

金黄色葡萄球菌生物被膜在不锈钢表面的形成 及其对二氧化氯的敏感性

陈秋云¹ 韩北忠¹ 李春雷²

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083; 2. 北京出入境检验检疫局,北京 100022)

摘要 通过扫描电镜观察和测定生物被膜生长曲线的研究得出:在不锈钢表面形成的金黄色葡萄球菌生物被膜约 6 h 后进入稳定期,培养 5 d 后其细菌密度达到 3×10^6 cfu cm^{-2} ;金黄色葡萄球菌以生物被膜的形式比以浮游形式生长对二氧化氯具有更强的抵抗能力;胰酶大豆肉汤 (tryptone soy broth, TSB) 的营养物质能明显减弱二氧化氯的杀菌效果。

关键词 扫描电镜;生物被膜;金黄色葡萄球菌;不锈钢表面

中图分类号 O 175.12

文章编号 1007-4333(2004)04-0010-04

文献标识码 A

Biofilm formation by staphylococcus aureus on stainless steel surface and its sensitivity to Chloride Dioxide

Chen Qiuyun¹, Han Beizhong¹, Li Chunlei²

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100022, China)

Abstract Biofilm formation characteristics of *Staphylococcus aureus* AS 1.89 on stainless steel surface were observed with scanning electronic microscope (SEM) and measured through its growth curve. The sensitivity of biofilm cells and culture suspension to chlorine dioxide and the effect of tryptone soy broth (TSB) on their sensitivity during sterilizing were also studied. The results showed that *S. aureus* biofilm on stainless steel surface reached to stationary phase after 6 h incubation. The cell density was 3×10^6 cfu cm^{-2} at 5 d. The bacterial cells on the biofilm had higher resistance to chlorine dioxide than those in suspension. TSB obviously reduced the sterilization effect of chlorine dioxide.

Key words scanning electronic microscope; biofilm; *Staphylococcus aureus*; stainless steel surface

致病性微生物引起的食源性疾病是食品安全的最大隐患,据估计人类约 65% 的细菌性感染是由生物被膜 (biofilm) 细菌引起的^[1~3]。生物被膜是指细菌粘附于接触表面,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等,将其自身包绕其中而形成的大量细菌聚集膜样物。多糖基质通常是指多糖蛋白复合物,也包括由周边沉淀的有机物和无机物等^[4,5]。我国对生物被膜的研究主要是在医学领域,而在食品工业中仍是空白。金黄色葡萄球菌是产生食源性疾病的常见致病菌。二氧化氯是高效、速效、广谱、低毒的新型消毒剂,已在美、德、日等国代替氯气、次氯酸钠和漂白粉而用于自来水、食品、农畜品中。本试验通过

观察金黄色葡萄球菌生物被膜在不锈钢表面的形成及二氧化氯对该菌悬液和生物被膜的作用效果,旨在为食品加工中对不锈钢表面的清洗消毒提供试验数据,并为食品加工中对其他物体表面的清洗消毒提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种、主要仪器与试剂

1) 菌株。金黄色葡萄球菌 AS 1.89,购自中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心。

2) 仪器。扫描电镜 (S-570,日本 HITACHI),临界点干燥仪 (HCP-2,日本 HITACHI) 离子溅射仪

收稿日期:2004-03-04

基金项目:国家质量检验检疫总局资助项目(2003IK052)

作者简介:陈秋云,硕士研究生;韩北忠,教授,通讯作者,主要从事食品微生物学研究,E-mail: bz.han@cau.edu.cn

(IB-5,日本 EIKO)。

3) 试剂。钼酸 (Fisher 公司), 醋酸乙戊酯 (国产, 分析纯), 戊二醛 (国产, 分析纯), 硫代硫酸钠 (国产, 分析纯), 二氧化氯 (北京绿先锋环保科技有限公司) (用灭菌蒸馏水稀释, 消毒剂有效氯含量为 $1\ 000\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$)。

