

汤 纯, 史云娇, 卞 欢, 等. 食源性克雷伯氏菌的分离鉴定与生物膜形成特性[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1216-1221.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.031

## 食源性克雷伯氏菌的分离鉴定与生物膜形成特性

汤 纯<sup>1,2</sup>, 史云娇<sup>1,2</sup>, 卞 欢<sup>1</sup>, 孙芝兰<sup>1</sup>, 刘 芳<sup>1</sup>, 朱云龙<sup>2</sup>

(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:** 为探究新鲜鸭血中的优势腐败菌及其生物膜成膜特性, 通过传统分离培养法分离获得 59 株腐败菌, 经 16S rRNA 序列鉴定发现肠杆菌是其中的优势菌, 并且克雷伯氏菌是其中的优势腐败菌。通过结晶紫染色法检测了所分离肠杆菌的生物膜形成能力, 发现 1 株克雷伯氏菌 K6 的成膜能力最强。通过分析该菌在不同培养阶段生物膜内的菌数及胞外多糖含量变化, 发现该菌在培养 3 d 和 5 d 时其生物膜内菌数和胞外多糖含量分别达到最高值, 进一步证实了克雷伯氏菌较强的成膜特性。本研究结果表明在鸭血加工过程中应该对克雷伯氏菌进行重点控制。

**关键词:** 新鲜鸭血; 克雷伯氏菌; 生物膜; 胞外多糖

**中图分类号:** TS251.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)05-1216-06

## Isolation, identification and biofilm formation characteristics of *Klebsiella* species in fresh duck blood

TANG Chun<sup>1,2</sup>, SHI Yun-jiao<sup>1,2</sup>, BIAN Huan<sup>1</sup>, SUN Zhi-lan<sup>1</sup>, LIU Fang<sup>1</sup>, ZHU Yun-long<sup>2</sup>

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

**Abstract:** To explore the composition and biofilm formation characteristics of dominant spoilage bacteria isolated from fresh duck blood, fifty-nine strains were isolated by the culture-dependent method and formation identified by 16S rRNA gene analysis. The results showed that *Klebsiella* was one of the dominant spoilage bacteria. The biofilm-forming ability of the isolated stains was determined by crystal violet staining, and it was found that one strain of *Klebsiella* K6 had the strongest biofilm-forming ability. The number of bacteria in the biofilm and content of extracellular polysaccharide reached the highest value at 3 d and 5 d, respectively. The results of this study indicated that *Klebsiella* had strong biofilm-forming ability and should be controlled during duck blood processing.

**Key words:** fresh duck blood; *Klebsiella* sp.; biofilm; exopolysaccharides

克雷伯氏菌属细菌(*Klebsiella* sp.), 是重要的条件致病菌和医源性感染菌, 广泛存在于人的肠道和呼吸道中, 在人体免疫力低下时, 会引发败血症等疾病

病<sup>[1]</sup>。经过临床病理研究和细菌学研究发现克雷伯氏菌肠道感染的可能性远大于呼吸道感染的可能性, 现已检测出多起克雷伯氏菌病例, 可能与食用地沟油等非正规渠道生产的食品有关<sup>[2]</sup>。Hamza 等<sup>[3]</sup>对埃及的 5 个肉鸡场调查发现, 在肉鸡及养殖人员的粪便、饮用水中产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯氏菌检出率较高。韩坤等<sup>[4]</sup>从水貂中分离得到 10 株肺炎克雷伯氏菌, 其中大部分菌株对多种临床常用药物表现出耐药性, 对青霉素类、氨基糖苷类、喹诺酮类、三代头孢菌素类及磺胺类抗生素的耐药性

收稿日期: 2019-01-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871866); 国家重点研发计划项目(2016YFC1300200)

作者简介: 汤 纯(1995-), 女, 江苏镇江人, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生。(E-mail) 826034822@qq.com

