of biofilm were analyzed to provide a basis for the study of fungicides which could inhibit biofilm formation. The results showed that the process of biofilm formation for C4 was rapidly and there was no significant variation for total bacteria after 12 hours, cells gathered into a mass from 12 h to 48 h, extracellular polymeric substance (EPS) increased and bacteria cells embedded on biofilm, EPS and lacuna among cell clusters decreased after 72 hours, bacteria cells were exposed outside, forming compact structure visualized by scanning electron microscope (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Therefore, in the study of biofilm inhibition, more attention should be paid to decreasing the secretion of EPS, making the bacterial cells exposed, it's useful for killing bacteria in biofilm.

Key words: *Enterobacter cloacae*; biofilm; the secretion of extracellular polymeric substances

收稿日期: 2017-11-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31371802); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20151367); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1006]

作者简介: 王凤婷(1993-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。(E-mail): 526013836@qq.com

通讯作者: 刘芳, (E-mail) fangliu82@163.com

生物膜是附着在物质表面的微生物聚集体, 包裹在胞外分泌的基质内^[1], 无细胞材料如矿物晶体、土壤^[2]、泥沙颗粒、组织器官^[3]等表面均能形成细菌生物膜。组成生物膜三维结构的物质有蛋白质、核酸、多糖、两性聚合物, 以及脂质、腐殖质和其他包含主要聚物质的高分子物质^[4]。细菌容易

在医疗器械表面、水生环境中、食品加工机器表面形成生物膜,在这些区域产生生物膜造成严重的危害,目前已引起大家关注^[5]。生物膜在食品工业中的形成过程是,首先食物中的有机分子在设备表面堆积形成条件层,接下来有活性的微生物接触到有机分子,微生物分子在经过清洁、杀菌等处理后依然残留于物体表面并大量繁殖,最后在细胞内基因及群体感应的作用下形成生物膜^[6]。据报道。沙门氏菌为首次发现在食品表面形成生物膜的致病菌,自此之后陆续发现有食源性致病微生物在食品或食品接触面形成生物膜并造成危害,如克雷白氏杆菌属、假单胞菌、弯曲杆菌、大肠杆菌等,生物膜中致病微生物的存在增加了微生物污染的风险。

阴沟肠杆菌广泛分布于自然环境中^[7],对人类不是一种主要的致病菌,但被认为是造成医院内感染的主要因素^[8],容易被身体虚弱或免疫力被抑制的人群感染。阴沟肠杆菌的感染会造成菌血症^[9],在新生儿重症监护室^[10]有高风险的感染几率。阴沟肠杆菌是一种易于形成生物膜的食源性致病菌^[11],形成膜后增加了清除的难度和对药物的耐受性。目前对于生物膜的研究主要集中在膜密度、厚度、壁面剪切力、膜内微生物的生长速率^[12]等参数。Zhou 等^[13]测定了 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 作用于生物膜后,对其细菌总数的影响,结果表明在这些离子的作用下能够抑制阴沟肠杆菌 BF-17 生物膜的形成。本试验拟以 1 株从冰鲜鸡肉中分离得到的阴沟肠杆菌为目标菌株,通过对成膜后菌数的测定、膜微观结构、膜厚度及胞外分泌物中多糖含量的测定,研究该菌在 72 h 内的成膜特点,以期为今后研究抑制、去除生物膜的消毒剂提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验所用菌株为阴沟肠杆菌 C4 (*Enterobacter cloacae* C4),是江苏省农业科学院农产品加工研究所从冰鲜鸡肉中分离鉴定并保存的。试验用培养基为胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基,购自北京路桥生物公司;LIVE/DEAD BacLight™ 试剂盒与 Nunc™ Lab-Tek™ 8 孔腔室盖玻片系统均购自赛默飞世尔科技公司;24 孔细胞培养板购自美国康宁公司;苯酚、50%戊二醛等试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

