

史云娇, 刘 芳, 孙芝兰, 等. 藏羊肉中优势腐败不动杆菌的分离鉴定及其生物膜形成特性[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 195-203.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.028

藏羊肉中优势腐败不动杆菌的分离鉴定及其生物膜形成特性

史云娇^{1, 2}, 刘 芳¹, 孙芝兰¹, 吴海虹¹, 张新笑¹, 诸永志¹, 卞 欢¹, 朱云龙²

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2. 扬州大学旅游烹饪学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 本研究从冷鲜藏羊肉中共分离获得 40 株腐败菌, 其中 10 株为不动杆菌, 经结晶紫染色定量检测发现 10 株不动杆菌均具有中等或强粘附成膜能力。对 1 株成膜能力最强的不动杆菌 A3 的成膜特性进行深入分析, 发现该菌在培养 3 d 时生物膜内菌数最高, 随后培养 5 d 至 7 d 时菌数无显著 ($P > 0.05$) 变化。扫描电镜、激光共聚焦显微镜观察及胞外多糖质量浓度测定结果表明, 该菌形成生物膜的过程中培养 1 d 到 3 d 细菌迅速繁殖, 培养 3 d 到 5 d, 菌体聚集成团, 并且此时不可溶性多糖的含量最高, 培养 7 d 时胞外分泌物质减少, 生物膜出现解离状态。因此, 在藏羊肉加工过程中, 针对此菌生物膜抑制的研究可着重关注控制胞外物质的分泌, 并且在生物膜未成熟前实施消毒措施, 有助于彻底杀灭生物膜内的腐败菌。

关键词: 藏羊肉; 不动杆菌; 生物膜; 胞外多糖

中图分类号: S879.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0195-09

Isolation and identification of *Acinetobacter* in Tibetan mutton and the bio-film formation characteristics

SHI Yun-jiao^{1, 2}, LIU Fang¹, SUN Zhi-lan¹, WU Hai-hong¹, ZHANG Xin-xiao¹, ZHU Yong-zhi¹, BIAN Huan¹, ZHU Yun-long²

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Tourism and Cuisine, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: In this study, forty food spoilage strains were isolated and identified from the Tibetan mutton, and ten strains were *Acinetobacter* sp. Quantitative detection results by crystal violet staining showed that ten strains of *Acinetobacter* had neutral or strong adhesion ability. The biofilm formation characteristics of *Acinetobacter* A3 with the best biofilm forming ability were analyzed. It was found that the bacterial count in biofilm was the highest when biofilm was cultured for three

收稿日期: 2018-04-17

基金项目: 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(17)3015]; 江苏省重点研发计划 (现代农业) 项目 (BE2017392)

作者简介: 史云娇 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生。(E-mail) 970539089@qq.com

通讯作者: 刘 芳, (E-mail) fangliu82@163.com

days, and there was no significant change in the number of bacteria on the 5th to 7th day after culture. The results of scanning electron microscopy, confocal laser scanning microscopy and extracellular polysaccharide determination concentration showed that bacteria propagated rapidly from one to three days in the process of biofilm formation. When the biofilm was cultured for three to five days, the bacteria

aggregated into groups, and the insoluble polysaccharide content was highest. The extracellular substances were decreased and the biofilm became dissociated when it was cultured for seven days. During the processing of Tibetan mutton, the secretion of extracellular substances should be paid more attention for biofilm inhibition research, and disinfection measures should be implemented before the biofilms matured in order to kill the spoilage bacteria.

Key words: Tibetan mutton; *Acinetobacter*; biofilm; extracellular polysaccharide

藏羊(Tibetan sheep)又称藏系羊,是分布于中国西藏、青海和甘南等青藏高原地区的主要畜种。藏羊肉具有高蛋白、低脂肪、低胆固醇、肉质鲜嫩、少膻味的特点,故食用价值较高。目前国内外学者对藏羊肉的研究主要集中在营养成分^[1-3]及品质评价^[4-5]等方面,对其加工屠宰中的卫生安全问题研究较少。生物膜又称生物被膜,是微生物抵抗外界不良环境的一种特殊生长方式,自然界中大多数微生物是以生物被膜的形式存在^[6-7]。在食品工厂中几乎所有条件下,大多数致病菌或腐败菌均可以粘附在不同接触材料表面并形成生物被膜,从而对一些消毒剂的处理产生抗性作用,造成食品的交叉污染和周期性污染^[8]。在自然界大多数微生物也均可形成生物被膜,给人类公共卫生和食品安全带来极大的威胁。因此,在食品加工过程中如何防止有害微生物形成生物被膜而引起食源性疾病是亟待解决的科学问题。