4) 培养基。胰酶大豆肉汤 (TSB) (北京奥博星生物技术责任有限公司), 营养琼脂 (北京奥博星生物技术责任有限公司)。

1.2 金黄色葡萄球菌生物被膜的制备及生长曲线测定

1) 不锈钢片的清洗。用丙酮浸泡不锈钢片 ($1.0\ \text{cm}\times 3.0\ \text{cm}$) 除去表面的油脂, 然后把不锈钢片放在 $5\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中浸泡 15 min, 用洗涤剂清洗, 再用蒸馏水冲洗干净。最后把不锈钢片放入 $18\ \text{mm}\times 180\ \text{mm}$ 试管中, 加入 10 mL 0.2% (质量分数) 的 TSB 培养基, 灭菌。

2) 将金黄色葡萄球菌接种在无菌 TSB 溶液中 37℃ 培养过夜。

3) 在有 0.2% TSB 溶液和不锈钢片的试管中, 加入 0.1 mL 上述金黄色葡萄球菌菌液, 连续培养 7 d 即可形成稳定生物被膜, 隔天换液。第 1 天每小时取样, 第 2 天开始每天取样, 连续 5 d 测定菌体生长量。

1.3 金黄色葡萄球菌生物被膜细菌的计数

取长有金黄色葡萄球菌生物被膜的不锈钢片, 用无菌磷酸缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS, pH 7.4) 冲洗未附着细菌, 然后用无菌棉擦去生物被膜细菌, 再把无菌棉放入 10 mL 生理盐水中强烈振荡, 用营养琼脂平板培养 48 h 计数^[6]。以这种方法观察生物被膜的细菌密度应大于 $25\ \text{cfu}\cdot\text{cm}^{-2}$ 才能有效测出细菌数。

1.4 生物被膜扫描电镜鉴定

样品经 2.5% (质量分数) 戊二醛 PBS 溶液固定过夜后, 用 PBS 溶液冲洗数遍, 再经 1% (质量分数) 的钼酸固定过夜。用 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 和 95% 体积分数系列的乙醇脱水各 15 min, 无水乙醇脱水 2 次, 每次 30 min, 经醋酸乙戊酯置换, 临界点干燥仪干燥、喷金, 经过扫描电镜观察生物被膜微观形态, 以确认生物被膜的形成。

1.5 二氧化氯对金黄色葡萄球菌菌悬液的作用

将金黄色葡萄球菌菌悬液稀释到约 $10^7\ \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 0.5 mL 稀释菌液于无菌试管中, 加入二氧

化氯溶液和无菌水, 使得有效氯最终质量浓度各为 10, 30, 50 和 $100\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ 。分别作用 5, 10, 15, 20, 25 和 30 min 后, 各取出 0.5 mL, 添加 4.5 mL 中和剂 (过量) 中和剩余的二氧化氯, 分别计数。每次实验均设对照组, 用无菌水代替二氧化氯。下同。

1.6 二氧化氯对含 TSB 溶液的金黄色葡萄球菌菌悬液的作用

取上述 0.5 mL 稀释菌液于无菌试管中, 加 TSB 至无菌试管中使得 TSB 终质量分数为 0, 0.5%, 1.0%, 2.0% 和 3.0% 系列, 在每一系列中添加二氧化氯溶液使得有效氯终质量浓度分别为 30, 50, 100, 150 和 $200\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$, 再加无菌水使得总体积为 5 mL。作用 30 min 后分别取出 0.5 mL, 添加 4.5 mL 中和剂 (过量) 中和剩余的二氧化氯, 分别计数。

1.7 二氧化氯对金黄色葡萄球菌生物被膜的作用

取连续培养 7 d 的不锈钢片, 用 PBS 冲洗未附着细菌, 将其放入无菌试管中, 添加二氧化氯溶液和无菌水, 使有效氯质量浓度分别为 10, 20, 50 和 $100\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$, 分别作用 5, 10, 15, 20, 25 和 30 min 后, 取出不锈钢片, 用无菌水冲洗数次, 然后对该不锈钢片上的生物被膜进行计数。