所用仪器设备主要有 PE 转盘式激光共聚焦显

微镜(铂金埃默默公司产品)、EVO-LS10 扫描电子显微镜(德国蔡司公司产品)、Epoch 微孔板分光光度计(美国伯腾仪器公司产品)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养 将从冰鲜鸡肉中分离得到的菌株鉴定后用菌液在胰蛋白胨大豆肉汤-琼脂平板上划线,37 ℃ 培养 24 h 后选取大小适宜的菌落在新鲜的无菌培养基中培养至对数期,重复 3 次后,将菌液与无菌的 50%甘油按 1:1 (体积比)混匀后贮存在保种管,冻存于-40 ℃。试验前按体积分数 1%接种于新鲜培养基中,活化 12 h 后备用。

1.3.2 生物膜菌数测定 活化后的培养基 1% (体积比)接种于无菌 TSB 中,混匀后加入 24 孔细胞培养板中,每孔 1 ml 液体,置于 37 ℃ 静置培养,24 h 更换上层培养基,分别在 12 h、24 h、48 h、72 h 取样测定菌数。将上层培养基去除并测定其 600 nm 处的吸光度,使用 0.01 mol/L 的无菌 PBS 洗涤生物膜 2 次,洗净后加入 1 ml PBS,用灭菌后的棉签擦除粘附于孔壁及孔底的膜,将棉签及孔内液体一齐加入含有 9 ml PBS 的试管中^[14],涡旋 2 min 混匀,梯度稀释,选取适当梯度的 100 μl 液体在 TSB-琼脂平板表面涂匀,37 ℃ 培养 24 h 后对菌落进行计数。

1.3.3 扫描电镜观察 活化菌种 1% (体积比)接种于培养基混匀后加入 Nunc™ Lab-Tek™ 8 孔腔室板中,每孔 400 μl 菌液,37 ℃ 静置培养,每 24 h 更换培养基,在 12 h、24 h、48 h、72 h 时处理样品。样品处理方法同方法 1.3.2 中生物膜洗涤方法。洗净后室温风干,去除载玻片上隔板,使用玻璃刀将载玻片按照格子分割,浸泡于 2.5%戊二醛,4 ℃ 放置 12 h。接下来置于锇酸溶液中再次固定,使用乙醇梯度脱水后对样品镀金,处理好的样品用于扫描电镜观察^[15],样品观察时放大倍数为 5 000 倍。

1.3.4 激光共聚焦显微镜观察 激光共聚焦显微镜观察处理方法同方法 1.3.3,生物膜经 0.01 mol/L PBS 洗涤后使用 LIVE/DEAD BacLight™ 试剂盒中的荧光染料进行染色^[16],荧光染料现配现用,每 1 ml PBS 中加入 2 种染料各 3 μl ,混匀后加入 8 孔腔室板中,每孔 400 μl ,避光染色 30 min,染色后去除染色液并用 PBS 洗涤除去多余探针,加入 2.5%戊二醛溶液避光固定 30 min,去除戊二醛溶液后避光风干,取下载玻片上层隔板后,在载玻片表面滴加 LIVE/DEAD BacLight™ 试剂盒中的 BacLight™ Mounting Oil,加盖玻片。

1.3.5 多糖含量测定 使用方法 1.3.2 的方法培养及处理生物膜, PBS 洗涤后, 加入 1 ml 0.01 mol/L PBS, 将每孔中液体及孔壁、孔底粘附的细菌收集于离心管中, 4 ℃、6 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 用含有 0.22% 甲醛的氯化钠溶液 (0.85% NaCl) 重悬沉淀, 80 ℃ 水浴加热 30 min, 再次 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清液^[17]。

生物膜中多糖可分为可溶性多糖及不可溶性多糖, 浓度的测定采用苯酚-硫酸法。取 100 mg 葡萄糖定容于 100 ml 容量瓶中, 再取 10 ml 配制的葡萄糖溶液定容至 100 ml, 配置成 100 μg/ml 的葡萄糖标准溶液, 将葡萄糖标准溶液按照不同比例加于试管中, 用水补齐至 1 ml 后加入 0.5 ml 9% 的苯酚溶液, 混匀后加入 5 ml 浓硫酸, 震荡混匀后在 100 ℃ 水浴加热 15 min, 凉至室温后测定其在 490 nm 处的吸光度, 根据结果制作葡萄糖质量浓度与吸光度之间的标准曲线。上述首次离心得到的溶液中含有的多糖为可溶性多糖, 第二次离心得到的溶液中的多糖为不可溶性多糖, 多糖质量浓度按照标准曲线的测定方法进行测定。