通讯作者: 刘 芳, (E-mail) fangliu82@163.com; 朱云龙, (E-mail) 498051574@qq.com

较高,临床治疗十分困难。同时,克雷伯氏菌属细菌能产胞外多糖<sup>[5]</sup>,有较强的生物膜形成能力。生物膜,又称为生物被膜,是微生物有组织生长的聚集体,能够在有生命、无生命的物体表面附着<sup>[6]</sup>。在自然界中,大部分微生物以生物膜的形式存在<sup>[7]</sup>,同时生物膜中大量的黏性基质形成了一个物理屏障,使抗生素和宿主的免疫系统不能对细菌产生有效的攻击<sup>[8-9]</sup>。本研究利用结晶紫染色法<sup>[10]</sup>,以在取血过程中极易被微生物污染的新鲜鸭血<sup>[11-13]</sup>为样本,定量检测鸭血中优势腐败菌的生物膜形成能力。以其中1株成膜能力最强的克雷伯氏菌 K6 为目标菌株,测定该菌 7 d 内形成的生物膜内菌数及胞外多糖含量,研究其成膜特性,为今后禽体取血加工过程中腐败微生物的控制及该菌生物膜的抑制剂开发提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

平板计数琼脂(PCA)、甘露醇氯化钠琼脂(MSA)、结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)、MRS 培养基、营养肉汤、LST、BHI 购于奥博星制造有限公司,假单胞菌琼脂基础培养基(CN 琼脂)购于山东青岛海博生物技术有限公司,96 孔细胞培养板购自美国康宁公司,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,甘油为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Epoch 微孔板分光光度计由美国伯腾仪器生产。

### 1.3 试验方法

1.3.1 鸭血液菌群组成分析 测定菌落总数的方法按照陈菲等<sup>[14-16]</sup>的方法并加以调整。2018 年 10 月前往屠宰场收集新鲜鸭血液,并加入适量抗凝剂带回。取鸭血液 25 ml 于 225 ml 无菌生理盐水中,振荡 30 min,再进行梯度稀释,每一稀释梯度取 100  $\mu$ l 涂布于各类培养基,37  $^{\circ}$ C 培养 24 h,计数。

1.3.2 优势腐败菌的分离与保种 选择方法 1.3.1 所得平板上的特征菌落分离纯化,在对应的培养基上划线 2 次,获得单菌落后,挑于 5 ml 对应的液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 振荡培养至  $OD_{600}$  值为 1 左右后收集菌液。将菌液与体积分数为 50% 的甘油按一定比例混合后放入 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.3.3 优势腐败菌的分子生物学鉴定 取 1 ml 方法 1.3.2 获得的菌液,高速离心 2~3 min 后弃上清液。用 100  $\mu$ l 无菌超纯水将沉淀重悬后,100  $^{\circ}$ C 水浴 10 min。再将其高速离心,收集上清液备用。取 2  $\mu$ l 上清液,加 20  $\mu$ l 2 $\times$ Master Mix,14  $\mu$ l 无菌超纯水,引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 与 1492R (3'-GGTTACCTTGTTACGACTT-5') 各 2  $\mu$ l<sup>[17]</sup>。16S rRNA 的 PCR 扩增,取 5  $\mu$ l 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,将电泳条带清晰的扩增产物送至上海生工生物技术有限公司测序。得到序列后利用 blast 对菌株序列进行比对,并构建系统发育树。

