

肉类保藏技术(十五)

Meats Preservation(XV)



食品工业中生物被膜的形成及其控制

孙 敬¹, 董赛男²

(1. 江南大学 食品学院, 无锡 214122; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 无锡 214122)

摘 要: 生物被膜对食品工业的危害极大, 可使微生物残存增加, 加工设备无法严格清洗、消毒, 产品受到污染。本章综述了食品加工过程中生物被膜的形成特点及其控制方法, 并对近几年生物被膜的检测方法进行了介绍。

关键词: 生物被膜; 食品; 形成; 控制

Biofilm Formation and Control in Food Industry

Sun Jing¹, Dong Sainan²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Biofilm may induce great endangerment to food industry. Biofilm would increase survival rate of microorganism, therefore, it is difficult to clean and sterilize, causing food contamination. The biofilm formation and the control of biofilm in food processing were reviewed in this chapter. Also the detection methods of biofilm in recent years were introduced.

Key words: biofilm; food; formation; control

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-8123(2009)05-0059-08

0 引言

随着人们生活水平的不断提高, 目前各国都非常重视食品安全生产, 并且以立法形式来确保食品的安全。近几年来, 世界上一些国家和地区食品安全的恶性事件不断发生, 欧洲的“疯牛病”事件和“口蹄疫”、比利时“二噁英事件”、日本雪印牛奶引发的食物中毒以及美国的李斯特菌等引起的食品危害事件对世界许多国家食品行业造成了重大威胁。另外, 食品安全问题还引起国际贸易纠纷, 欧盟与北美的激素牛肉案, 使美国、加拿大每年的经济损失重大^[1]。食品安全面临着严峻的挑战, 现已成为当今世界各国普遍关注的问题之一。

根据最近召开的“中国食品安全与营养健康

论坛”会上的信息, 致病性微生物引起的食源性疾病才是食品安全的最大隐患。微生物所造成的食品生物危害频繁发生, 其主要原因是生物被膜(biofilm)的产生使微生物具有更强的对外界抵御的能力。即使在食品加工中经过严格的清洗消毒工序, 微生物还有可能逗留在食品接触表面并形成生物被膜。美国国立卫生研究所(NIH)指出, 人类细菌性感染约有65%是由生物被膜引起的^[2-3]。因此食品工业中生物被膜的形成对食品安全的威胁是不容忽视的。目前随着社会对食品安全问题的关注, 生物被膜已成为食品生产人员及研究学者广泛关注的问题。对食品中生物被膜的形成特点是有效控制生物膜污染的理论基础, 并已成为迫

收稿日期: 2008-09-23

作者简介: 孙敬, 江南大学食品学院农产品加工与贮藏在读硕士研究生。 联系电话: 13921271480 E-mail: sunjing19850525@163.com

在眉睫的问题。

1 生物被膜的概念及其结构

1.1 生物被膜的概念及其分布

生物被膜(或称细菌生物膜 Bacterial biofilm, BF),根据《Annu Rev Microbiol》等权威期刊所归纳发表的定义^[4-5],生物薄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。除了水和细菌外,生物被膜还可含有细菌分泌的大分子多聚物、吸附的营养物质和代谢产物及细菌裂解产物等,大分子多聚物如蛋白质、多糖、DNA、RNA、肽聚糖、脂和磷脂等物质。在自然界、某些工业生产环境(如食品工业和废水处理)以及人和动物的体内外,绝大多数细菌是附着在有生命或无生命物体的表面,以生物被膜方式存在,而不是以浮游(planktonic)方式存在。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,当营养物质缺乏时,微生物易粘附于含有机物质的加工设备表面,形成生物被膜。生物被膜中的细菌被厚厚的胞外多糖蛋白复合物(glycocalyx)包绕,不易获得养分和氧气,代谢率比较低,被膜深层的细菌处于休眠状态,不进行频繁的细胞分裂,往往体积较小,对杀菌剂不敏感。

细菌生物被膜广泛存在于含水或潮湿的各种物体表面,包括自来水管、工业热交换系统、下水道等。在食品工业中,食源性病原菌和腐败菌能在厂房地面和天花板、输送管道、不锈钢等材料表面形成生物被膜,成为潜在的严重污染源,可能引起食品污染^[6]。