1.3.6 生物膜蛋白含量测定 按方法 1.3.2 的方法培养生物膜, 分别在 12 h、24 h、48 h、72 h 取样并处理生物膜, 6 000 r/min 离心 5 min, 保存上清液, 加入 1 ml 0.01 mol/L PBS 重悬沉淀后, 240 W, 超声处理 2 min, 超声时工作 4 s 停 4 s^[18]。超声后液体 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。将 2 次离心收集得到的上清液分别在 280 nm 处测定吸光值, 第一次收集的上清液中蛋白质为溶液内蛋白, 第二次收集的上清液中蛋白质为沉淀内蛋白。

1.3.7 统计分析 结果中数值均以平均值±标准差形式表示, 采用 Origin 8 作图, 采用 SPSS 18.0 对试验数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 生物膜菌数测定

阴沟肠杆菌 C4 在 72 h 内形成的生物膜中细菌数量如图 1, 此种细菌易于形成生物膜, 并且菌数可达 10^8 CFU/cm² 以上 (图 1)。阴沟肠杆菌形成的生物膜在 12 h、24 h、48 h、72 h 时菌数分别为 $10^{8.36}$ CFU/cm²、 $10^{8.41}$ CFU/cm²、 $10^{8.33}$ CFU/cm²、 $10^{8.27}$ CFU/cm², 在 12 h 时菌数几乎达到最大值, 在接下来的培养时间内, 细菌总数无显著变化 ($P>0.05$)。因

阴沟肠杆菌为兼性厌氧菌, 在有氧条件下生长更好, 无氧条件下仅能维持生存, 所以细菌生长时不仅贴孔底形成生物膜, 在上层培养基中也有大量细菌生长, 并且在液面与孔壁接触处形成一圈生物膜。

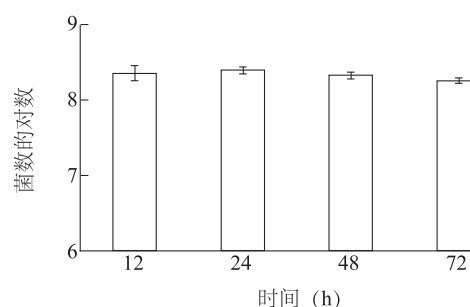


图 1 培养不同时间阴沟肠杆菌 C4 生物膜中细菌数量

Fig.1 Bacterial number of *Enterobacter Cloacae* C4 biofilm in different incubated time

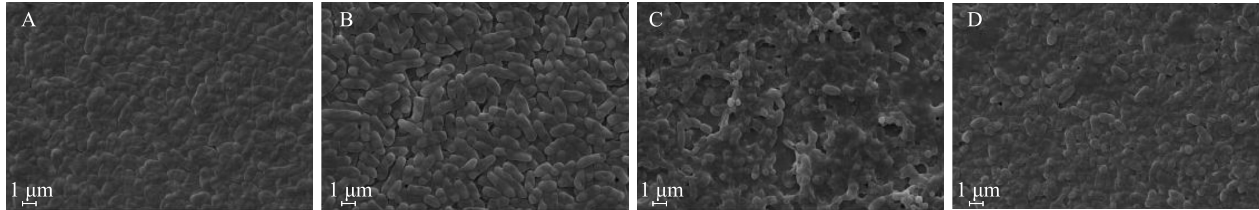
2.2 生物膜微观结构

细菌形成生物膜并不是近年来发现的现象, 早在几十年前就有关于生物膜的报道^[19], 但有关生物膜的形成及抑制研究近些年才开始增多。由于试验设备的限制, 早期无法对生物膜微观结构进行观察, 近些年借助于激光共聚焦显微镜 (CLSM)^[20], 可以在对生物膜结构不造成破坏的条件下观察其结构特性及随时间变化的规律。CLSM 多用于医药^[21]、环境科学等方面的研究^[16], 本次试验中通过 CLSM 与扫描电子显微镜 (SEM) 技术相结合的方法, 研究培养不同时间后生物膜结构、形态的变化。