1.3.4 结晶紫染色法定量测定克雷伯氏菌生物膜形成能力<sup>[10]</sup> 取标准 96 微量滴定孔板,待用部分每孔加 200  $\mu$ l BHI 液体培养基备用。将 2  $\mu$ l 处于对数生长期即  $OD_{600}$  值为 1 左右的菌液<sup>[18]</sup>加入到 200  $\mu$ l 培养基中,以未经接种的 BHI 为空白对照。37  $^{\circ}$ C 培养 48 h,培养 24 h 时需更换培养基。培养完成后用酶标仪测定 630 nm 处的光密度值( $OD_1$ ),空白为  $OD_{10}$ 。将培养基轻轻吸除后,用 0.01 mol/L 无菌 PBS 洗涤 3 次,去除膜外浮游菌。放入 60  $^{\circ}$ C 烘箱干燥 20 min。每孔加入 200  $\mu$ l 0.1% 结晶紫溶液,染色 20 min。染色完成后,将结晶紫溶液吸除,用 PBS 洗涤 4 次以去除孔壁染液,再将 96 孔板放于无菌操作台内风干 30 min。每孔加 200  $\mu$ l 95% 乙醇,微振 30 min。测量 630 nm 处的光密度值( $OD_2$ ),空白为  $OD_{20}$ 。生物膜形成能力的计算公式为  $B = (OD_2 - OD_{20}) / (OD_1 - OD_{10})$ 。 $B < 0.1$  为不粘附成膜; $B \geq 0.1$  为粘附成膜; $0.1 < B \leq 1.0$  为中等强度粘附成膜; $B > 1.0$  为强粘附成膜。

1.3.5 测定克雷伯氏菌生物膜内菌数 取 24 孔细胞培养板,每孔加入 1 ml 无菌 BHI,按 1% 接入  $OD_{600}$  值为 1 左右的菌悬液<sup>[18]</sup>,37  $^{\circ}$ C 恒温静置培养,每 24 h 更换 1 次培养基,分别于第 1 d、第 3 d、第 5 d、第 7 d 取样测定菌数。轻轻吸除上层培养基,用 0.01 mol/L 无菌 PBS 洗涤 2~3 次后,加入 1 ml 无菌 PBS。用已灭菌的棉签轻轻擦拭孔壁及底部,将粘附于孔壁及底部的生物膜擦除。将孔内液体与棉签一同加入到 9 ml 无菌 PBS 中,振荡 2 min 后,梯度稀释,涂布于 BHI 培养基上,37  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 后计菌数。

1.3.6 测定克雷伯氏菌生物膜胞外多糖含量<sup>[19]</sup>

生物膜胞外多糖 (EPS, exopolysaccharides) 分为可溶性多糖和不可溶性多糖, 可用苯酚-硫酸法测定多糖含量。可溶性标准曲线的制作: 将 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的葡萄糖标准溶液按比例加入 11 支洁净试管中, 用高纯水补齐至 1.0 ml, 加入 0.5 ml 9% 苯酚溶液混匀, 再加入 5.0 ml 浓硫酸, 振荡摇匀后 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min, 凉至室温后测定 490 nm 处的吸光度值, 根据结果寻找吸光度与葡萄糖含量的关系。不可溶性多糖在测定时需加甲醛溶液, 影响显色反应, 因此需对不可溶性多糖标准曲线进行调整。不可溶性多糖标准曲线的制作: 在可溶性多糖标准曲线的基础上, 加 1.0 ml 0.85% 氯化钠溶液 (含甲醛 0.22%)。

测定第 1 d、第 3 d、第 5 d、第 7 d 的克雷伯氏菌生物膜胞外多糖含量。按方法 1.3.5 的方法培养生物膜, 用 1.0 ml 0.01 mol/L 无菌 PBS 洗涤 3~4 次后, 加入 1.0 ml 无菌 PBS, 将每孔中粘附的生物膜及孔内液体收集于 1.5 ml 无菌离心管中。4  $^{\circ}\text{C}$  5 500 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 用于测定可溶性多糖含量。用 0.85% 氯化钠溶液 (含甲醛 0.22%) 重悬沉淀, 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 后, 4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 用于测定不可溶性多糖含量。

