



# 发酵乳杆菌 CSC-19 胞外粗多糖提取物抑制单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成能力的研究

林若钦<sup>1,2</sup>, 张颖<sup>1,2</sup>, 李婧怡<sup>2</sup>, 梁馨文<sup>1,2</sup>, 程健恒<sup>1,2</sup>, 胡文艳<sup>2</sup>, 吴清平<sup>2</sup>, 陈谋通<sup>2\*</sup>, 张菊梅<sup>2\*</sup>

1 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东 广州 510070

林若钦, 张颖, 李婧怡, 梁馨文, 程健恒, 胡文艳, 吴清平, 陈谋通, 张菊梅. 发酵乳杆菌 CSC-19 胞外粗多糖提取物抑制单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成能力的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 376-386.

LIN Ruoqin, ZHANG Ying, LI Jingyi, LIANG Xinwen, CHENG Jianheng, HU Wenyan, WU Qingping, CHEN Moutong, ZHANG Jumei. Extracellular crude polysaccharide of *Limosilactobacillus fermentum* CSC-19 inhibits the biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 376-386.

**摘要:**【目的】筛选能有效抑制单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)形成生物被膜的乳酸菌, 分析其活性成分并进行功能表征。【方法】采用结晶紫染色法筛选抑制 LM 形成生物被膜的不同乳酸菌提取物; 通过酸中和、蛋白酶处理及热处理, 推测抑制生物被膜活性物质以胞外多糖(extracellular crude polysaccharide, ECP)为主; 乙醇沉淀法提取目标乳酸菌分离株胞外粗多糖, 分析其抑制生物被膜形成活性和对 LM 生长的影响; 运用激光共聚焦扫描显微镜(laser confocal scanning microscopy, LCSM)和扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观察胞外粗多糖对生物被膜细胞形态和结构的影响。【结果】发酵乳杆菌 CSC-19 发酵上清液对 1516-2LM 生物被膜的抑制率为 81.7%; 经热和蛋白酶处理后, 发酵上清抑制生物被膜形成的活性未发生显著变化( $P>0.05$ ), 表明发酵上清液中抑制生物被膜形成的物质可能为胞外多糖; 在不抑制 LM 生长的条件下所提取的胞外粗多糖抑制生物被膜形成能力具有浓度依赖性。激光共聚焦扫描显微镜和扫描电子显微镜结果显示, 胞外粗多糖显著抑制了生物被膜的形成能力, 生物被膜三维、有组

资助项目: 国家自然科学基金(32072326); 广东省基础与应用基础研究基金杰出青年项目(2022B1515020068); 广东省科学院创新驱动发展能力建设专项资金项目(2021GDASYL-20210103012)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072326), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2022B1515020068), and the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2021GDASYL-20210103012).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Moutong, cmtong@hotmail.com; ZHANG Jumei, zhangjm926@126.com

Received: 2022-05-06; Accepted: 2022-07-23; Published online: 2022-08-04

织的蜂窝状结构被破坏, 仅有少量的粘附细胞分散于细胞爬片表面。【结论】发酵乳杆菌 CSC-19 胞外粗多糖能有效抑制 LM 生物被膜的形成, 有望应用于高效防控该菌污染食品。

关键词: 发酵乳杆菌; 胞外粗多糖; 单核细胞增生李斯特菌; 生物被膜; 抑制

## Extracellular crude polysaccharide of *Limosilactobacillus fermentum* CSC-19 inhibits the biofilm formation of *Listeria monocytogenes*

LIN Ruoqin<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, LI Jingyi<sup>2</sup>, LIANG Xinwen<sup>1,2</sup>, CHENG Jianheng<sup>1,2</sup>, HU Wenyan<sup>2</sup>, WU Qingping<sup>2</sup>, CHEN Moutong<sup>2\*</sup>, ZHANG Jumei<sup>2\*</sup>