2.2.1 扫描电镜观察结果 扫描电子显微镜 (SEM) 作为研究细菌生物膜的仪器具有高分辨率、高放大倍数、成像清晰的优点, 但生物膜在形成时, 细菌细胞会嵌入胞外基质, 形成厚层结构^[22], SEM 有时不能直观地观察到隐藏在基质内的细胞。阴沟肠杆菌 C4 生物膜在 12 h、24 h、48 h、72 h 时的微观结构通过扫描电镜观察结果如图 2, 培养时间为 12 h (图 2A) 时, 细菌细胞排布为单层结构, 细菌量较多, 紧密聚集为一层, 并且菌体粗大; 生物膜生长至 24 h 时 (图 2B), 明显看见有菌体聚集现象, 并且各聚集体间有明显空隙; 48 h (图 2C) 时, 细菌外层明显有分泌物包裹, 小细胞聚集体间由分泌物连成大细胞聚集体, 生物膜中聚集体间层叠成三维立体结构, 细菌细胞变小, 整体结构中孔洞较多; 培养至 72 h 时 (图 2D), 细菌形态不完整, 处于损伤状态, 生物膜结构致密, 胞外基质较 48 h 时有所减少, 细菌之间形成一个完整的大聚集体。阴

沟肠杆菌 C4 生物膜形成的初期,细菌细胞大量繁殖,单层定植于 8 孔腔室板底部,随着培养时间增加,分泌胞外基质形成细胞集团,各细菌包裹物相连成为大

的细胞聚集体,使细胞裸露在外的部分减少,达到 72 h 时,胞外分泌物减少,细胞有破损,但细菌间结构更为致密,裸露在外部分重新增多。



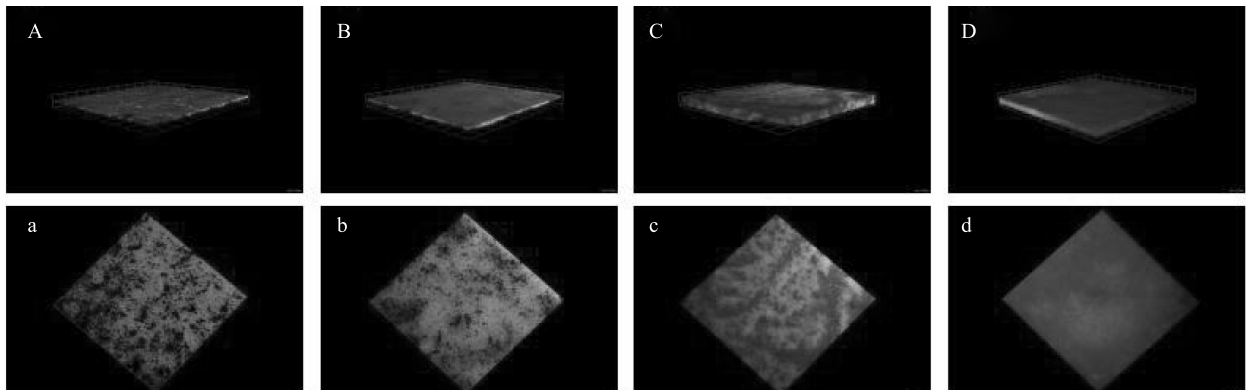
A、B、C、D 分别为阴沟肠杆菌 37 °C 培养 12 h、24 h、48 h、72 h。

图 2 阴沟肠杆菌 C4 生物膜在扫描电子显微镜下的图片

Fig.2 Representative scanning electron microscope (SEM) images of *Enterobacter cloacae* C4 biofilms

2.2.2 激光共聚焦显微镜检测结果 由于 SEM 观察生物膜中细菌细胞时受到胞外基质的影响,因此采用 LIVE/DEAD BacLight™ 试剂盒中的荧光染料对生物膜进行染色,进而通过转盘式激光共聚焦显微镜观察生物膜内部包裹的细菌细胞分布状况、生物膜形成的厚度^[16]。试剂盒中含有 2 种荧光染料,每种均为荧光探针 SYTO-9 及碘化丙啶 (PI) 按照一定比例配制,SYTO-9 与 PI 作为核酸染料染色后,未受损细胞呈现绿色荧光,受损及死亡细胞呈现黄色或红色荧光。培养 12 h、24 h、48 h、72 h 的阴沟肠杆菌 C4 生物膜经含