1.8 二氧化氯对含 TSB 溶液的金黄色葡萄球菌生物被膜的作用

再取连续培养 7 d 的不锈钢片, 用 PBS 冲洗未附着细菌, 将其放入无菌试管中, 添加 TSB 至菌悬液中使得终质量分数为 0, 0.5%, 1.0%, 2.0% 和 3.0% 系列, 在每一系列中分别添加二氧化氯溶液使得有效氯终质量浓度分别为 50, 100, 150, 200, 300, 400 和 $500\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ 。作用 30 min 后, 取出不锈钢片, 用无菌水冲洗数次, 然后对该不锈钢片上的生物被膜进行计数。

2 实验结果与分析

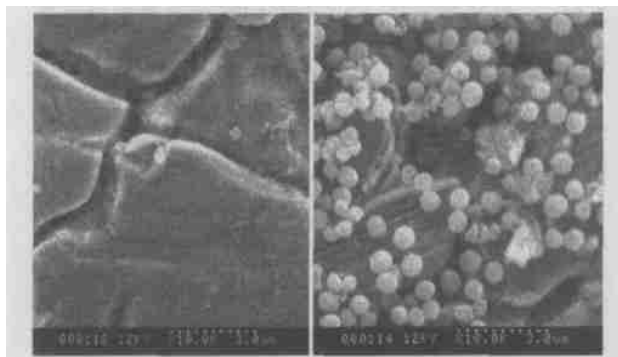
2.1 金黄色葡萄球菌生物被膜生长状况

金黄色葡萄球菌在不锈钢表面形成的生物被膜约 6 h 后进入稳定期, 之后不锈钢表面生物被膜细菌密度呈缓慢增长状态, 连续培养 5 d 后其细菌密度达到 $3\times 10^6\ \text{cfu}\ \text{cm}^{-2}$ 。

2.2 金黄色葡萄球菌生物被膜扫描电镜观察

从图 1(b) 可以看到在不锈钢表面形成的金黄色葡萄球菌生物被膜细菌呈球状, 依稀可见细菌之间的黏液丝, 借助其使细菌相互连接形成生物被膜。

由于在样品处理过程中经脱水、干燥等处理,因此可以推测生物被膜中细菌之间在未经过处理前充满了黏液。金黄色葡萄球菌易在不锈钢表面的缝隙里粘附生长,从而蔓延生长形成大片生物被膜,一般的清洗消毒很难对其产生作用。



(a) 不锈钢表面 (b) 形成的生物被膜

图1 不锈钢表面形成的金黄色葡萄球菌生物被膜($\times 10\ 000$)

Fig. 1 *S. aureus* (AS 1.89) biofilm on stainless steel ($\times 10\ 000$)

2.3 二氧化氯对金黄色葡萄球菌悬液的作用

试验结果(图2)表明,有效氯质量浓度50和100 mg L^{-1} 分别作用25和15 min,均可使杀菌率达到100%;有效氯质量浓度30 mg L^{-1} 作用30 min使杀菌率达到99.9%以上。

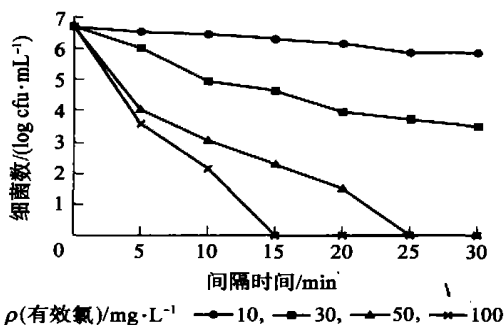


图2 二氧化氯对金黄色葡萄球菌悬液的作用

Fig. 2 Effect of chlorine dioxide on *S. aureus* suspensions

2.4 含 TSB 营养物质时二氧化氯对金黄色葡萄球菌悬液的作用

从结果(图3)看出,含一定质量分数的 TSB 对二氧化氯的杀菌作用有明显的影响。不含 TSB 时,有效氯质量浓度50 mg L^{-1} 作用30 min后,杀菌率达到100%;含0.5%质量分数 TSB 时,有效氯质量浓度100 mg L^{-1} 作用30 min后,杀菌率达到100%;而含1.0%~3.0%质量分数 TSB 时,有效氯质量浓度150 mg L^{-1} 作用30 min后,才使杀菌率达到