1 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

**Abstract:** [Objective] To screen out the lactic acid bacteria that can inhibit the biofilm formation of *Listeria monocytogenes* (LM), identify the active component of the bacteria, and analyze the function of the active component. [Methods] We employed crystal violet staining to screen out the lactic acid bacteria of which the extract could inhibit the biofilm formation of *L. monocytogenes*. We analyzed the potential active component that inhibited biofilm formation by acid neutralization, protease treatment, and heat treatment and hypothesized that the main active component was extracellular crude polysaccharide (ECP). We then employed ethanol precipitation to extract the ECP from the lactic acid bacteria and analyzed the inhibitory activity of ECP on the biofilm formation and growth of *L. monocytogenes*. The morphology and structure of the biofilm treated with ECP were characterized by laser confocal scanning microscopy and scanning electron microscopy. [Results] The inhibition rate of *Limosilactobacillus fermentum* CSC-19 fermentation supernatant on the biofilm formation of *L. monocytogenes* 1516-2LM was 81.7%. After heat treatment and protease treatment, the activity of the fermentation supernatant did not significantly change ( $P>0.05$ ), which indicated that the active component in the fermentation supernatant may be ECP. ECP inhibited the biofilm formation of *L. monocytogenes* in a concentration-dependent manner, while it did not inhibit the growth of *L. monocytogenes*. The results of confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy showed that ECP destroyed the three-dimensional and honeycomb-structured biofilm and left only a few scattered adherent cells on the surface of the glass slide. [Conclusion] The ECP of *L. fermentum* CSC-19 inhibits the biofilm formation of *L. monocytogenes*, which is expected to be applied to the prevention and control of food contamination.

**Keywords:** *Limosilactobacillus fermentum*; extracellular crude polysaccharide; *Listeria monocytogenes*; biofilm; inhibition

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种重要的革兰氏阳性无芽孢食源性致病菌, 广泛存在于食品、土壤、水体、饲料、粪便等环境中。“粪-口”是 LM 的主要传播途径, 可引起脑膜炎、败血症、流产等临床症状<sup>[1]</sup>。虽然其发病率较低但致死率高达 20%–30%, 被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为全球四大食源性致病菌之一<sup>[2]</sup>。

生物被膜(biofilm)通常是指细菌分泌胞外聚合物将其包裹并形成一定结构的细胞集合体, 能帮助细菌抵制不利的外界因素<sup>[3-4]</sup>。前期研究表明, 生物被膜是导致 LM 持续污染食品生产过程的主要因素之一<sup>[5]</sup>。生物被膜的形成增加了 LM 对环境胁迫的抵抗力和在食品加工生产环境中持续污染的风险, 能使 LM 在食品加工环境中下持续存在数月<sup>[6-7]</sup>。LM 不仅可在不同材质(不锈钢、玻璃、聚苯乙烯等)表面形成生物被膜, 在低温下也具备形成生物被膜的能力<sup>[8]</sup>。食品加工设备不卫生和场所设计不合理, 将导致日常的清洁和消毒难以彻底清除 LM, 而早期的清洁和消毒的杀灭效果最佳, 一旦错过最佳时期将会极大增加清除的难度<sup>[9]</sup>。

近年来, 乳酸菌及其代谢产物因功能多样而备受关注。乳酸菌代谢产物(有机酸、细菌素、胞外多糖等)可以改善发酵食品风味、增加营养、延长保质期等, 被广泛应用于食品工业<sup>[10]</sup>。其中, 因胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)具备抗菌、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等作用, 逐渐受到研究者的青睐<sup>[11-12]</sup>。目前, 乳酸菌胞外多糖的研究大多聚焦在益生作用方面, 鲜有抑制生物被膜形成活性方面的研究报道。本研究旨在筛选具有抑制 LM 生物被膜形成作用的乳酸菌菌株, 并对其活性物质及抑制作用进行探究, 为寻找高效防控生物被膜污染的食品级材料提供数据基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料和仪器

#### 1.1.1 菌株来源

实验所用 LM 菌株为本实验室前期从食品样品中分离所得, 详细信息如表 1 所示, 均已进行多位点序列分型(multilocus sequence typing), 分别代表 7 种不同序列型(sequence types, STs)和克隆复合群(clonal complexes, CCs)。乳酸菌菌株来源信息如表 2 所示, 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(microflex<sup>TM</sup> LT/SH MALDI-TOF system)鉴定其种属。

表 1 单增李斯特菌受试菌株来源

Table 1 Sources of tested strains of *Listeria monocytogenes*

Strains	STs	CCs	References
1516-2LM	121	121	[13]
1132-3LM	2	2	[13]
3718-1LM	323	288	[13]
948-1LM	101	101	[13]
2919-1LM	224	224	[14]
819-1LM	155	155	[14]
869-1LM	8	8	[14]