不动杆菌属细菌(*Acinetobacter* spp.)是非发酵条件致病菌,是引起医院内感染的致病菌之一。近年来,有大量文献报道了不动杆菌属是肉类食品中的腐败菌之一。张秋勤^[9]在对生鲜鸡中主要腐败菌群的研究中发现贮藏前期与贮藏后期优势菌均由不动杆菌、假单胞菌、肉杆菌、气单胞菌和魏斯氏菌构成。Jul等^[10]对鸡胴体表面分离的5 920株腐败菌进行分析后发现30.5%为假单胞菌,22.7%为不动杆菌,13.9%为产黄菌(*Flavobacterium* spp.),12.7%为棒状杆菌(*Corynebacterium*),20.2%为酵母菌等其他菌群。本研究拟对藏羊肉腐败菌中不动杆菌的污染情况进行分析,并对其生物膜形成特性进行鉴定,然后以1株成膜能力较强的菌株为目标菌株,通过对其成膜后菌数、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7 d内的成膜特性,以期今后藏羊肉加工过程中控制及杀灭该菌的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

平板计数琼脂(PCA)和胰蛋白胨大豆肉汤(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孔腔室盖玻片系统购自赛默飞世尔科技公司,24孔和96孔细胞培养板均购自美国康宁公司,细菌基因组提取试剂盒购于天根生化科技有限公司,PCR引物合成以及DNA序列测定由上海生物工程技术服务有限公司完成,Taq DNA聚合酶购于宝生物工程(大连)有限公司,其余为分析纯。

1.2 仪器与设备

PE(Ultra View VOX)转盘式激光共聚焦显微镜(铂金埃尔默公司生产),EVO-LS10扫描电子显微镜(德国蔡司生产),Epoch微孔板分光光度计(美国伯腾仪器生产)。

1.3 试验方法

1.3.1 冷鲜藏羊肉不同分割部位优势腐败菌的分离 本实验室工作人员于2017年10月前往青海省青海湖肉业有限责任公司进行冷鲜藏羊肉分割产品细菌污染情况调查。根据GB/T4289.17-2003食品卫生微生物学检验(肉与肉制品检验)分别从藏羊肉前胸、前腿、后胸、后腿4个部位取样,每个部位不同表面位置选取25 g肉,剪碎后置于225 ml生理盐水中,低温振荡30 min后,取液体进行梯度稀释,然后涂布于PCA培养基,37℃培养24 h,选择特征菌落传代培养,直至分离出单菌落^[11]。

1.3.2 菌株16S rRNA序列扩增和同源性分析 将上述分纯的菌落接种到5 ml TSB液体培养基中,待菌生长至对数生长期后,离心收集菌体,利用细菌DNA提取试剂盒分别提取各纯细菌的基因组DNA。对提取的DNA进行16S rRNA序列的PCR扩增,引物分别为16S F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和16S R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')^[12]。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海生工生物技

术有限公司测序,获得 16S rRNA 基因序列信息。将测序获得的 16S rRNA 序列提交 GenBank 进行 Blast 相似检索并构建系统发育树。

1.3.3 结晶紫染色法定量检测不动杆菌的生物膜形成能力^[13] 吸取 2 μl 对数生长期的菌悬液加入装有 TSB 液体培养基(每孔 200 μl)的标准 96 孔微量滴定孔板中(体积比为 1:100),以未接菌的 TSB 为空白对照,3 次重复,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置培养。培养完成后用酶标仪测定 630 nm 处的光密度值 OD_1 ,弃去孔板中原培养基并以 0.01 mol/L 无菌 PBS 洗涤去除浮游菌(重复 3~4 次)后 96 孔板置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥 15 min,取 200 μl 1% 结晶紫溶液依次加入每个孔,染色 20 min 后用 PBS 去除孔壁染液(重复进行 4~5 次)并将 96 孔板置于室温风干 30 min,每孔中依次加入 200 μl 95% 乙醇,同时微量振荡 30 min,最后采用酶标仪测定 OD_{630} 处的光密度值(OD_2)。生物被膜形成能力的判断标准为: $B = (OD_2 - OD_{2C}) / (OD_1 - OD_{1C})$ 。其中 OD_{1C} 、 OD_{2C} 为空白对照吸光值, $B < 0.1$ 为不粘附成膜; $B \geq 0.1$ 为粘附成膜; $0.1 < B < 1.0$ 为中等强度粘附成膜; $B > 1.0$ 为强粘附成膜。