1.2 生物被膜的结构

多年来研究者一直认为生物被膜只是由细菌和其外部包被着的胶囊状的外壳组成。近年随着激光扫描共聚焦显微镜(SCLM)的诞生,研究者得以在原位(*in situ*)观察活体细菌的生物被膜。它可以由单一或多种微生物形成,但不管是单种细菌还是多种细菌形成的生物被膜,其大体结构是一致的。生物被膜中水份含量可高达97%。除了水和细菌外,生物被膜还可含有细菌分泌的大分子多聚物、吸附的营养物质和代谢产物及细菌裂解产物等^[7]。

生物被膜的结构具有不均质性。微菌落是构成生物被膜的基本单位,微菌落之间和外部被大

量密度不均一的胞外多糖复合物包被,上面分布着充满水的管道。这些管道相互交叉形成复杂网络,起着向膜内输送养料和向外排泄废物的作用,具有原始的循环系统特征。对生长在生物被膜中的铜绿假单胞菌进行观察,生物被膜由不同片状物组成,这些结构呈特殊排列,被膜高度亲水,游离端结构由73~98%的细胞外物质和空隙组成^[8],因此可以把这种结构描述为被膜“建筑物”^[9]。另外,当细菌在增殖时可因菌种、营养、附着的表面和环境条件不同,形成疏松或致密以及厚薄不等的生物被膜结构。

1.3 生物被膜抗消毒剂能力的增加

正因为生物被膜具有如此复杂的结构,决定了它能适应多种物理和化学变化的环境。与浮游细菌(*Planktonic bacteria*)相比,生物被膜细菌对消毒剂的抗性可提高10~1000倍。生物被膜细菌抗消毒剂能力主要取决于其多细胞结构:1)与细菌生物被膜内细菌的生理状态有关(如渗透压的改变、营养浓度的微量梯度变化);2)生物被膜中的EPS起屏障作用,限制消毒剂分子向细菌细胞运输;3)生物被膜中微环境的不同可影响消毒剂的活性;4)多菌种生物被膜中各菌种的协同作用,例如产 β -内酰胺酶的菌种可保护不产此酶的菌种免受青霉素的作用^[10];5)生物被膜里高密度细胞表达与浮游细菌不同的基因,诱导产生生物被膜特异性表型^[11]。

以上多种抗消毒剂机制均是建立在生物被膜多细胞特征的基础上,细菌只有形成丛集效应才能影响消毒剂的渗透性,密集聚集的细胞只有达到一定规模,其底物和代谢产物底浓度才能浓聚,并且细菌体现其特殊代谢活力,部分菌落可分化为休眠和防护状态,休眠菌落依赖其耐药特性,在消毒剂浓度降低后重建菌落。

2 生物被膜的形成机制

生物被膜的形成是一个复杂的动态过程,一般认为生物被膜的形成过程包括细菌起始粘附、生物被膜发展和成熟三个阶段,生物被膜细菌在各阶段具有不同的生理生化特性^[12]。

2.1 细菌粘附

具有选择性和特异性接触表面的蛋白、糖蛋白和糖脂常可作为受体,而选择性地吸附特定种类的细菌。细菌粘附于表面可免于被流体带到不利于其生长的环境。细菌细胞和培养基之间开始微弱的相互反应称之为可逆附着阶段,影响可逆

附着阶段的相互作用力有范德华力、静电力和疏水作用等,在该阶段很容易被如冲洗除去;而不可逆附着阶段是形成生物被膜极为重要的阶段,排斥力抑制细胞直接接触表面,但是细胞通过鞭毛、纤毛和胞外多聚糖纤维来达到接触表面。在这个阶段,除去粘附的细胞需要较强的用力(如擦洗、打碎等)。在细菌粘附阶段,由于缺乏成熟的生物被膜结构保护,细菌的抗性不强,因此,杀菌剂的杀菌效果相对较好。

2.2 生物被膜的发展

细菌粘附到表面后,即调整其基因表达,在生长繁殖的同时分泌大量胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)。EPS可粘单个细菌而形成细菌团块,即微菌群(microcolony),大量微菌群使生物被膜加厚,因此,EPS分子的产生对生物被膜结构的发展十分重要^[13]。在此阶段,细菌对杀菌剂的抗性也有所提高。生物被膜的这些变化是细菌为适应自然环境而采取的生存策略,但正是这些特性给食品行业带来重大的食品安全问题。

2.3 生物被膜的成熟

成熟的生物被膜形成高度有组织的结构,其结构具有不均质性。它是由类似蘑菇形状的微菌落组成的,在这些微菌落之间围绕着输水通道,这些通道能偶让细菌生长需要的营养物质进入生物被膜的深层,代谢产物和排出废物也可由此排出^[14]。