#### 1.4 统计分析

每组试验 3 个平行, 采用 SPSS 17.0 进行数据处理。

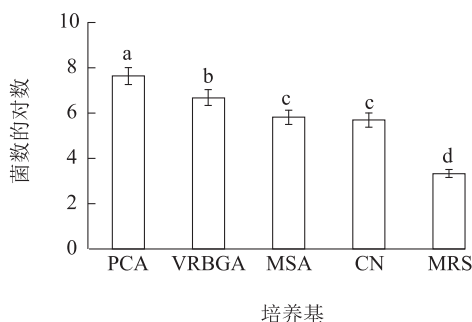
## 2 结果与分析

### 2.1 鸭血液菌落总数与菌群组成

新鲜鸭血液通过梯度稀释、平板涂布, 每组 3 个平行, PCA、VRBGA、MSA、CN、MRS 平板上所得菌数分别为  $10^{7.63}$  CFU/ml、 $10^{6.66}$  CFU/ml、 $10^{5.81}$  CFU/ml、 $10^{5.69}$  CFU/ml、 $10^{3.32}$  CFU/ml (图 1)。初步确定肠杆菌为第一优势腐败菌群。肠杆菌是一类革兰氏阴性菌, 在自然界中广泛分布, 可以在任何生产阶段污染新鲜农产品, 若这些肠杆菌拥有致病性及耐药性将对消费者构成严重威胁<sup>[20]</sup>。

### 2.2 优势腐败菌的分离与鉴定

新鲜鸭血液通过平板划线法, 根据菌株的形态, 分离得 59 株菌。其中从 PCA、VRBGA、MSA、CN、MRS 平板上分别分离得到 10 株、18 株、9 株、14 株、8 株菌。对菌株进行编号。将每株菌进行 16S rRNA 扩增, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。



不同小写字母表示不同培养基平板上生长的菌数存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

图 1 新鲜鸭血液分离培养所得细菌总数

Fig.1 Total number of bacteria in fresh duckblood

在 2 000 bp 与 1 000 bp 之间出现特异性条带即为成功扩增样品, 对获得特异性条带的 PCR 产物进行测序分析。将测序所得序列进行 NCBI Blast 分析, 选取同源性在 98% 以上的菌株序列, 构建系统进化树 (图 2)。表 1 为不同培养基分离所得 59 株菌鉴定结果, 发现 20 株肠杆菌中有 16 株克雷伯氏菌。克雷伯氏菌作为条件致病菌, 现已成为世界上严重的公共卫生危害致病菌之一, 主要攻击婴幼儿、老年人和免疫力下降人群。受污染的豆芽、蔬菜、海鲜以及肉类产品是克雷伯氏菌主要的传播载体<sup>[21]</sup>。

表 1 不同培养基分离所得菌株的鉴定结果

Table 1 The identification results of strains isolated from different media

培养基	腐败菌株
PCA	克雷伯氏菌 ( <i>Klebsiella</i> sp.) K16 气单胞菌 ( <i>Aeromonas</i> sp.) A1~A6 普罗威登斯菌 ( <i>Providencia</i> sp.) Pr1 粪肠球菌 ( <i>Enterococcus faecalis</i> ) b6 唾液乳杆菌 ( <i>Lactobacillus salivarius</i> ) L1
VRBGA	克雷伯氏菌 ( <i>Klebsiella</i> sp.) K1~K9, KL10~KL15 弗氏枸橼酸杆菌 ( <i>Citrobacter freundii</i> ) C1 柠檬酸杆菌 ( <i>Citrobacter</i> sp.) C2 变形杆菌 ( <i>Proteus</i> sp.) P1
MSA	粪肠球菌 ( <i>Enterococcus faecalis</i> ) b1~b5 棕色类香味菌 ( <i>Myroidesphaeus</i> ) M1、M2 苏云金芽孢杆菌 ( <i>Bacillus thuringiensis</i> ) B1 芽孢杆菌 ( <i>Bacillus</i> sp.) B2
CN	气单胞菌 ( <i>Aeromonas</i> sp.) A7~A20
MRS	唾液乳杆菌 ( <i>Lactobacillus salivarius</i> ) L2~L9