有荧光探针的染料染色后可在激光共聚焦显微镜下呈现三维结构^[23] (图 3),并通过荧光强度测定生物膜厚度。12 h 的生物膜厚度为 6.5 μm,生物膜表面布满孔洞 (图 3A),主要呈现绿色荧光;培养 24 h 时,生物膜表面孔洞减少,膜表面较为致密,厚度达到 7.6 μm;48 h 的生物膜无明显孔洞但表面不平整,有黄色荧光出现,厚度为 9.1 μm;生物膜培养时间达到 72 h 时,膜表面光滑,无空隙,但膜厚度较 48 h 减小,黄色荧光增多并出现红色荧光。



A、B、C、D 分别为阴沟肠杆菌 37 °C 培养 12 h、24 h、48 h、72 h 生物膜的三维立体图,a、b、c、d 分别为阴沟肠杆菌 37 °C 培养 12 h、24 h、48 h、72 h 生物膜的正面图。

图 3 阴沟肠杆菌 C4 生物膜在激光共聚焦显微镜下的三维图片

Fig.3 Representative confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of *Enterobacter cloacae* C4 biofilms

通过 SEM、CLSM 技术相结合,综合两方面获得的信息可以解决 SEM 不能观察到嵌入胞外基质中细胞的问题^[24]。SEM 与 CLSM 结果相对应,随着培养时间增加膜厚度增加,细胞聚集体逐渐相连,小聚集体减少,聚集体间空隙减少,膜表面逐渐光滑,但

72 h 时可见胞外分泌物质减少,膜厚度降低并且细胞有损伤,黄、红荧光增多。

2.3 胞外分泌物

2.3.1 多糖 根据苯酚-硫酸法对胞外基质中多糖含量进行测定,苯酚与硫酸水解多糖并脱水后生成

的糠醛化合物会发生显色反应,通过其吸光度变化计算多糖质量浓度。由于不可溶性多糖提取时加入甲醛,甲醛的存在会对显色造成干扰,因此,不可溶性多糖的测定需要对标准曲线进行调整。根据对不同质量浓度的葡萄糖标准溶液进行测定得到可溶性多糖与不可溶性多糖吸光度-糖质量浓度关系的标准曲线分别为: $Y = 0.0064x + 0.0790$ ($R^2 = 0.99$), $Y = 0.0070x + 0.3042$ ($R^2 = 0.99$)。由图4可知,不可溶性多糖质量浓度在12 h、24 h、48 h随着培养时间延长显著增加($P < 0.05$)增加,质量浓度分别为4.89 $\mu\text{g/ml}$ 、5.65 $\mu\text{g/ml}$ 、6.18 $\mu\text{g/ml}$,生物膜生长至72 h时不可溶性多糖质量浓度下降到4.93 $\mu\text{g/ml}$,与培养时间为12 h时无显著性变化($P > 0.05$);可溶性多糖含量较不可溶性多糖含量高,培养12 h、24 h、48 h可溶性多糖质量浓度显著升高($P < 0.05$),分别为5.89 $\mu\text{g/ml}$ 、6.93 $\mu\text{g/ml}$ 、11.77 $\mu\text{g/ml}$,72 h略有下降,浓度为9.95 $\mu\text{g/ml}$ 。因苯酚-硫酸法测定多糖质量浓度时具有灵敏度高的优点,所以即便生物膜中多糖含量较少,仍能测定出质量浓度变化。阴沟肠杆菌 C4 生物膜所含不同种类多糖随时间变化趋势相同,但可溶性多糖含量较不可溶性多糖含量高。胞外多糖作为胞外分泌物质中的主要成分,可以根据多糖质量浓度变化推测胞外基质量的变化^[25]。