3 生物被膜的鉴定方法

随着对生物被膜研究的深入,逐渐发展一系列检测方法对生物被膜进行定性、定量检测。细菌首先形成微菌落,然后逐渐被分泌的EPS包绕形成生物被膜,不易被肉眼所观察。一般通过染色等手段对其进行定性,对生物被膜性质的进一步分析,还需对生物被膜进行定量培养与检测。

3.1 定性检测方法

3.1.1 显微镜技术法^[15-16]

扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)可以用来直接观察生物被膜的形态结构,细菌形态、纤维样粘多糖细胞间质及细菌细胞间的连结清楚可辨,能够很好的用于生物被膜形态学方面的鉴定,这些检测方法为研究者广泛采用。对生物被膜进行定性检测,SEM和TEM是最直观的方法,但这两种方法由于设备昂贵并且费时,不适用于对生物被膜的常规检测。激光共聚焦扫描显微镜(CSLM)是近年发展起来的用于组织形态学研究的一项新技术,可对透光样本进行分层扫描拍摄,可用于生

物被膜立体结构的形态观察,如图1所示^[17]。但是对不透光样本无法观察。

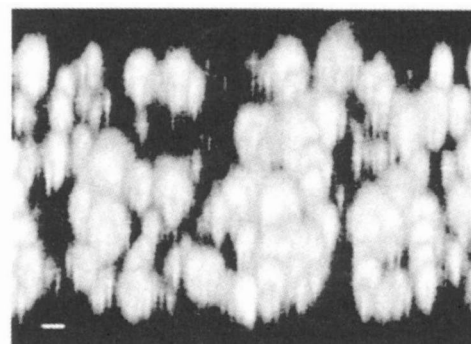


图1 激光共聚焦显微镜得到的铜绿假单胞菌FRD1生物被膜的立体图像

Fig.1 Three-dimensional view of *P. aeruginosa* FRD1 biofilm by CLSM. The strain expressing GFP was cultivated in flow cell system and the biofilm showed cell clusters like mushroom. Bar for 20μm

3.1.2 银染法^[18]

样本经AgNO₃溶液等浸泡处理,是一种用于证明多糖-蛋白复合物和细菌生物被膜存在的快速染色法。将SEM与银染法进行对比,研究表明两者具有很好的相关性。受试菌1h后就能在生物材料表面粘附形成菌落,小菌落逐渐扩大,此时应用银染法即可分辨产多糖蛋白复合物的菌株。这种方法可靠、特异、高效,可推荐用于食品中生物被膜大样本的鉴定。

3.2 定量分析^[19-21]

对生物被膜的研究依赖于一系列有效方法的开发,生物被膜作为相对新兴的研究领域,并无多少被广泛认可的标准方法。本章介绍近几年普遍使用的生物膜相关定量检测手段。

表1 生物被膜的定量检测方法

Table 1 Methods of quantitative detection of biofilm

方法	优缺点
激光活菌计数法	利用活菌对激光发射光和吸收光的特点,可定量检测各种载体生物被膜下的活菌数。
琼脂平板菌落计数法	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,误差较大,不适宜大样本观察。
MTT活菌计数法	取出细菌培养物及哇蓝试剂(MTT)于96孔平板中混匀培养,加入SDS-HCl裂解液充分裂解后,在酶标仪上读取吸光值。MTT法是一种方便、省时而且可靠的方法。

4 食品加工过程中生物被膜的形成

在食品加工中,微生物最初沉淀在一些营养丰富的固体表面上,粘附、生长、大量繁殖,形成微菌群,它可以分泌多糖蛋白复合物将自身粘附于各种物体的表面,细菌在所吸附的物体表面不断分裂就形成了生物被膜。有机聚合物的形成尤其有助于微生物的粘附、聚集。这些细菌不断进行大量的繁殖,并诱同有机或无机残留物、营养物质、以及其他一些微生物形成了生物被膜。

细菌粘附于接触表面形成生物被膜,这些表面可以是食品本身、食品接触面、非食品接触面(如墙壁、下水道等)等。实验表明,即使经过标准的清洗工序,微生物还是有可能滞留在设备表面上。在适当的条件下,这些细菌能存活相当长的时间。一些常使新鲜食品腐败的腐败菌和病原菌能粘附在不锈钢等表面上,形成生物被膜。对于腌腊风干的肉制品, *Listeria monocytogenes* 主要源于新鲜的原料肉^[22]。Nickelson 等^[23]对肉制品加工设备上的 *Listeria monocytogenes* 进行调查,法兰克福香肠(Frankfurter)包装机、滚筒、传送带、切片刀刃等设备由于很难清洗并且有较长时间处于潮湿状态,这就为生物被膜的形成提供了极好的环境。