### 2.3 各肠杆菌生物膜形成能力

本研究中肠杆菌为第一优势腐败菌群, 将分离所得 20 株中的 19 株肠杆菌连续培养 48 h, 测定染

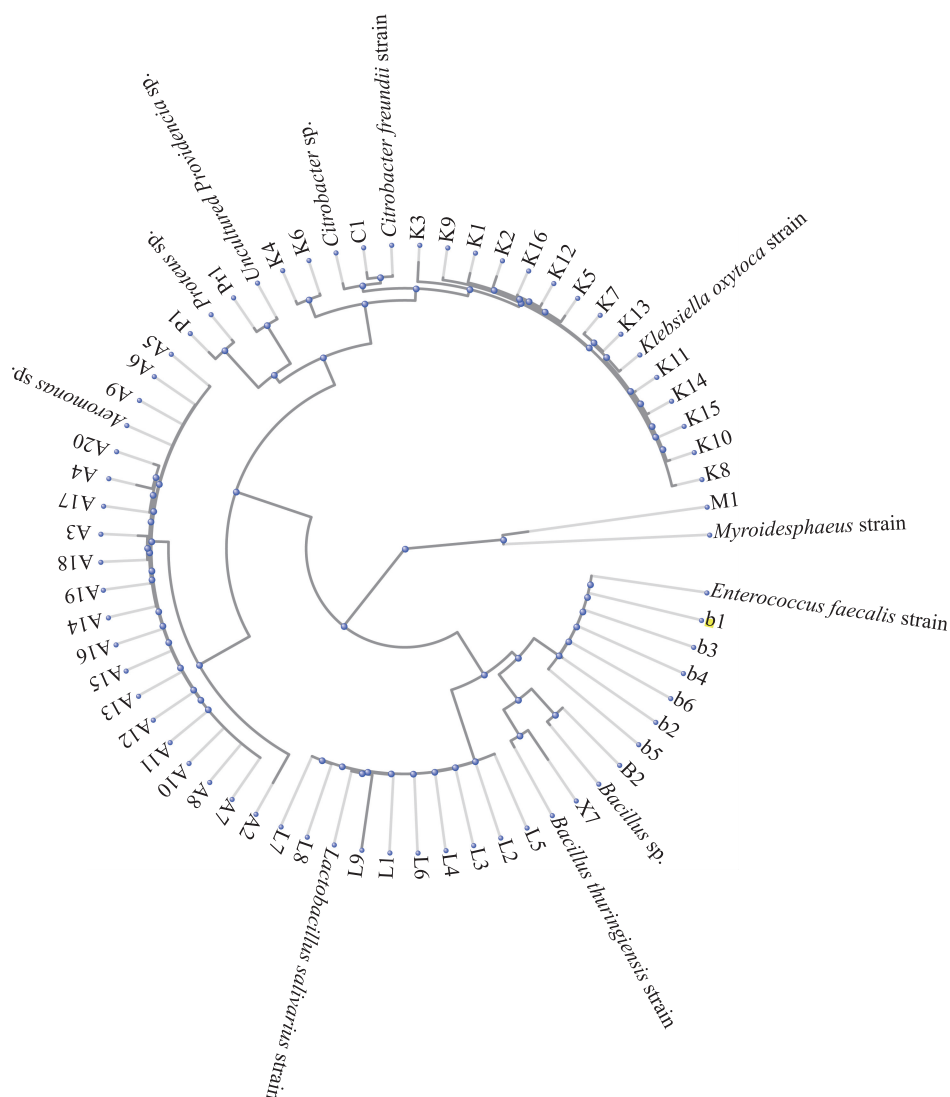


图2 基于16S rRNA基因构建的59株腐败菌的进化发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of 59 spoilage bacteria based on 16S rRNA