1.3.4 生物膜内菌数测定 将对数生长期的菌悬液按 1% 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 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养,24 h 更换上层培养基,分别在 1 d、3 d、5 d、7 d 取样测定菌数。将上层培养基去除并用 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起加入含有 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 固体平板表面涂匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后对菌落进行计数。

1.3.5 扫描电镜观察生物膜内菌体的微观状态 将对数生长期的菌悬液按 1% 接种于培养基中混匀后加入 Nunc 8 孔腔室板中,每孔 400 μl 菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 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。样品处理同方法 1.3.2 中生物膜洗涤方法。洗净后风干,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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

1.3.6 激光共聚焦显微镜观察生物膜的厚度变化 按照方法 1.3.5 的方法培养用于激光共聚焦显微镜观察的生物膜。生物膜经 0.01 mol/L PBS 洗涤后使用 LIVE/DEAD BacLight 乙醇试剂盒中的荧光染料进行染色,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^[16]。染色后去除染液并用 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 BacLightTM Mounting Oil,加盖玻片,-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存用于 CLSM 观察^[16]。观察时 SYTO-9 激发波长、发射波长分别为 485 nm 和 498 nm,PI 的激发波长和发射波长分别为 535 nm 和 637 nm,选取 60 倍油镜进行观察^[17-18]。

1.3.7 生物膜内胞外多糖含量测定 按照方法 1.3.4 的方法培养生物膜。生物膜经 0.01 mol/L 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 $^{\circ}\text{C}$ 6 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,用浓度为 0.85% 的氯化钠溶液(含 0.22% 甲醛)重悬沉淀,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min,再次 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清液^[19]。生物膜中多糖可分为可溶性多糖及不可溶性多糖,采用苯酚-硫酸法测定多糖浓度。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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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,振荡混匀后在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 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浓度-吸光度的标准曲线。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,多糖浓度按照标准曲线测定时的方法进行测定。

1.4 统计分析

每次试验重复 3 次,平行 2 次。采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。测定结果以平均值和标准差表示。试验数据采用 ANOVA 进行 LSD 差异分析($P < 0.05$ 为差异显著)。

2 结果与分析

2.1 藏羊肉中腐败菌的分离和鉴定

从 PCA 固体培养基上挑选出 40 株特征单菌落。将每株菌测序获得的 16S rRNA 序列经 NCBI Blast 分析后,构建系统进化树,结果如图 1 所示,将分离到的 40 株菌鉴定到菌种或者属的水平。由图 1 可知 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10 与 *Acinetobacter* sp.(不动杆菌属)亲缘关系近;C1、C2、C3、C4、C5、C6、C6 与 *Enterobacter cloacae*(阴沟肠杆菌)亲缘关系近;M1、M2、M3、M4、M5 与 *Macroccoccus caseolyticus*(溶酪大球菌)亲缘关系近;E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8 与 *Enterococcus faecalis*(粪肠球菌)亲缘关系近;L1、L2、L3、L4 与 *Lactococcus garvieae*(格氏乳球菌)亲缘关系近;Q1、Q2、Q3 与 *Aeromonas* sp.(气单胞菌属)亲缘关系近;R1 与 *Rothia* sp.(罗氏菌属)亲缘关系近;B1 与 *Bacillus* sp.(芽孢杆菌属)亲缘关系近;P1 与 *Staphylococcus epidermidis*(表皮葡萄球菌)亲缘关系近;K1 与 *Kocuria* sp.(考克氏菌属)亲缘关系近。表 1 为该 40 株腐败菌的鉴定结果,发现不同分割部位的藏羊肉都有不动杆菌的污染。

2.2 各不动杆菌生物膜形成能力分析

将分离到的 10 株不同杆菌分别培养 48 h 的生物膜,测定各样品染色前染色后 OD_{630} ,根据方法 1.3.3 生物膜形成能力判断 10 株不动杆菌的成膜能力,结果如图 2 所示,A1、A6、A7、A8、A9、A10 为中等粘附成膜;A2、A3、A4、A5 为强粘附成膜,说明此菌成膜比较迅速,且成膜效果较好。其中不动杆菌 A3 的 B 值(1.868)最高,与其他菌株具有显著性差别($P < 0.05$),因此判断不动杆菌 A3 成膜能力最强。

2.3 不动杆菌 A3 生物膜内菌数变化分析

不动杆菌 A3 在 7 d 内形成的生物膜中细菌数量如图 3 所示,其形成的生物膜在 1 d、3 d、5 d、7 d 时菌数分别为 $7.48 \lg 2$ 、 $9.04 \lg 2$ 、 $8.76 \lg 2$ 、 $8.92 \lg 2$,在第 3 d 时菌数几乎达到最大值,在接下来的培养时间内,细菌总数无显著性变化($P > 0.05$)。