恰当地清洗卫生设备和空气中的微生物通常是牛奶和乳制品的主要污染源。在牛奶生产线中通常运用CIP程序(CIP指就地清洗),但是CIP程序的缺点就是在设备表面上可能会有微生物的聚集,从而导致生物被膜的形成。生物被膜的存在会产生加工后的污染,缩短产品的货架期。在清洗过程中,病原菌的散播会产生空气悬浮粒。如果食品中存在病原菌,食用这些污染的产品就可能会产生极大的安全隐患。另外,如在家禽、其他肉类表面上形成的包括腐败菌和病原菌的生物被膜,会引起相当严重的交叉污染和加工后的污染。因此对于冷切肉中 *Listeria monocytogenes* 的污染,包装卫生比原料肉更为重要^[24]。

食品工业中食源性病原菌和腐败菌形成的生物被膜不仅可以通过残留、接触的方式引起各种污染,还可通过散播微生物或微生物团形成微生物气溶胶的方式污染整个生产环境。例如,经巴氏杀菌后能够存活的嗜热链球菌可附着在热交换系统中冷却部分的热交换板上,继而形成生物被膜,在后续生产中导致干酪制品的腐败,产生酵母的味道或者引起过度发酵;由啤酒灌装车间设备或

地面上的生物被膜所散播的微生物可造成啤酒灌装后的浑浊变质。

同普通浮游生长的细菌相比,生物被膜的细菌对不利条件(如加热、消毒剂等)具有更强的抵抗力,因此需要对粘附细菌及其粘附的表面之间的相互作用有细致的研究,从而采取更好的方法来抑制生物被膜的形成并除去生物被膜。

5 食品中生物薄膜形成的主要影响因素

有多种因素可影响细菌的粘附和生物被膜的形成,如接触表面的性质、培养基的种类、生长温度、pH值、细菌和接触表面的物理化学作用等。

5.1 生长环境的营养成分

各类微生物所需的营养物质各有差异,如水、碳、氮、矿质元素、生长素等均影响生物膜的形成。

Rogers 等^[25]1994年研究了八种不同管路材质对细菌菌群生长的影响,发现塑胶材质表面最易形成生物膜。Applegate 等^[26]研究表明,当钙含量增大时,较易形成生物膜,同时他们还发现当环境中半乳糖、甘露糖增多时, *Listeria monocytogenes* 生物膜形成的能力增强。Helke 等^[27]发现,牛奶与乳蛋白可以减少 *Salmonella montevideo* 与 *L. monocytogene* 的吸附能力,而乳糖则会加强它们的吸附能力。在食品车间还发现分泌胞外多糖类的微生物如假单胞菌形成的生物膜,有报告指出,缺乏营养也可能增加微生物形成生物膜的能力。

Vorst 等^[28]报道了对不同肉制品切片时, *L. monocytogene* 从刀刃迁移至意大利腊肠(salami)的数量比火鸡和大腊肠(bologna)要更多,而这两种肉制品的水分含量比意大利腊肠高,脂肪含量相对较低。这与Lin等^[29]的结论相一致。Lin认为在切片时脂肪沉积在刀刃上,这将使具有高脂肪的意大利腊肠上的 *L. monocytogene* 停留时间延长并随之增加迁移的数量。

5.2 pH值与温度

实验表明,细菌接触表面的pH值和温度能影响其粘附程度。在pH7~8的情况下, *Pseudomonas fragi* 在不锈钢表面能达到最大的粘附率,这时最有利于细胞代谢。*L. monocytogenes* 在pH8时吸附能力最强。肉汤中加入 *L. monocytogenes*,用HCl将pH调至2.5~3.0,温度为37℃,并添加胰蛋白酶(1000 u/mL),然后置于0.3%胆汁盐中60或120min^[30],实验结果表明,在强酸性条件下所测菌数明显减少。Herald和Zottola^[31]也证明了pH对 *Yersinia enterocolitica* 和 *L. monocytogene* 的影响。他们在早

期的研究中,还观察到温度的影响,*Y.enterocolitica* 在 21℃ 时能在不锈钢表面达到较好的粘附。Donlan 与 Pipes 等^[32]发现 15~25℃ 时,大多数微生物生物膜生成率较高。