色前后在 630 nm 处的 OD 值。按照方法 1.3.3 的方法判断 19 株肠杆菌的生物膜形成能力,结果如图 3 所示。其中,C1、C2、P1、K1~K5、K7~K15 为中等强度粘附成膜,K6 为强粘附成膜(B 值为 1.73),说明 K6 成膜迅速且效果好(图 4)。

#### 2.4 克雷伯氏菌 K6 生物膜内菌数变化

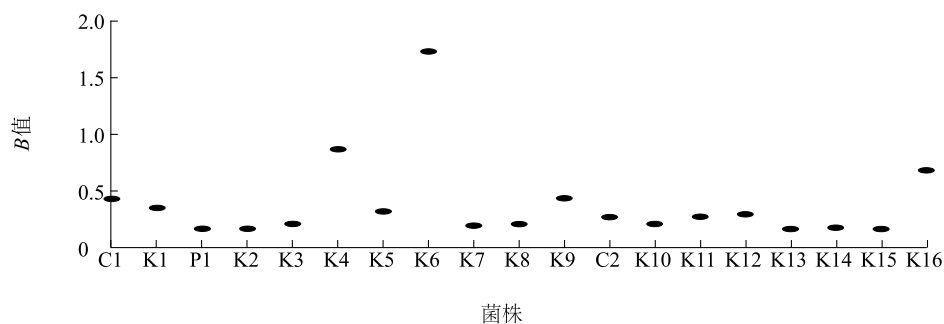
克雷伯氏菌 K6 经方法 1.3.5 中方法培养 1 d、3 d、5 d、7 d 后的菌数分别为  $10^{7.16}$  CFU/cm<sup>2</sup>、 $10^{9.32}$  CFU/cm<sup>2</sup>、 $10^{9.01}$  CFU/cm<sup>2</sup>、 $10^{9.03}$  CFU/cm<sup>2</sup>(图 5),生物膜内菌数在第 3 d 达到最大值,第 5 d 及第 7 d 菌数均在  $10^9$  CFU/cm<sup>2</sup> 以上,无显著变化( $P>0.05$ )。

#### 2.5 克雷伯氏菌 K6 胞外多糖含量变化

生物膜是将细菌包裹在内的一种复杂微生物结

构,主要含有细菌分泌的胞外多糖、蛋白质、胞外 DNA(eDNA)<sup>[22-23]</sup>。其中胞外多糖是这一复杂微生物结构的主要成分,测定胞外多糖的含量可以推测该微生物结构的变化。根据苯酚-硫酸法测定胞外多糖含量,多糖在苯酚与硫酸作用下水解并脱水,生成糠醛化合物发生显色反应,探寻吸光度值与糖浓度之间的关系。根据方法 1.3.6 制作标准曲线,其中,可溶性糖吸光度-糖浓度标准曲线为  $Y = 0.0057x + 0.0424$  ( $R^2 = 0.99$ ),不可溶性糖吸光度-糖浓度标准曲线为  $Y = 0.0047x + 0.2062$  ( $R^2 = 0.99$ )。克雷伯氏菌 K6 经 37℃ 恒温培养 1 d、3 d、5 d、7 d 后的可溶性多糖含量为 37.47 μg/ml、51.51 μg/ml、67.01 μg/ml、67.71 μg/ml,克雷伯氏菌 K6