表 2 乳酸菌菌株来源

Table 2 Sources of lactic acid bacteria

Strains	Species	Sources
SG-10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Agaricus blazei
SG-22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Agaricus blazei
YD-9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Flammulina velutipes
YD-19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Humus-rich soil
FS-18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Humus-rich soil
FS-35	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Humus-rich soil
CSC-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sour bamboo shoot
CSC-19	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Pickled cowpea
CSC-56	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Fermented black beans
63-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rice noodle rolls
CD7-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled chicken feet
CD8-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled radish
CD9-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled radish
CD10-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled cabbage
CD11-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled cauliflower
CD12-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled radish
CD13-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Pickled potato

### 1.1.2 主要试剂

TSB 肉汤、MRS 肉汤、95%乙醇、无水乙醇、PBS 缓冲液、0.22 μm 针式过滤器购自广东环凯微生物科技有限公司; 结晶紫染料、NaOH、苯酚购自广州化学试剂厂; 蛋白酶 K 购自生物工程(上海)股份有限公司; 胃蛋白酶购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶、木瓜蛋白酶购自上海麦克林生化科技有限公司; 三氯乙酸、HCl、浓硫酸购自上海国药集团化学试剂有限公司; 96 孔板购自 Costar 公司; 8 000–14 000 Da 透析袋购自上海吉至生化科技有限公司; 细胞爬片(Φ=8 mm, Φ=14 mm)购自上海卧宏生物科技有限公司; pH 试纸(pH 5.5–9.0)购自上海三爱思试剂有限公司; LIVE/DEAD BacLight™ 细菌活力检测试剂盒购自英潍捷基(上海)贸易有限公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(产品编号:P0006)购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.1.3 主要仪器

全自动酶标仪, 伯腾仪器有限公司; 全波长酶标仪, Thermo, Multiskan Sky; 冷冻离心机, Beckman Coulter 公司(Avanti J-26S XP); 台式冻干机, Labconco Free Zone, 6L); 扫描电子显微镜, Hitachi, S-3000N); 激光共聚焦扫描显微镜, ZEISS 公司, LSM700); 小型高速冷冻离心机, Beckman Coulter, Microfuge 20R); 生化培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司, SHP-250)、电热恒温鼓风干燥箱, 广东环凯微生物科技有限公司, DHG-9076A); 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂, RE-6000); 台式 pH 计, Mettler-Toledo, SevenCompact); 电热恒温水浴锅, 广东环凯微生物科技有限公司, DK-S22)。

## 1.2 乳酸菌无菌发酵上清液的制备

将 17 株乳酸菌分别接种于 MRS 平板 37 °C 培养得到单菌落, 挑取单菌落接种至 10 mL MRS 肉汤中 37 °C 静置培养过夜, 接着按 2% (体

积分数)接种量接至 MRS 肉汤中继续培养 48 h, 4 °C、13 000×g 离心 10 min 取上清, 用 0.22 μm 滤菌器过滤除菌, 得到无菌发酵上清(CFS), 最后用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.5, 得到中和发酵上清(N-CFS)后, 4 °C 保存备用。

## 1.3 抑制生物被膜形成菌株筛选及活性物质探究

### 1.3.1 菌株筛选

选取强成膜能力菌株 1516-2LM 作为筛选具有抑制生物被膜作用乳酸菌的指示菌株。采用结晶紫染色法测定生物被膜形成量<sup>[15-16]</sup>: 挑取 1516-2LM 单菌落接种至 10 mL TSB 肉汤中, 37 °C 培养过夜至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6, 按 1% (体积分数)接种量接至 TSB 肉汤, 吸取 100 μL 1516-2LM 稀释液加入 96 孔板中, 再加入 100 μL N-CFS 或同等体积的 TSB 作为实验组和阴性对照组中, 空白对照组加入 100 μL MRS 肉汤和 100 μL TSB 肉汤, 37 °C 静置培养 24 h。去除浮游菌并用 PBS 200 μL 清洗 3 次, 拍干后放入 65 °C 烘箱烘干固定 1 h, 随后加入 150 μL 0.1% (质量体积分数)的结晶紫溶液(crystal violet, CV), 37 °C 静置 30 min, 再用蒸馏水充分清洗未附着的 CV, 最后加入 200 μL 95%乙醇 4 °C 静置 20 min, 充分溶解结合在生物被膜上的 CV, 在 595 nm 处测定吸光度。每组设置 6 个平行。N-CFS 对 LM 生物被膜形成的抑制率按照公式(1)计算。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{OD_{595} \text{ control} - OD_{595} \text{ treatment}}{OD_{595} \text{ control}} \times 100 \quad (1)$$

### 1.3.2 热处理对发酵液抑制生物被膜形成活性的影响

将发酵乳杆菌 CSC-19 的 N-CFS 在 100 °C 下分别处理 10、20、30、40、50、60 min, 以未经热处理的 MRS 肉汤和 N-CFS 作为阴性对