5.3 微生物的种类

在适当条件下,几乎所有微生物均能够形成生物膜,如仙人掌杆菌、假单胞菌、葡萄球菌的产孢,萌发时间较短,形成生物膜速率快。由于真空包装的肉制品在低温条件或室温下 *L.monocytogenes* 能存活并生长,丹麦将其作为肉制品中最有威胁的微生物。金黄色葡萄球菌常存在于肉制品、乳制品和三明治中。葡萄牙北部地区的传统发酵肉制品中分离出 100 多种肠球菌属 (*Enterococcus spp.*)。虽然这些微生物在经过巴氏杀菌或蒸煮之后能达到“商业无菌”的目的,但是这些细菌可以通过生物被膜的形式存活并在加工过程(如切片)中交叉污染。另外,某些电镜厌氧菌产生的生物膜具有腐蚀作用。

5.4 物体表面光洁度

Stome 与 Zottola^[33]以扫描式电镜观察光洁度不同的不锈钢台面时发现,光洁度不同则生物膜形成量不同,裂缝、凹坑有助于微生物吸附而不利清洗、消毒则更易形成生物膜。

细菌在食品或接触表面的粘附会使食品腐败,在乳品工业和食品工业中,在液体介质与接触面上形成一层微生物层,包括活菌以及沉淀物。生物污垢(biofouling)会引起一系列很严重的问题,如阻碍热量的传导,增加表面流体的摩擦阻力,增加腐败率,这些都会导致能量和产品的损失。例如,热交换器里的生物被膜会增加流体阻力,降低热传递率。然而,当来自食品原料的细菌失活或被杀死,食品还是能被细菌再次污染。

5.5 接触表面

导致生物被膜形成集聚的场所包括地板、排尿管、橡胶密封塞、输送带、不锈钢等,丁纳橡胶-N 和铁氟龙密封也是生物被膜形成的重要地方。Herald 和 Zottola 曾观察 *L.monocytogenes* 在不锈钢表面的粘附并产生粘附的纤丝,病原菌可能粘附于玻璃、聚丙烯、橡胶表面上,产生生物被膜,覆盖在这些表面上的病原菌的数量主要取决于时间的长短,同时疏水作用也会影响 *L.monocytogenes* 在不同表面上的粘附,这些细菌可能是巴氏杀菌后的污染源。Bagge 等^[34]通过实验模拟系统研究在静止状态以及流动条件下, *Shewanella putrefaciens* 在食品加工表面的粘附、形成生物被膜,指出食品

加工表面的营养条件不会影响 *S.putrefaciens* 生物被膜的形成,但是影响在该表面粘附的细菌数。Kalmokoff 等人^[35]研究发现在模拟的条件下不同 *L.monocytogenes* 菌株在不锈钢表面的吸附、粘附,生物被膜的形成能力是不同的。

近期对熟食店中切片的研究表明 *L.monocytogenes* 很容易在切片的刀刃和肉块间迁移。污染了沙门氏菌的熟食店咸牛肉,使得微生物从熟食店切片转移至熟食店中其它的肉制品,导致苏格兰一带伤寒症的盛行^[36]。熟食店中的肉制品切片的 *L.monocytogenes* 相比较工厂中的切片肉要多 7 倍,其部分原因是熟食店中的切片会导致交叉污染。

6 在食品加工过程中生物被膜的控制方法

6.1 加工过程中控制生物膜形成的措施

6.1.1 设计过程控制的措施

生产车间地坪应平整且有一定的坡度保证不积水,易于清洗消毒。车间的墙裙应贴 2 米以上白色瓷砖。顶角、墙角、地角应设计为弧形,窗台为坡形,避免死角产生。车间须通风良好,应安装通风设施,保证及时排出潮湿和污浊的空气。另外,车间内应设有清洗、消毒设施,便于及时清洗、消毒。

接触食品的设备、工器具及容器应能抗腐蚀易清洗、消毒,设备表面及不锈钢工作台面应光滑、无凹坑或裂缝。原料输送管道应采用不锈钢管,不可使用 PVC 或其它管材。管道上应装有用于清洗的蒸汽管且一定距离应预留清扫口。