100%。结果显示,随着 TSB 有机物质质量分数的增加,二氧化氯对金黄色葡萄球菌生物被膜细菌的杀灭能力随之降低,两者呈负相关。由于一定质量分数的 TSB 存在,使有效氯质量浓度提高了约2倍才达到了相同的杀菌结果。由此可见,有机营养物质对杀菌剂的杀菌效果影响较大,在日常食品加工过程中,加工设备往往附有有机物质,这些有机物质的存在会大大削减杀菌剂的作用效果。

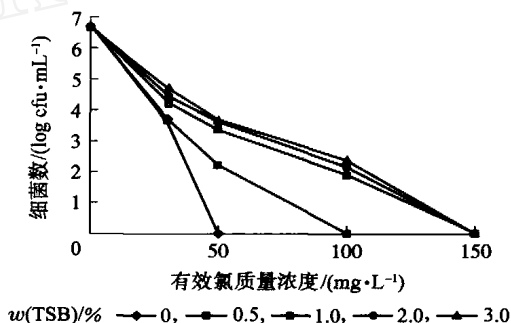


图3 含不同浓度 TSB 溶液时二氧化氯对金黄色葡萄球菌悬液的作用

Fig. 3 Effect of chlorine dioxide on *S. aureus* suspensions in different concentration of TSB after 30 min treatment

2.5 二氧化氯对金黄色葡萄球菌生物被膜的作用

结果(图4)表明,有效氯质量浓度100 mg L^{-1} 作用15 min,杀菌率达到100%;有效氯质量浓度50 mg L^{-1} 作用30 min 杀菌率达到99.8%。据研究资料表明,即使经过符合 GMP(良好操作规范)的清洗和卫生过程后,残余微生物仍然能在设备表面形成生物被膜^[7]。生物被膜中的微生物对各种化学药品(包括杀菌剂)都存在耐药性,本实验结果也证明了金黄色葡萄球菌以生物被膜形式生长比以浮游形式生长时对二氧化氯的耐药性明显提高。

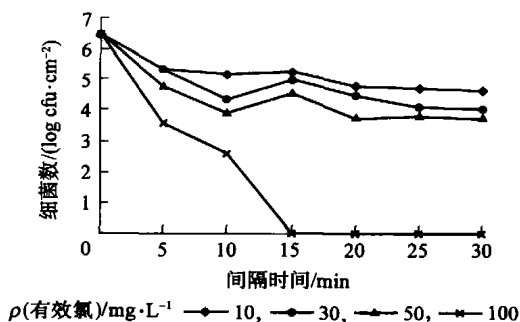


图4 二氧化氯对在不锈钢表面形成的金黄色葡萄球菌生物被膜的作用

Fig. 4 Effect of chlorine dioxide on *S. aureus* biofilm on stainless steel surface