照组和阳性对照组, 空白对照组加入 100  $\mu\text{L}$  MRS 肉汤和 100  $\mu\text{L}$  TSB 肉汤, 按照 1.3.1 的方法测定抑制生物被膜形成活性(实验 3 次生物学重复)。

### 1.3.3 蛋白酶处理对发酵液抑制生物被膜形成活性的影响

用 5 mol/L 的 HCl 将发酵乳杆菌 CSC-19 的 CFS 的 pH 分别调整为 3.0、6.0、8.0、8.0, 依次加入终浓度为 1.0 mg/mL 的胃蛋白酶(pH 3.0)、木瓜蛋白酶(pH 6.0)、胰蛋白酶(pH 8.0)和蛋白酶 K (pH 8.0), 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 2 h, 沸水浴 10 min 使蛋白酶失活; 再将 pH 调整为 6.5, 以未经蛋白酶处理的 MRS 肉汤和 N-CFS 作为阴性对照组和阳性对照组, 空白对照组加入 100  $\mu\text{L}$  MRS 肉汤和 100  $\mu\text{L}$  TSB 肉汤, 按照 1.3.1 的方法测定生物被膜抑制活性(实验 3 次生物学重复)。

### 1.3.4 胞外粗多糖的制备

参考 Jiang 等<sup>[17]</sup>报道的方法并稍作修改, 将 CFS 旋蒸浓缩至原体积的 1/3, 加入终浓度为 10% (质量体积分数)的三氯乙酸 4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜以沉淀蛋白, 然后 4  $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\times g$  离心 15 min 取上清, 缓慢加入 3 倍体积的冷无水乙醇, 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 24 h 以沉淀多糖, 再 4  $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\times g$  离心 15 min 收集沉淀, 用适量蒸馏水复溶, 最后用 8–14 kDa 透析袋透析 48 h (4  $^{\circ}\text{C}$ , 每 8 h 换一次水), 真空冷冻干燥, 获得胞外粗多糖(extracellular crude polysaccharide, ECP)提取物样品。

### 1.3.5 总糖含量、蛋白质含量的测定

以葡萄糖为标准, 采用苯酚-硫酸法测定 ECP 中的总糖含量, 按 Huang 等<sup>[18]</sup>的方法稍加修改进行测定。蛋白含量的测定根据 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(Bradford Protein Assay Kit)使用说明进行。

### 1.3.6 ECP 对生物被膜形成和细菌生长的作用

配制含 ECP 终质量浓度为 31.25、62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

和 0.125、0.25、0.5、1.0 mg/mL 的 TSB 肉汤。挑取 1516-2LM 单菌落至 10 mL TSB 肉汤中, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养至  $OD_{600}$  为 0.6; 然后按 1% (体积分数)接种量分别加入含不同浓度 ECP 的 TSB 肉汤作为初始培养液, 200  $\mu\text{L}$ /孔的体积加入 96 孔板中, 以 200  $\mu\text{L}$  TSB 肉汤为空白对照组, 采用结晶紫染色法测定生物被膜的形成量。同时, 按照相同的方法测定 7 株 LM 菌株(1516-2LM、1132-3LM、3718-1LM、2919-1LM、819-3LM、869-1LM、948-1LM)在 1.0 mg/mL ECP 作用下生物被膜的形成量(实验 3 次生物学重复)。

取含有 1.0 mg/mL ECP 的 1516-2LM 初始培养液 200  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中, 以不含 ECP 的 TSB 肉汤作为阴性对照, 使用全波长酶标仪测定 24 h 生长曲线, 分析 ECP 对 LM 生长的影响。

## 1.4 ECP 抑制生物被膜形成的表征

### 1.4.1 激光共聚焦扫描显微镜

采用激光共聚焦扫描显微镜(laser confocal scanning microscopy, LCSM)观察 LM 生物被膜形成情况。参照 Wang 等<sup>[19]</sup>的方法并略作修改, 挑取 1516-2LM 单菌落于 10 mL TSB 肉汤中培养过夜至  $OD_{600}$  为 0.6, 按 1% (体积分数)接种量分别加入含 0.25 mg/mL 和 0.125 mg/mL ECP 的 TSB 肉汤作为初始培养液, 先将无菌细胞爬片( $\Phi=14$  mm)放入 24 孔板中, 再加入 1.5 mL 初始培养液, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。去除上清液, 用 PBS 清洗爬片 3 次并转移至新的 24 孔板, 分别吸取 7.2  $\mu\text{L}$  SYTO 9 染液和 7.2  $\mu\text{L}$  PI 染液于 4.8 mL PBS 中形成混合染液, 并取 800  $\mu\text{L}$  混合染液加入 24 孔板中, 室温避光染色 25 min, 最后用 PBS 洗去多余染料, 利用激光共聚焦扫描显微镜观察并采集生物被膜图像。