2.4 不动杆菌 A3 生物膜微观结构

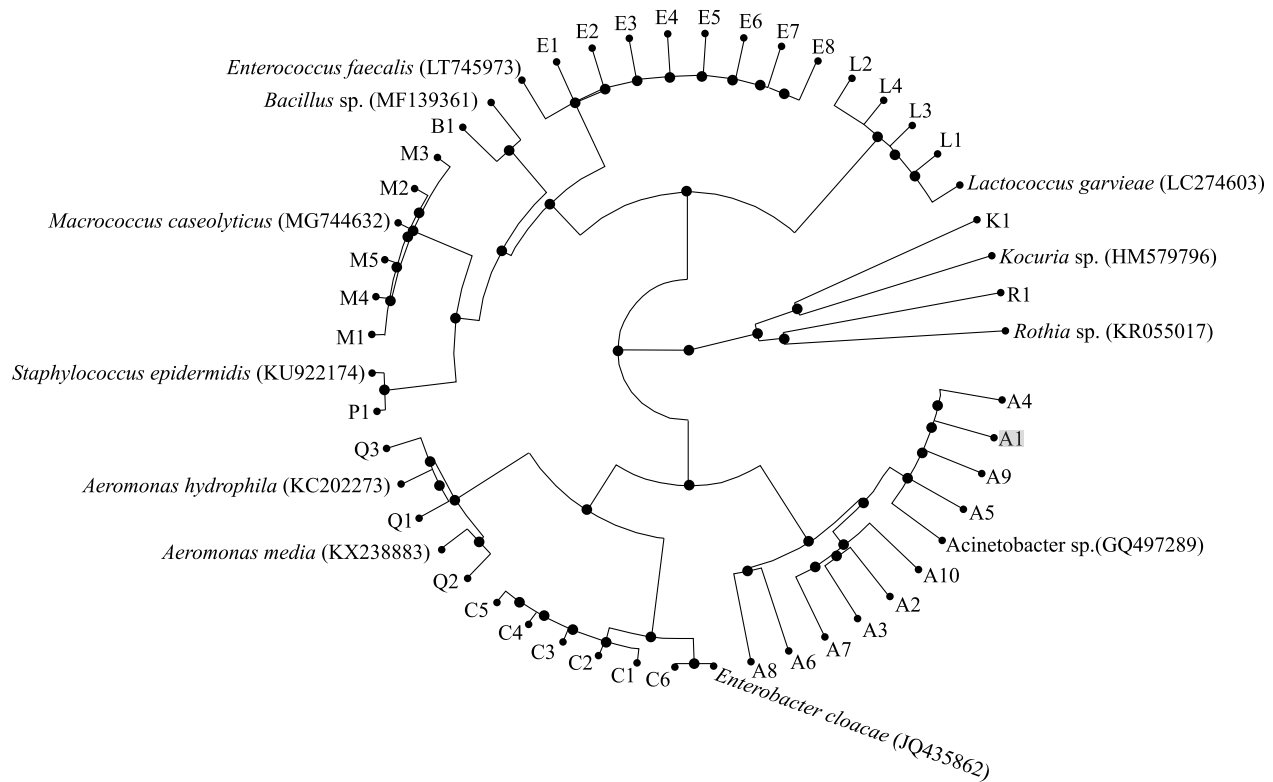
细菌形成生物膜并不是近年来发现的现象,早在几十年前就有关于生物膜的报道^[20],但有关生物膜的形成及抑制研究近些年才开始增多。

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)^[21],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的变化规律。CLSM 多用于医药^[22]、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,研究不同培养时间下生物膜结构、形态的变化。