近几年来,一些含有杀菌剂成分的食品包装材料对抑制食品表面的病原菌和腐败菌起着非常重要的作用,这些抗菌成分转移到食品表面,防止微生物污染。为抑制生物被膜的形成而设计的一种较新方法就是吸收像杆菌素到食品接触表面,从而抑制细菌的粘附。杆菌素是一种具有抗菌特性的蛋白质。尼生素是被广泛采用的抗菌肽,能有效地抑制许多食品病原菌、腐败菌,无其孢子形成菌类。1988 年, FDA 认定尼生素是一种 GRAS (Generally recognized as safe,即一般认为安全)食品添加剂,可用于控制蜡状芽孢杆菌在成品奶酪中传播和扩散^[37]。食品接触表面吸收若干尼生素,被 *L.monocytogene* 污染的几率就会降低。有人已经成功的把杆菌素加入到食品包装材料中,抑制肉类加工中的 *L.monocytogenes*。

6.1.2 生产过程中的控制措施

在严格加工、处理卫生条件中,与肉料接触的

加工设备、器具表面的消毒和面军尤为重要。Mattila-sandholm 与 Wirtanen^[38]对清洗去膜的频率研究认为清洗间隔不应大于 8h。Schwach 与 Zottola^[39]用水洗再以次氯酸钠的方法,清洗设备表面的沙门氏菌和仙人掌杆菌,结果发现效果不佳,而用 0.5% 浓度的过氧乙酸水溶液,效果非常好。只有控制好肉类的初期微生物量,减少污染,才能够防止肉制品的变质并提高贮藏期。

6.2 几种去膜方法

6.2.1 清洗剂和消毒剂清洗

清洗时,可使用碱性氯化物、碱性或酸性消毒剂。一般而言,酸性清洁剂处理的效果较碱性清洁剂差,漂白粉是一种有效地去除生物膜的消毒剂,其次为氢氧化钠溶液、过氧乙酸溶液,另外清洁剂的温度 $>52^{\circ}\text{C}$ 比 $<40^{\circ}\text{C}$ 效果要好。肉制品中对模拟体系进行研究表明^[40],过氧化氢和过氧乙酸组成的酸性溶液比氯化物溶液更有效的去除生物被膜。使用两种或以上的消毒剂比单一使用效果更为显著。

陈秋云等^[41]研究了常用杀菌剂对生物膜的影响,发现有机营养物质对杀菌剂的杀菌效果影响较大。在食品加工过程中,食品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。因此建议食品加工企业在日常的消毒中,一定要以彻底的清洗为前提,这样才能达到有效的消毒效果。

有关文献表明,在去除生物膜时,水溶性化学品如腐蚀剂、漂白剂、碘、酚和季胺清洁剂,都不能有效渗入生物膜,在消毒剂测试中,粘附于不锈钢片上的细菌,能够耐受含 20、50 或 200×10^{-6} 氯以及 25×10^{-6} 碘的 82°C 热水,甚至在消毒剂中浸泡 5 min 还不能将细菌钝化,由此可见,膜内的微生物由于受到保护,可能没有被破坏。也许杀菌剂的用量必须达到常用强度的 10~100 倍时才能钝化生物膜内的细菌。

酶能有效的清除来自生物被膜的胞外聚合物,从而除掉生物被膜,但是去除不同细菌组成的生物被膜一般需要不同的酶。实验表明,蛋白酶、 α -淀粉酶、 β -葡聚糖酶组成的酶混合物能有效的抑制纸浆制造中集聚形成的生物被膜。酶应作为洗涤剂 and 消毒剂的有效补充,需要通过更多的实验来证明其抗生物被膜的有效性。

6.2.2 冷冻法

由于冷冻使水形成冰晶体而穿破生物被膜,此时再以机械性刷洗,即可有效去除生物被膜,

Russell^[42]提出可采用冷冻和解冻的反复交替方法去除含水生物被膜,

6.2.3 物理方法

常见的物理方法包括空气撞击、辐射处理、超声波等可用于去除生物被膜,见表 2。N.Oulahal 等^[40]研究了肉制品中生物被膜去除作用发现,使用通过超声作用,肉块中 *E.Coli* 和 *S.aureus* 的生物被膜分别减少了 49% 和 39%。而将超声作用和置于 EDTA 溶液中协同,生物被膜的去除效果更为理想。Davis 等人报道,用银、碳、铂电极通有 200~400 μA 的电流,能杀死一些革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、假丝白酵母 (*Candida albicans*) 等浮游细胞。这种致死效果主要是由于离子电渗的作用,在一个含氯化物的培养基中,如 NaCl 、 CaCl_2 、 NH_4Cl ,即使在没有抗生素或是生物毒存在的情况下,有电流流通的时候也有很强的抗菌效果。实验表明,由抗生素和低电流联合作用产生的生物电效应是控制生物被膜的一种有效方法。