### 1.4.2 扫描电子显微镜

采用扫描电子显微镜(scanning electron

microscopy, SEM)观察 LM 生物被膜形成情况: 参照朱洪日<sup>[20]</sup>的方法并做相应修改, 细胞爬片选用( $\Phi=8$  mm), 按照 1.4.1 的方法培养生物被膜。首先去除浮游菌, 用 PBS 清洗爬片 3 次并转移至新的 24 孔板, 2.5%戊二醛 4 °C 固定过夜, 然后用 PBS 间隔清洗细胞爬片 6 次, 再用不同浓度的乙醇(30%、50%、70%、90%、100%)进行梯度脱水, 最后经叔丁醇置换后进行冷冻干燥、喷金, 在扫描电子显微镜下观察生物被膜的细胞形态和结构。

### 1.5 数据分析

试验数据采用 GraphPad Prism 8.0.1、IBM SPSS STATISTICS 22 和 Excel 2016 进行统计分析和图标制作, 多组间比较用单因素方差分析,  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑制生物被膜形成乳酸菌的筛选

本研究以强成膜能力的菌株 1516-2LM 作为指示菌进行具有抑制生物被膜形成活性的乳酸菌初筛, 通过结晶紫染色法测定 17 株乳酸菌

N-CFS 的生物被膜抑制能力, 结果所有乳酸菌均表现出一定的生物被膜抑制活性(图 1)。其中以发酵乳杆菌 CSC-19 的抑制效果最为显著(81.7%), 其余 16 株乳酸菌对生物被膜的抑制率为 16.7%–62.9%。因此, 选择发酵乳杆菌 CSC-19 作为研究对象进行下一步研究。

### 2.2 抑制生物被膜形成活性物质的性质分析

发酵乳杆菌 CSC-19 菌株的 N-CFS 在经过 100 °C 处理 1 h 后, 与未经热处理的 N-CFS 相比, 抑制生物被膜作用没有发生显著变化( $P > 0.05$ ), 表明高温无法使 N-CFS 中的抑制生物被膜活性物质失去作用, 该活性物质具有良好的热稳定性(图 2A)。如图 2B 所示, 经过 1.0 mg/mL 的胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K 和木瓜蛋白酶处理后发现, 与加入 MRS 肉汤的对照组相比, 酶处理后的 N-CFS 仍具有显著的生物被膜抑制活性( $P \leq 0.05$ ); 与未经酶处理的 N-CFS 对照组相比, 酶处理后 N-CFS 的生物被膜抑制活性没有发生显著变化( $P > 0.05$ ), 说明蛋白酶处理无法使抑制生物被膜活性物质失活, 表明 N-CFS 中的活性成分可能不属于蛋白质类物质。

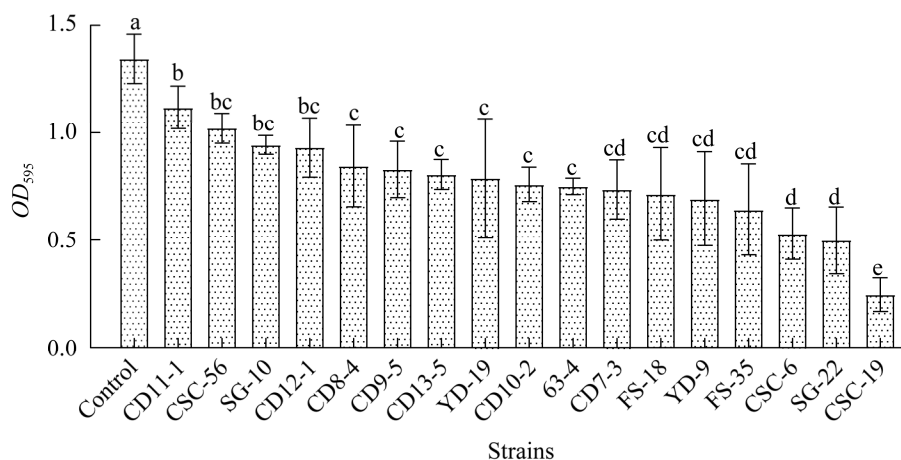


图 1 乳酸菌 N-CFS 对菌株 1516-2LM 生物被膜的抑制作用

Figure 1 The inhibition of the N-CFS of lactic acid bacteria on the biofilm formation of strain 1516-2LM. Values with different lowercase letters mean significant difference ( $P \leq 0.05$ ), while with the same lowercase letters mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