表 1 不同部位藏羊肉的腐败菌组成

Table 1 Composition of spoilage bacteria in different parts of Tibetan mutton

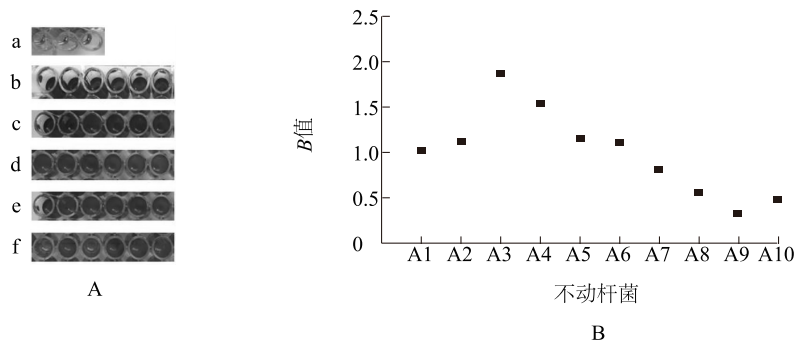
不同部位的藏羊肉	腐败菌
前腿肉	不动杆菌(<i>Acinetobacter</i> sp.) A1、A2 阴沟肠杆菌(<i>Enterobacter cloacae</i>) C1、C2 溶酪大球菌(<i>Macroccoccus caseolyticus</i>) M1、M2、M3 粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>) E1、E2 格氏乳球菌(<i>Lactococcus garvieae</i>) L1 气单胞菌(<i>Aeromonas</i> sp.) Q1 罗氏菌(<i>Rothia</i> sp.) R1
前胸肉	不动杆菌 A3、A4 阴沟肠杆菌 C3、C4 粪肠球菌 E3、E4 格氏乳球菌 L2、L3 气单胞菌 Q2、Q3 芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> sp.) B1
后腿肉	不动杆菌 A5、A6、A7 阴沟肠杆菌 C5 溶酪大球菌 M4 粪肠球菌 E5 格氏乳球菌 L4 表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>) P1
后胸肉	不动杆菌 A8、A9、A10 阴沟肠杆菌 C6 溶酪大球菌 M5 粪肠球菌 E6、E7、E8 考克氏菌(<i>Kocuria</i> sp.) K1



A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C6、M1、M2、M3、M4、M5、E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7、E8、L1、L2、L3、L4、Q1、Q2、Q3、R1、B1、P1、K1 见表 1。

图 1 基于 16S rRNA 基因构建的 40 株腐败菌的进化发育树

Fig.1 The phylogenetic tree of 40 spoilage bacteria based on 16S rRNA



A:各不动杆菌结晶紫染色后结果;B:各不动杆菌的成膜能力。A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10 见表 1。图 A 中 a 为空白对照;b 中前三孔与后三孔分别为不动杆菌 A1、A2;c 中前三孔与后三孔分别为不动杆菌 A3、A4;d 中前三孔与后三孔分别为不动杆菌 A5、A6;e 中前三孔与后三孔分别为不动杆菌 A7、A8;f 中前三孔与后三孔分别为不动杆菌 A9、A10。

图 2 各不动杆菌生物膜形成能力

Fig.2 The biofilm formation ability of *Acinetobacter* sp.

2.4.1 扫描电镜观察生物膜内菌体的微观状态 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^[23],SEM 有时不能直观地观察到隐藏在基质内的细胞。通过扫描电镜观察不动杆菌生物膜在培养

1 d、3 d、5 d、7 d 时的微观结构,结果如图 3,培养 1 d,仅少量单层菌体粘附于孔板底部,此时尚无细菌聚集体形成,但已有少量菌体分泌胞外基质(图 4A);培养 3 d,菌体以多层堆叠的形式聚集在一起,且细菌聚集体已经形成,大量菌体被胞外基质包裹(图 4B);培养 5 d,菌体数量较第 3 d 无显著变化,仍层叠为三维立

体结构,但已有部分菌体暴露于胞外基质外(图 4C);培养 7 d,菌体明显暴露于胞外基质外,且菌体呈损伤、不完整状态(图 4D)。

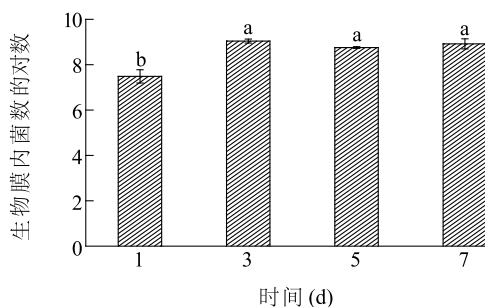


图 3 不同培养时间不动杆菌 A3 生物膜内菌数

Fig.3 Number of bacteria in *Acinetobacter* A3 biofilms cultured at different time