2.6 含 TSB 营养物质时二氧化氯对金黄色葡萄球菌生物被膜的作用

含一定质量分数 TSB 对二氧化氯的杀菌作用有明显的影响(图 5)。不含 TSB 时,有效氯质量浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 30 min 后,杀菌率达到 100%;含 0.5% 质量分数 TSB 时,有效氯质量浓度 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 30 min 后,杀菌率达到 100%;含 1.0% 质量分数 TSB 时,有效氯质量浓度 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 30 min 后,杀菌率达到 100%;而 TSB 质量分数为 2.0%~3.0% 时,有效氯质量浓度 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 30 min 后,才使杀菌率达到 100%。从试验结果可以看出,由于一定质量分数 TSB 的存在,使有效氯质量浓度提高了约 3 倍才达到了相同的杀菌结果。由此可见,生物被膜的形成和有机营养物质大大提高了其耐药性,对杀菌剂的杀菌效果影响很大,建议食品加工企业在日常消毒时,一定要有效去除附于加工设备表面(尤其是死角处)的有机营养物质,选用适当的清洁剂和消毒剂,防止生物被膜形成,这样才能达到有效的消毒效果。

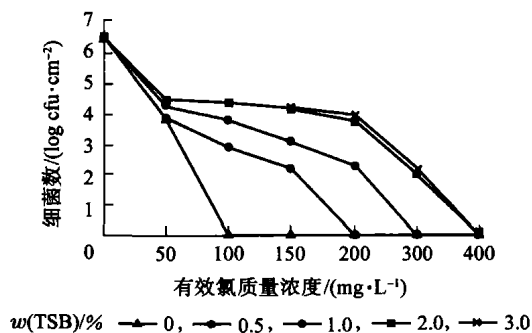


图 5 含不同浓度 TSB 溶液时二氧化氯对金黄色葡萄球菌生物被膜的作用

Fig. 5 Effect of chlorine dioxide on *S. aureus* biofilm at different concentrations of TSB after 30 min treatment

3 讨论

生物被膜的形成是细菌为适应自然环境而采取的一种生存策略,当缺少营养物质时,微生物粘附于含有机物质的加工设备表面,形成生物被膜^[8]。生物被膜深层细菌无论从形态结构还是生物生化特性均与浮游细菌不同,其增殖和生长缓慢,几乎处于静止状态,对各种清毒剂不敏感,且由于生物被膜对消毒剂的通透性差^[9],所以生物被膜细菌不易被彻底清除。从本研究中二氧化氯杀菌效果也可以看出,金黄色葡萄球菌以生物被膜形式生长比以浮游

形式生长对二氧化氯的耐药性明显提高。

研究资料表明,采用平板擦拭法对生物被膜细菌计数,发现此法可除掉不锈钢表面附着细菌的 97%,琼脂平板菌落计数法是一种最基本的菌落计数法,适用于普通实验室检测,但操作比较繁琐,不适宜大样本观察。国际上现在多使用结晶紫法和 ATP 法对生物被膜细菌进行定量分析^[10];利用银染法,显微镜技术观察检测生物被膜。目前还没有在食品加工中现场检测生物被膜的方法,研究出快速检测生物被膜的方法是我们正在进行的研究任务。关于食源性病原菌生物被膜在食品加工过程中的形成和去除是食品安全领域的一项新课题,此课题正在初步探索阶段,尚待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284: 1318 ~ 1322
- [2] Potera C. Forging a link between biofilms and disease [J]. Science, 1999, 283: 1837 ~ 1839
- [3] Chicurel M. Bacterial biofilms and infections: slimebusters [J]. Nature, 2000, 408: 284 ~ 286
- [4] Toole G O, Kaplan H B, Kolter R, et al. Biofilm formation as microbial development [J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 49 ~ 79
- [5] 王睿,陈迁,方向群,等. 尿激酶或蚓激酶与氟罗沙星联合作用对细菌生物被膜的影响 [J]. 药学报, 1999, 34 (9): 662 ~ 665
- [6] Joseph B, Otta S K, Karunasagar I, et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 64: 367 ~ 372
- [7] Dewanti R, Wong A C L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *E. coli* O157 H7 [J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26: 147 ~ 164
- [8] Pratt L A, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2: 598 ~ 603
- [9] 刘书盈,公衍文,黄萍,等. 司帕沙星对生物被膜内细菌的清除作用 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 10 (26): 390 ~ 392
- [10] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (6): 2950 ~ 2958