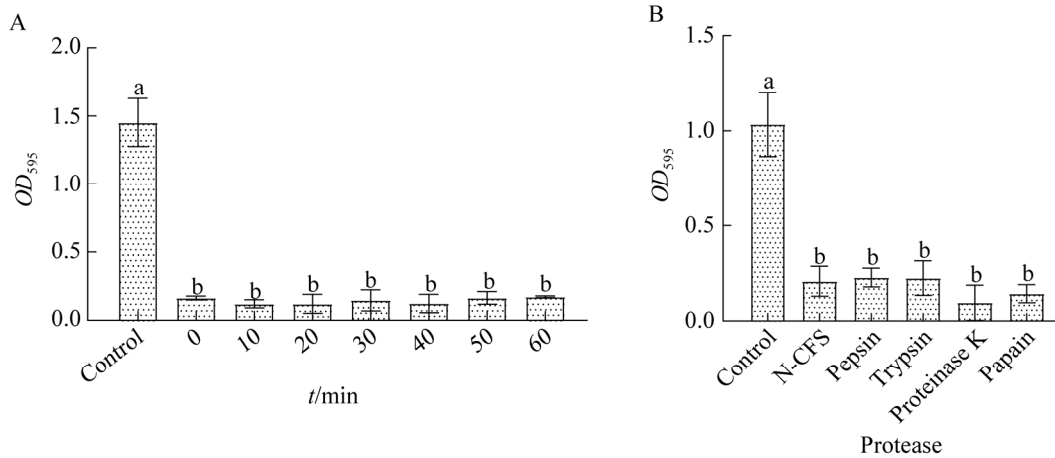


图 2 热处理(A)和蛋白酶处理(B)对 N-CFS 抑制生物被膜形成活性的影响

Figure 2 Effects of heat treatment (A) and protease treatment (B) on anti-biofilm activity of N-CFS. Values with different lowercase letters mean significant difference ( $P \leq 0.05$ ), while with the same lowercase letters mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

### 2.3 ECP 多糖含量及蛋白含量测定

在 ECP 总糖含量的测定中,葡萄糖标准曲线回归方程为  $y = 4.8691x + 0.0608$ ,  $R^2 = 0.9959$ ,具有良好的线性关系,测得总糖含量为 68.6%。在蛋白含量测定中,蛋白标准曲线为  $y = 0.4789x + 0.5634$ ,  $R^2 = 0.9939$ ,具有良好的线性关系,测得蛋白含量为 0.3%,说明 ECP 中不含或只含有极少量的蛋白质。

### 2.4 ECP 对生物被膜形成和细菌生长的作用结果

如图 3 所示,提取发酵乳杆菌 CSC-19 的 ECP 进行冻干定量分析,用不同浓度的 ECP 抑制 LM 生物被膜的形成。结果发现,62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ECP 就能显著抑制生物被膜的形成( $P \leq 0.05$ ),随着 ECP 浓度的增加,抑制作用也随之增强,说明 ECP 对生物被膜的抑制作用具有浓度依赖性。发酵乳杆菌 CSC-19 ECP 对 7 株不同 ST 型的 LM 菌株生物被膜的形成均具有抑制作用,在 1.0 mg/mL ECP 的作用下,生物被膜的形成均受到极显著的抑制( $P \leq 0.0001$ ),说明 ECP 抑制 LM 生物被膜形成具有广谱性(图 4A)。如图

4B 所示,根据 1.0 mg/mL ECP 对菌株 1516-2LM 生长曲线的影响分析可知,在开始 10 h 内,实验组和对照组都由停滞期到对数生长期末期,在培养 10 h 后,对照组的 OD 值出现下降趋势,可能是由于菌体在 96 孔板底部聚集,形成生物