2.4.2 激光共聚焦显微镜观察生物膜的厚度变化 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^[20],捕捉到不同培养时间下的图像,获得即时数据。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。在 7 d 的培养周期内不动杆菌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^[24],培养 1 d 后可发现细菌粘附于接触材料表面已明显形成了生物膜的雏形结构,且生物膜中的活菌比例极高,但此时生物膜表面孔洞较多,厚度较薄(图 5A);培养 3 d 后大量的细菌粘附聚集已经形成,且较为致密,表面平整光滑,同时,生物膜中已出现少量死菌,从 CLSM 中也可观察到黄色菌体(受损菌)(图 5B);培养 5 d,接触材料表面已经被细菌体覆盖,但表面及侧面较第 3 d 开始出现空隙及裂缝,膜厚度增加,但红黄色荧光增多,此时,活菌比例呈现进一步显著下降趋势(图 5C);培养 7 d,生物膜表面及侧面明显出现较多孔洞,呈瓦解状态,且膜的厚度较培养 5 d 减小,此时红黄色荧光更多,说明菌体损伤死亡严重(图 5D)。

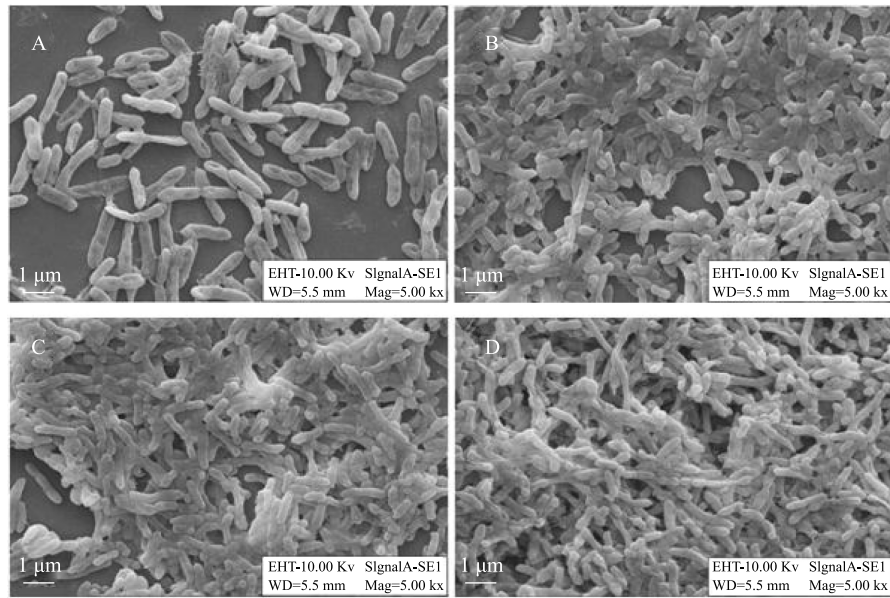
通过 SEM、CLSM 技术相结合,综合两方面获得的信息可以解决 SEM 不能观察到嵌入胞外基质中的细胞的问题^[25]。SEM 与 CLSM 结果相对应,培养 3 d 时,细菌迅速繁殖,且细胞聚集体相连,小聚集

体减少,聚集体间空隙减少,膜表面逐渐光滑且比较致密;培养 5 d 后,细胞有损伤,红黄荧光增多;培养 7 d 后,膜厚度明显减少,表面出现大的空隙,且红黄荧光进一步增多,说明细胞损伤死亡严重。

2.5 不动杆菌 A3 胞外分泌物质测定

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发生显色反应,通过对其吸光度变化计算糖浓度。由于不可溶性多糖提取时加入甲醛,甲醛的存在对显色造成干扰,因此,不可溶性糖的测定需要对标准曲线进行调整。根据对不同浓度的葡萄糖标准溶液进行测定得到可溶性糖与不可溶性糖吸光度-糖质量浓度关系的标准曲线分别为 $Y = 0.009\ 21x + 0.008\ 40$ ($R^2 = 0.99$), $Y = 0.034\ 60x + 0.011\ 30$ ($R^2 = 0.99$)。不可溶性多糖质量浓度在培养 1 d、3 d、5 d、7 d 时分别为 7.59 $\mu\text{g/ml}$ 、22.67 $\mu\text{g/ml}$ 、20.29 $\mu\text{g/ml}$ 、15.93 $\mu\text{g/ml}$,培养 3 d、5 d、7 d 与培养时间为 1 d 时比较均有显著性变化($P < 0.05$)(图 6);其中,第 3 d 最高,到第 7 d 时略微下降;可溶性多糖含量较不可溶性多糖含量高,培养 3 d 多糖质量浓度显著升高($P < 0.05$),3 d 后无显著性变化($P > 0.05$),培养 1 d、3 d、5 d、7 d 分别为 27.75 $\mu\text{g/ml}$ 、43.48 $\mu\text{g/ml}$ 、40.99 $\mu\text{g/ml}$ 、40.28 $\mu\text{g/ml}$ 。胞外多糖作为胞外分泌物质的主要成分,可以根据多糖质量浓度变化推测胞外基质量的变化^[26]。