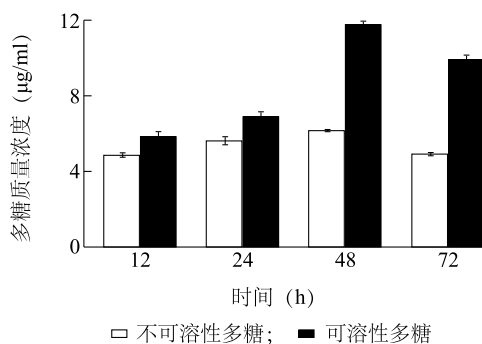


图4 胞外可溶性多糖及不可溶性多糖质量浓度的变化

Fig.4 The changes of concentration for exopolysaccharides

2.3.2 蛋白质含量 蛋白质含量的测定可采用考马斯亮蓝法、BCA法、Lowry法^[18]等,但由于生物膜内蛋白质含量较少,试验中采用测定其在280 nm处吸光度的方法对生物膜内蛋白质含量进行测定。随着生物膜培养时间的增加,吸光度随之增加(图5),并且在48 h时达到最高,沉淀内蛋白含量超过仪器检测范围,72 h时蛋白质含量均有下降。溶液内蛋

白含量始终较低,检测时间内280 nm处吸光度始终小于0.50,48 h时吸光度最高,为0.47。

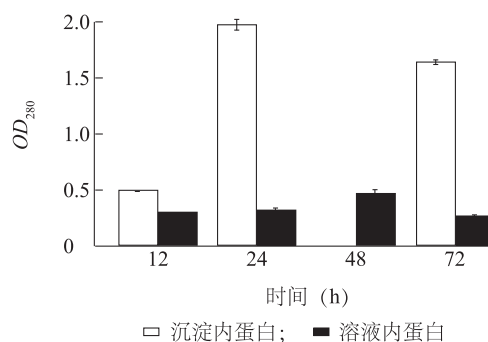


图5 紫外吸收物质吸光度的变化

Fig.5 Changes of absorbance for UV-absorbing materials

阴沟肠杆菌 C4 生物膜的形成速度较快,在12 h时已经有膜结构出现,而对肠炎沙门氏菌成膜特性研究时^[26],其在3 d后才有明显的膜结构,扫描电镜及激光共聚焦显微镜观察结果中,细菌成膜后团簇结构较小,细胞团之间结构不紧密,菌数也较少,成膜性也较单增李斯特菌好^[14]。胞外多聚物(EPS)占生物膜干质量的90%以上,是微生物的自身代谢产物,被认为是构成生物膜骨架的重要物质^[27]。本试验中研究的阴沟肠杆菌 C4 测得多糖质量浓度中可溶性多糖质量浓度高于不可溶性多糖质量浓度。而在对饥饿状态下粪肠球菌产多糖能力^[28]的研究结果中表明其不可溶性多糖含量较高,细菌中水溶性多糖可作为生长所需底物被利用,因此,阴沟肠杆菌生物膜在生长过程中对可溶性多糖的利用少可能导致剩余含量高。生物膜在形成过程中起主要作用的组分有多糖、蛋白质及胞外DNA,胞外多糖是形成成熟生物膜必不可少的成分^[29],因此,试验中通过对胞外多糖含量的变化代表EPS变化,但组成EPS成分的结构变化还需借助傅里叶红外光谱或拉曼光谱^[1]等仪器测定。

3 结论

本次试验通过对阴沟肠杆菌 C4 在12 h、24 h、48 h、72 h菌数、微观结构的观察,发现此种细菌易于形成生物膜,并且在较短时间内菌数可达到最大值,12 h后细菌总数无显著($P > 0.05$)变化,但根据其微观结构观察发现细菌从单层结构逐渐聚集成小的细胞集团,细胞集团继续聚集形成较大细胞团簇,彼此之间逐渐相连,缝隙及孔洞减少,形成密集结构,膜的厚度增加,在48 h达到最大,72 h膜厚度减

小,但根据 CLSM 图像可见致密性增加。因此,阴沟肠杆菌 C4 生物膜在形成过程中,成膜速度较快,菌数无变化,但胞外分泌物质在 48 h 达到最多,将细菌紧紧包裹,72 h 胞外分泌物减少,但膜结构致密。

参考文献:

- [1] WAGNER M, IVLEVA N P, HAISCH C, et al. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS-Matrix. [J]. Water Research, 2009, 43(1): 63-76.
- [2] 李燕杰,杜冰,董吉林,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, 25(4): 435-438.
- [3] 干霞芳,李蒙英. 生物膜和生物膜形成菌的研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2007, 31(6): 91-94.
- [4] COMTE S, GUIBAUD G, BAUDU M. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2006, 38(2): 237-245.
- [5] JOSEPH B, OTTA S K, KARUNASAGAR I, et al. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 64(3): 367-372.
- [6] SHI X, ZHU X. Biofilm formation and food safety in food industries[J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20(9): 407-413.
- [7] DANIELHOFFMANN M, SREDNI B, NITZAN Y. Bactericidal activity of the organo-tellurium compound AS101 against *Enterobacter cloacae* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(9): 2165-2172.
- [8] 王春新,蔡培泉,黄支密,等. 阴沟肠杆菌喹诺酮类耐药 *qnr* 基因的发现[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(2): 162.
- [9] 宁莉萍. 阴沟肠杆菌致化脓性脑膜炎 1 例报告[J]. 职业与健康, 2001, 17(2): 40-41.
- [10] 肖菊珍,龙慧,傅松哲,等. 婴幼儿配方米粉中肠杆菌科细菌检测[J]. 现代预防医学, 2012, 39(5): 1098-1099.
- [11] THOMPSON L J, GRAY V, LINDSAY D, et al. Carbon: nitrogen phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(5): 1105-1113.
- [12] BÖL M, MÖHLE R B, HAESNER M, et al. 3D finite element model of biofilm detachment using real biofilm structures from CLSM data[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2009, 103(1): 177-186.
- [13] ZHOU G, LI L J, SHI Q S, et al. Efficacy of metal ions and isothiazolones in inhibiting *Enterobacter cloacae* BF-17 biofilm formation[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2014, 60(1): 5-14.
- [14] LIU F, DU L, ZHAO T, et al. Effects of phenyllactic acid as sanitizing agent for inactivation of *listeria monocytogenes*, biofilms [J]. Food Control, 2017, 78: 72-78.
- [15] 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.
- [16] MITRAKUL K, SRISATJALUK R, SRISUKH V, et al. Citrus hystrix (makrut oil) oral sprays inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation [J]. Scienceasia, 2016, 42(1): 12.
- [17] HARIMAWAN A, TINGY P. Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) properties of *P. aeruginosa*, and *B. subtilis*, and their role in bacterial adhesion [J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2016, 146: 459-467.
- [18] CHEN W, LIANG J, HE Z, et al. Preliminary study on total protein extraction methods from *enterococcus faecalis* biofilm [J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2016, 15(3): 1-9.
- [19] HENRICI A T. Studies of freshwater bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1933, 25(3): 277-287.
- [20] KARUNAKARAN E, MUKHERJEE J, RAMALINGAM B, et al. 'Biofilmology': a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 90(6): 1869-1881.
- [21] GU H, FAN D, GAO J, et al. Effect of ZnCl₂ on plaque growth and biofilm vitality [J]. Archives of Oral Biology, 2012, 57(4): 369.
- [22] SCHAUDINN C, CARR G, GORUR A, et al. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM) [J]. Journal of Microscopy, 2009, 235(2): 124.
- [23] REUVEN A, AVSHALOM T, MOSHE S, et al. Genetic adaptation of *streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces [J]. Bmc Microbiology, 2010, 10(1): 51.
- [24] BRIDIER A, MEYLHEUC T, BRIANDET R. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM) [J]. Micron, 2013, 48(3): 65-69.
- [25] HATHROUBI S, HANCOCK M A, BOSSÉ J T, et al. Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Infection & Immunity, 2015, 84(1): 127-137.
- [26] 王虎虎,李诺,李韵哈,等. 沙门氏菌生物菌膜的结构特征及在食品接触面的转移[J]. 核农学报, 2015, 29(12): 2313-2319.
- [27] 戚韩英,汪文斌,郑昱,等. 生物膜形成机理及影响因素探究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 677-685.
- [28] 刘红艳,韦曦,凌均荣. 饥饿状态粪肠球菌生物膜胞外多糖的合成能力[J]. 中华口腔医学研究杂志, 2012, 6(5): 16-20.
- [29] COMTE S, GUIBAUD G, BAUDU M. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2006, 38(2): 237-245.

(责任编辑:陈海霞)