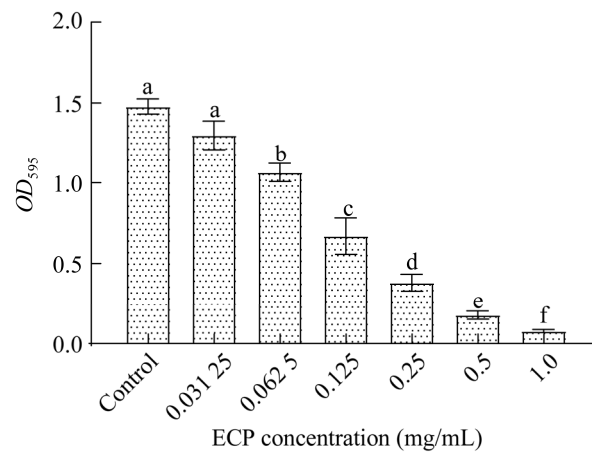


图 3 不同浓度 ECP 对菌株 1516-2LM 生物被膜形成的抑制效果

Figure 3 Inhibitory effect of ECP at different concentrations on strain 1516-2LM biofilm. Values with different lowercase letters mean significant difference ( $P \leq 0.05$ ), while with the same lowercase letters mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

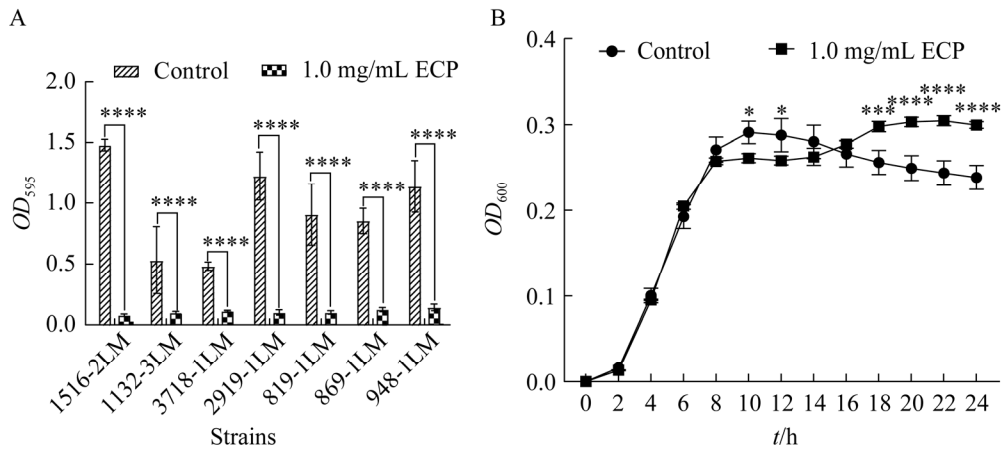


图 4 ECP 对不同 ST 型单增李斯特菌生物被膜形成及菌株 1516LM 生长的影响

Figure 4 Effects of ECP on biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* STs isolates (A) and on the growth of strain 1516LM (B). \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

被膜所致。16 h 后实验组 OD 值开始高于对照组，表明 ECP 可能对 LM 的生长有一定的促进作用。综上所述，ECP 并不抑制菌株 1516-2LM 的生长，说明 ECP 不是通过抑制生长而影响生物被膜的形成。

## 2.5 激光共聚焦扫描显微镜和扫描电子显微镜观察结果

通过激光共聚焦扫描显微镜观察对比 ECP

干预前后生物被膜的变化，生物被膜细胞经 PI/SYTO 9 染色后，活细胞呈绿色，死细胞呈红色。在对照组中，LM 生物被膜结构致密，表现出蜂窝状结构，大部分为活菌。经 ECP 处理后生物被膜数量明显减少，结构变得稀疏，死菌的数量明显增加，ECP 浓度越高，变化越明显(图 5A)。LM 在扫描电镜下呈短杆状或球