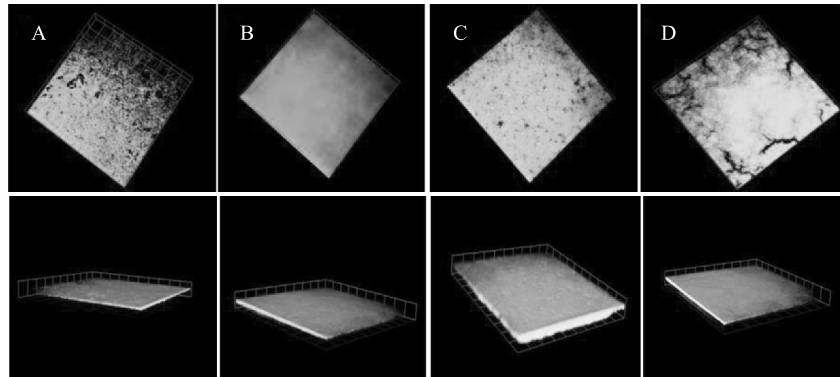
不动杆菌 A3 生物膜的形成速度较快,在 1 d 时已经可见有膜结构出现,在扫描电镜及激光共聚焦显微镜观察结果中,细菌成膜后细胞团之间成紧密的“网状”三维立体结构,成膜性也较好。胞外多聚物(EPS)占生物膜干质量的 90% 以上,是微生物的自身代谢产物,被认为是构成生物膜骨架的重要物质^[27]。本试验中测得研究的不动杆菌多糖质量浓度中可溶性多糖质量浓度高于不可溶性多糖质量浓度,而在刘红艳等^[28]在对饥饿状态下粪肠球菌产多糖能力的研究中发现细菌生物膜中水溶性多糖仅作为生长所需底物被利用,而不可溶性多糖则介导细菌对介质表面的粘附和细菌间的共聚。生物膜在形成过程中起主要作用的组分有多糖、蛋白及胞外 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表示 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^[30]等仪器测定。



A、B、C、D 分别为培养 1 d、3 d、5 d、7 d 的生物膜样品。

图 4 不同培养时间不动杆菌 A3 生物膜的扫描电子显微镜图片

Fig.4 Scanning electron microscopy images of *Acinetobacter* A3 biofilms at different culture time



A~D 分别为培养 1 d、3 d、5 d、7 d 的生物膜样品。

图 5 不动杆菌 A3 生物膜在激光共聚焦显微镜下的三维图片

Fig.5 Three-dimensional images of *Acinetobacter* A3 biofilms obtained by confocal laser scanning microscopy

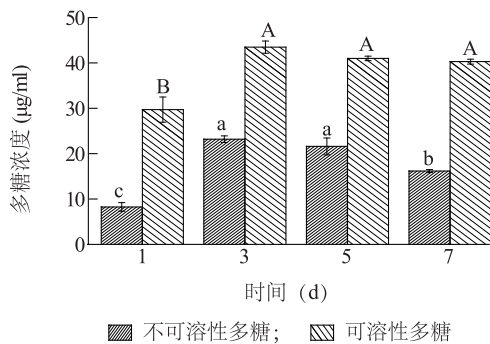


图 6 不动杆菌 A3 生物膜内可溶及不可溶性多糖质量浓度的变化

Fig.6 The changes of polysaccharide contents in *Acinetobacter* A3 biofilms

3 讨论

目前,已有大量研究发现,细菌生物膜的形成是一个动态过程,从细菌的定殖、粘附、聚集到分化成熟直至播散,共经历 5 个阶段^[31]。细菌在粘附 48 h 后能形成初期的生物膜,在 72 h 后则逐步变为成熟生物膜^[32]。本试验中通过对目标菌株不动杆菌 A3 1 d、3 d、5 d、7 d 的培养,监测其生物膜内菌数、膜微观结构、膜厚度及胞外分泌物中多糖含量发现该菌在第 3 d 时生物膜内菌数可达到最大值,随后培养 5 d 到 7 d 菌数无显著变化;对其微观结构观察发现,培养 1 d 时细菌从单层结构逐渐聚集成细胞集团,

细胞集团继续聚集成较大细胞团簇,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,在培养3 d时达到最大,7 d时膜厚度减小,部分菌体呈不完整状态。研究结果符合细菌生物膜生长的一般规律。