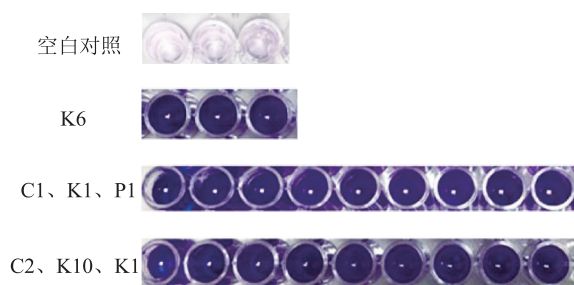




C1、C2、P1、K1~K16 见表 1。

图 3 各肠杆菌生物膜形成能力

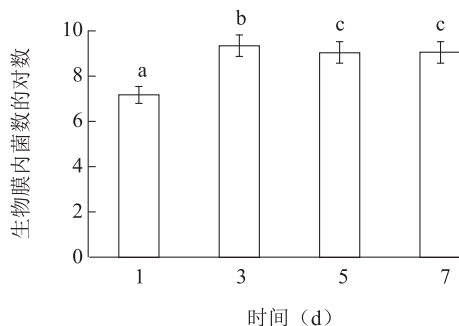
Fig.3 The biofilm-forming ability of Enterobacteriaceae



K6、C1、K1、P1、C2、K10 见表 1。

图 4 部分肠杆菌生物膜形态

Fig.4 The biofilm morphology of Enterobacteriaceae



不同小写字母表示不同培养时间生物膜内菌数存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

图 5 不同培养时间克雷伯氏菌 K6 生物膜内菌数

Fig.5 Number of bacteria in *Klebsiella* K6 biofilm at different culture time

经 3 d、5 d、7 d 恒温培养所产生的可溶性多糖含量较培养时间为 1 d 相比,均有显著增加 ( $P < 0.05$ ), 5 d 后无显著变化 ( $P > 0.05$ )。不可溶性多糖含量变化趋势与可溶性多糖含量变化趋势相一致,克雷伯氏菌 K6 经 37 °C 恒温培养 1 d、3 d、5 d、7 d 后的不可溶性多糖含量分别为 61.49  $\mu\text{g/ml}$ 、72.77  $\mu\text{g/ml}$ 、82.77  $\mu\text{g/ml}$ 、83.19  $\mu\text{g/ml}$  (图 6)。

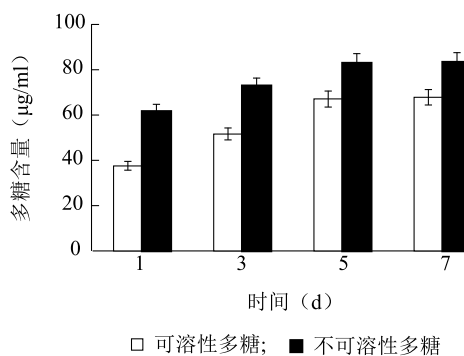


图 6 不同培养时间克雷伯氏菌 K6 生物膜内胞外多糖含量

Fig.6 Exopolysaccharides content of *Klebsiella* K6 biofilm at different culture time

胞外多糖主要由葡萄糖、半乳糖、鼠李糖及多糖或糖的衍生物组成,是微生物生长过程中的代谢产物<sup>[24-26]</sup>。其中,可溶性多糖主要是细菌代谢释放到壁外的多糖,不可溶性多糖则主要是依附在细胞壁上的荚膜中的多糖。克雷伯氏菌 K6 生成生物膜的速度较快,37 °C 恒温培养 1 d 后就可见有膜结构生成。本研究发现克雷伯氏菌 K6 所生成的生物膜中可溶性多糖含量较不可溶性多糖含量少,说明该菌粘附性较强。

### 3 结论

本研究从新鲜鸭血中分离得 59 株菌,经 16S rRNA 测序发现肠杆菌为优势菌群,其中包括 16 株克雷伯氏菌。经结晶紫染色法检测,分离所得肠杆菌均有中等或强粘附成膜能力,其中克雷伯氏菌 K6 成膜能力最强。为探究其成膜特性,对其在不同培养阶段生物膜内菌数及胞外多糖含量进行测定,发现在培养至第 3 d 和第 5 d 时膜内菌数和胞外多糖

含量分别达到最大值,进一步证明了该菌的成膜能力强。由此可见,克雷伯氏菌是鸭血中的一类优势腐败菌,并且具有很强的成膜能力,在生产中需对该类菌进行重点控制,以保证产品的安全和货架期。