表 2 去除生物被膜的物理方法

Table2 Physical methods of biofilm removal

方法	效果
空气撞击	效果非常有限
摩擦性海绵球	有效,但可能磨损具保护作用的氧化物膜造成问题
非摩擦性海绵球	对较厚的生物膜效果较差
热水与蒸汽	对高纯度的水系统有良好的效果,可避免使用或有毒的化合物,但热水系统可能会残存耐热性细菌
辐射处理	几乎无效
超声波处理	软化生物被膜,可限制性应用于一些对超声波不敏感的物质

一旦生物被膜在食品加工设备上形成,就在这一加工生产线上形成污染源。由于在食品接触表面形成的生物被膜与一般的浮游细胞相比,对消毒剂具有更强的抵抗力,在食品加工中进行普通的消毒对除去生物被膜效果不明显。因此,需要不断的发展新的方法来控制生物被膜以有效的除去生物被膜。每个由生物被膜引起的问题都需要经过详细的分析,实施有效的清洗和消毒程序,从而有利于在食品加工中提出更好的清洗和消毒方案。

7 展 望

微生物以生物被膜的形式存在,这在食品加工过程中长期被忽视,在 HACCP (危害分析和关

键控制点)体系实施过程中对生物被膜进行评估涉及较少,直到最近几年在乳品和食品加工上才有相关的报道。Sharma M 和 Anand S. K 等人对灭菌乳生产线上的每个操作单元进行了生物被膜检测,证明了在乳品加工中一些腐败菌和病原菌能形成生物被膜,从而导致最终产品的腐败和引起一些疾病的传播。因此,生物被膜的评估应该作为一个必要生物危害指标,它将对 HACCP 和 ISO:9000 认证产生重要影响,也是 HACCP 发展的重要方向。

我国食品若要进入国际市场,参与国际竞争,就要满足国际上卫生及安全的要求,就要对食品生产过程进行严加控制,防止在加工过程的污染。根据栅栏效应(Hurdles Effect)的理论,肉类食品的微生物数量是重要的栅栏因子,对于肉制品的保鲜,应首先降低菌数及其生物被膜。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,在国内此研究正在初步探索阶段,尚待深入研究。目前食源性病原菌生物被膜形态结构的研究已较为成熟,但对生物被膜形成过程机理的研究较少。而细菌的粘附性是细菌生物学特性之一,也是细菌生物被膜形成的初始条件之一。因此,对肉制品(以及食品)中生物膜的研究应集中于细菌的粘附性以及相应生物膜的形成机理。生物被膜的研究对食品加工和保藏具有十分重要的意义。我们期待,食品行业有更多的人加入到生物被膜的研究领域。

参考文献

- [1] 梁杰.食品生产企业 HACCP 体系实施指南.北京:中国农业科学技术出版社,2002: 55 - 56.
- [2] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilm:a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999,284:1318-1322.
- [3] Potera C. Forging a link between biofilms and disease [J]. Science, 1999,28(3):1837-1839.
- [4] Morris CE et al. Annu Rev Phytopathol, 2003, 41: 429-453.
- [5] Shapiro J A. Annu Rev Microbiol, 1998, 52: 81-104.
- [6] 王丽英. 生物膜的形成与控制[J]. 食品科学, 1999, 1:10-12.
- [7] Sodhi R N S, Said V P, Mittelman M W. Application of electron spectroscopy and surface modification techniques in the development of anti-microbial coatings for medical devices. J. Electron. Spectrosc, 2001, 12 1: 249-264.
- [8] Luanne H S, Paul S. Development regulation of microbial biofilms [J]. Curr. Opin. Biotech., 2002, 13(3):228-233.
- [9] 赵侠, 鲁云兰. 细菌生物被膜及其相关感染防治的进展[J]. 中国全科医学, 2003, 6: 418-420.
- [10] 李彤, 庄辉. 细菌生物膜的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(3): 343-346
- [11] Suzanne B IL. Suspensions or biofilms and other factors that effect disinfectant testing on pathogens. P h.D. thesis. Wageningen University. The Netherlands. 2002.
- [12] 刘晓琐, 施安国. 细菌生物被膜的研究现状. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(4):302-305
- [13] Sutherland W. The biofilm matrix - a mobilized dynamic microbial environment[J]. Trends Microbiol, 2001, 9:222-227.
- [14] Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms [J]. FEMS Microbiol. Rev, 2000, 4:661-671.
- [15] Luanne H S, Paul S. Development regulation of microbial biofilms. Curr. Opin. Biotech, 2002, 13(3):228-233.
- [16] 刘爱萍. 细菌生物膜与食品安全[J]. 肉类工业, 2007, 8:34-35.
- [17] 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.
- [18] 李乃静, 李胜岐, 何平等. 银染法鉴定细菌生物被膜[J]. 辽宁药物与临床, 2003, 6(1): 37-38.
- [19] Ramage G, Tunney MM, Patrick S, et al. Formation of propionibacterium acnes biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials [J]. Biomaterials, 2003, 24 (19): 3221-3227.
- [20] 张吉红, 陆承平. 嗜水气单胞菌生物被膜对其耐药性的影响[J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 498-502.
- [21] 张淑芳, 野丽丽, 白淑晶等. 蓝比色法测定药物最低抑制浓度初步研究[J]. 中国热带医学, 2001, 1(4):298-300.
- [22] Hood, S.C., & Zottola, E.A. Isolation and identification of adherent gram-negative microorganisms from four meat-processing facilities[J]. Journal of Food Protection, 1996, 60(9):1135-1138.
- [23] Nelson J. Where are Listeria likely to be found in dairy plants[J]. Dairy Food Environ San, 1990, 10(6):34-45.
- [24] Lindsey A. Keskinen, Ewen C.D. Todd, Elliot T. Ryser.

Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surfacedried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats [J].International Journal of Food Microbiology, 2008,doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.021.

- [25] Rogers,J. et al. Infuence of plumbing materials on biofim formation and growth of legionells pneumophila in potable water systems [J].Applied and Environmental Microbiology,1994,60(6):1842 - 1851.
- [26] Applegate,D.H.and Bryers,J.D.Effect of carbon and oxygen limitations and calcium comcentrating on biofilm removal processes[J].Biotechnol.Bioeng,1991,37:17 - 25.
- [27] Holah, J.T.et al. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene.Inc[J].Biodetermin,1989, 25:147 - 153.
- [28] Vorst,K.L.,Todd,E.C.D.,Ryser,E.T.Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna,and salami[J].Journal of Food Protection, 2006, 69:619 - 626.
- [29] Lin,C.,Takeuchi, K.,Zhang,L.,et al.Cross-contami- nation between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes* [J].Journal of Food Protection, 2006,69:71 - 79.
- [30] Rosario Ramalheira et al.Survival of *Listeria monocytogenes* previously isolated from traditional Portuguese fermented sausages through the gastro-intestinal tract [J].Journal of Biotechnology,2007,doi:10.1016/j.jbiotec.2007. 07.455.
- [31] HeraldP J,ZotolaE A.Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless teel surfaces at various temperatures and pH values [J].J.Food Prot,1988, 53:479 - 484.
- [32] Donlan,R.M.et al.Biofilm formation on castiron in water distribution systems[J].Water Research,1994,28960:

1497 - 1503.

- [33] Stone, L.S.and Zottla,E.A.Scanning eleccron micros- copy study of stainless-steel finishes used in food processing equipment [J].Food Technol,1985,39:110: 112 - 114.
- [34] Bagge D et al.Shewanella putrefaciens adhesion and biofilm formation on food processing surfaces [J].Appl. Environ.Microbiol,2001,67(5):2319 - 2325.
- [35] Kalmokoff ML.Absorption,attachment and biofilm for- mation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions [J].J.Appl.Microbiol,2001,91:725 - 734.
- [36] Howie,J.W.Typhoid in Aberdeen,1964[J].Journal of Applied Bacteriology,1968,31:171 - 178.
- [37] Donlan R M.Biofilm and device-associated infections[J]. Food Control,2001,12:541 - 547.
- [38] Mattila-Sandholm,T.and wirtanen,G.Biofilm formation in the industry:a review [J].Food Re views International. 1992,8(4):573 - 603.
- [39] Schwach, T.S.and Zottola,E.A.Scanning electron mi- croscopic study on some effects Of sodium hypochlorite on attachment of bacteria to stainless steel[J].J.Food Prot,1984,47:755 - 759.
- [40] N.Oulahal et al.Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent[J].Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2007,8:192 - 196.
- [41] 陈秋云,韩北忠,李春雷.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[J].中国农业大学学报, 2004, 9(4): 10 - 13.
- [42] Russell,P.The formation of biofilms [J].Milk in dustry, 1993,95(9):10 - 11.