研究者发现胞外多糖普遍存在于各种环境下形成的生物膜中,而对于不能合成胞外多糖的突变体只能形成短暂的小菌落,难以形成成熟稳定的生物膜^[32-37]。Sutherland^[38]研究混合菌生物膜结构发现,只要存在能合成胞外多糖的微生物,就能形成成熟稳定的生物膜,且该生物膜结构中还包含大量不能合成胞外多糖的微生物菌株。综上可知,胞外多糖是大多数细菌形成成熟生物膜结构不可或缺的组成部分。本研究发现,不动杆菌 A3 生物膜在形成过程中,成膜速度较快,胞外分泌物质会在培养3 d时达到最多,将细菌紧紧包裹,7 d时胞外分泌物减少,菌体明显暴露于胞外基质外,生物膜有解离趋势。因此,针对此菌生物膜抑制的研究中可着重关注控制胞外物质的分泌,具体如何控制胞外物质分泌以及抑制生物膜的形成还需后期进一步研究。

参考文献:

- [1] 巴叶尔·阿不力克木,帕提姑·阿布都克热.肉孜阿吉巴什拜羊肉不同部位的品质特性分析[J].新疆农业科学,2012,49(9):1734-1741.
- [2] BAS P, MORAND-FEHR P. Effect of fatty acid composition of lamb fat deposits [J]. Meat Science, 2000, 64: 61-79.
- [3] 余群力,韩玲,杨勤,等.甘加藏羊肉营养成分及风味物质的测定与评价[J].营养学报,2009,31(6):609-671.
- [4] ROWE A, MACEDO F A F, VISENTAINER J V, et al. Muscle composition and fatty acid profile in lambs fattened in dry lot or pasture[J]. Meat Science, 1999, 51: 283-288.
- [5] 闫忠心,靳义超.基于氨基酸和脂肪酸的藏羊肉质量评价[J].食品工业科技,2016,37(3):351-353,363.
- [6] DRENKARD E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. Microbes and Infection, 2003, 5(13): 1213-1219.
- [7] O'TOOLE G, KAPLAN H B, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development [J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 49-79.
- [8] BRIDIER A, SANCHEZ-VIZUETE P, GUILBAUD M, et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens [J]. Food Microbiology, 2015, 45: 167-178.
- [9] 张秋勤.生鲜鸡肉中腐败菌群体感应信号分子研究[D].南京:南京农业大学,2014.
- [10] JUL M, LAHELLEC C. Evaluation of the hygienic problems related to the chilling of poultry carcasses [J]. Information on Agriculture, 1976, 22: 1-121.
- [11] 刘芳,都立辉,沙莎,等.利用16S rRNA基因同源性分析鉴定两株明串珠菌[J].中国微生态学杂志,2006,18(6):427-429.
- [12] 崔海月,刘芳,王道营,等.传统肉制品中一株植物乳杆菌的分离筛选及鉴定[J].江苏农业科学,2012,40(11):272-273.
- [13] 周文渊,张宏梅,姜燕,等.腐败牛奶中三种细菌生物被膜特性探究[J].现代食品科技,2014(1):87-90.
- [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] LUO J, DONG B, WANG K, et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model [J]. PLoS ONE, 2017, 12(4): e0176883.
- [18] 杨子贤,王洪星,易小平.激光扫描共聚焦显微镜在生物科学研究中的应用[J].热带生物学报,2013,4(1):99-104.
- [19] 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 Biointerfaces, 2016, 146: 459-467.
- [20] HENRICI A T. Studies of freshwater bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1933, 25(3): 277-287.
- [21] 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.
- [22] 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): 369-375.
- [23] 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): 124-127.
- [24] 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): 51-61.
- [25] 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.
- [26] 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.

- [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.
- [30] 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.
- [31] 李京宝,韩峰,于文功. 细菌生物膜研究技术[J].微生物学报, 2007, 47(3): 558-561.
- [32] EIGHMY T T, MARATEA D, BISHOP P L. Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components[J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 45(6): 1921-1931.
- [33] FRØLUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749-1758.
- [34] WINGENDER J, STRATHMANN M, RODE A, et al. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Methods in Enzymology, 2001, 336: 302-314.
- [35] MA LM, CONOVER M, LU H, et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix [J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(3): e1000354.
- [36] WATNICK P I, KOLTER R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm [J]. Molecular Microbiology, 1999, 34(3): 586-595.
- [37] DANESE PN, PRATT LA, KOLTER R, et al. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(12): 3593-3596.
- [38] SUTHERLAND IW. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment [J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(5): 222-227.

(责任编辑:陈海霞)