## 参考文献:

- [1] 王艳君,冯永其,徐 静.东非黑白疣猴肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J].上海畜牧兽医通讯,2018(5):14-15,17.
- [2] 李军涛,姬泽薇,侯水平,等.地沟油肺炎克雷伯氏菌内毒素时间分辨检测方法的建立[J].黑龙江医学,2015,39(1):31-32.
- [3] HAMZA E, DORGHAM S M, HAMZA D A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2016, 7: 8-10.
- [4] 韩 坤,白雪,闫喜军,等.貂源肺炎克雷伯氏菌的分离及毒力和耐药性的分析[J].中国兽医科学,2018,48(8):1019-1023.
- [5] 崔娜娜,赵 萌,李 娜,等.克雷伯氏菌胞外多糖的发酵培养基优化及乳化性质[J].安徽农业科学,2015,43(21):38-42.
- [6] RAUJO B F, FERREIRA M L, CAMPOS P A, et al. Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil [J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(4):523-528.
- [7] 徐 丽,李 蓓.肺炎克雷伯菌生物膜形成机制的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2016,11(11):1056-1059.
- [8] LI W, SUN G, YU Y. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hyper-mucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(2):225-232.
- [9] BALES P M, RENKE E M, MAY S L, et al. Purification and characterization of biofilm associated exopolysaccharides from escape organisms and other pathogens [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6):e67950.
- [10] 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.
- [11] THEA K, MEGAN J O, LESLEY L D. Nanotechnology in the food sector and potential applications for the poultry industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 72:62-73.
- [12] 朱佳廷,冯 敏,刘春泉,等.鸭血粉丝汤辐照杀菌效果研究[J].江苏农业科学,2010(6):416-418.
- [13] 徐 慧,马慧娟.动物源性食品鸭血中鸭成分普通 PCR 检测方法探究[J].食品安全导刊,2018(8):60-61.
- [14] 周娟娟,王海滨.复合酶分步水解鸭血工艺的研究[J].江西农业学报,2009,21(2):82-85.
- [15] 陈 菲.鸭血豆腐加工工艺优化及品质改善技术研究[D].南京:南京农业大学,2012.
- [16] 周娟娟,王海滨,柯雪梅,等.碱性蛋白酶水解鸭血工艺条件的研究[J].粮食与饲料工业,2007(3):42-44.
- [17] PARLAPANI F F, MEZITI A, KORMAS K A, et al. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis [J]. *Food Microbiology*, 2013, 33(1):85-89.
- [18] 郭锦锦,芦 起,冯 蕾,等.青蒿琥酯对铜绿假单胞菌生物膜形成及结构的影响[J].基因组学与应用生物学,2018,37(8):3733-3739.
- [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 B Biointerfaces*, 2016, 146:459-467.
- [20] OSAILIA T M, ALABOUDIB A R, AL-QURAN H N, et al. Decontamination and survival of *Enterobacteriaceae* on shredded iceberg lettuce during storage [J]. *Food Microbiology*, 2018, 73:129-136.
- [21] RAJ KAMAL G, VANDANN, RAVINDRANATHS. Effect of radiation processing in elimination of *Klebsiella pneumoniae* from food [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 115:107-111.
- [22] 阴银燕,何凯明,吴梦星,等.细菌生物被膜拮抗剂的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,13(10):1162-1165.
- [23] 胡戌琛,王玉霞,江文欣,等.*sahH* 基因在变异链球菌 LuxS 缺陷株内表达对胞外多糖合成的影响[J].上海交通大学学报(医学版),2018,38(3):254-258.
- [24] 牛萌萌,王 坤,鹿保鑫.乳酸菌胞外多糖的研究进展[J].黑龙江八一农垦大学学报,2018,30(3):40-45,64.
- [25] 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.
- [26] FENG L, LI X F, DU G C, et al. Characterization and fouling properties of exopolysaccharide produced by *Klebsiella oxytoca* [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(13):3387-3394.

(责任编辑:陈海霞)