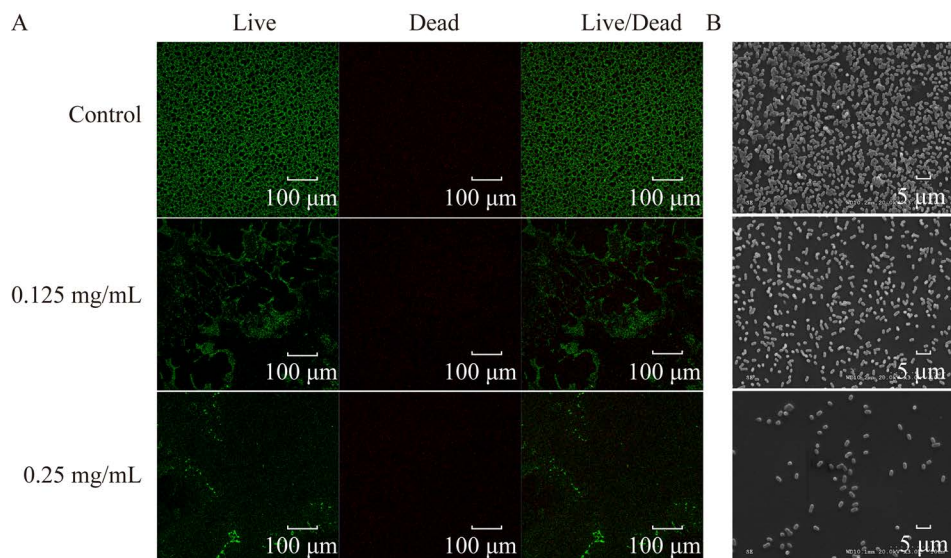


图 5 激光共聚焦扫描电子显微镜(A)和扫描电子显微镜(B)观察 ECP 作用下生物被膜的变化

Figure 5 The effects of ECP on the changes of biofilm formation characterized by confocal laser scanning microscopy (A) and scanning electron microscopy (B).



杆状, 对照组出现堆状的微菌落, 细菌在细胞爬片上的数量明显多于实验组。在 0.125 mg/mL ECP 作用下, 附着在细胞爬片上的细菌数量明显减少, 呈单一分布, 在 0.25 mg/mL ECP 的作用下, 在玻璃爬片上只能观察到零星分布的 LM, 这一结果与激光共聚焦扫描显微镜观察的结果一致(图 5B)。以上结果表明, ECP 对 LM 生物被膜的形成具有抑制作用且与浓度相关。

### 3 讨论与结论

许多细菌能够形成复杂结构的生物被膜抵抗外界压力, 对细菌的生存有重要意义。近年来, 细菌耐受消毒剂、抗生素的问题愈发严重, 而生物被膜能为细菌抵抗逆性环境提供良好的保护屏障, 加剧了问题的严重性<sup>[21]</sup>。已有研究表明, 部分乳酸菌分泌的胞外多糖具有抑制生物被膜形成的作用。宋莹龙等<sup>[22-23]</sup>发现一株 *L. plantarum*-12 的胞外多糖粗提物在 2 mg/mL 浓度下对 *Shigella flexneri* 生物被膜的抑制率达到了 53.77%, 通过进一步分离纯化, 得到了两种有效抑制生物被膜形成的胞外多糖组分。此外, Kim 等<sup>[24]</sup>发现 *L. acidophilus* A4 产生了能够抑制大肠杆菌生物膜形成的胞外多糖, 在 1 mg/mL 浓度下, 肠出血性大肠杆菌在聚苯乙烯和聚氯乙烯表面上的生物被膜分别减少 87%和 94%, 说明乳酸菌可以产生有效抑制生物膜形成活性的胞外多糖。

本研究通过对 17 株乳酸菌 CFS 进行酸中和(排除有机酸对细菌生长和生物被膜形成的影响)后发现, 所有 N-CFS 均对 LM 生物被膜的形成能力有不同程度的抑制作用; 其中发酵乳杆菌 CSC-19 的 N-CFS 抑制率为 81.7%, 抑制效果最佳。采用热处理(100 °C)和蛋白酶处理后 N-CFS 的抑制生物被膜的活性没有显著变化, 表明其中的活性物质对蛋白酶和热处理不敏

感, 推测其中的活性成分可能为多糖类物质<sup>[25]</sup>。故进一步采用乙醇沉淀法对胞外多糖进行粗提取, 同时测定其抑制生物被膜形成能力, 发现 ECP 能有效抑制生物被膜形成且具有浓度依赖性。在 ECP 中总糖含量为 68.6%, 略高于丁莉<sup>[26]</sup>所提取的胞外粗多糖中的总糖含量(63.4%), 胞外多糖粗提物中的总糖含量可能因菌株和提取方法的不同而有较大的差异。而 ECP 中蛋白含量只有 0.3%, 表明蛋白并非是 ECP 起到主要作用的活性物质。为研究在 ECP 作用下生物被膜形态的具体变化, 通过激光共聚焦扫描显微镜和扫描电子显微镜表征生物被膜形成能力, 结果发现 ECP 处理后附着在爬片上的细菌数量减少, 结构松散, 说明 ECP 抑制了 LM 生物被膜的形成, 该结果与 Jiang 等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。目前研究报道的大多数抑制生物被膜形成物质均具有一定抑菌活性, 为验证 ECP 是否通过抑制 LM 的生长抑制生物被膜的形成, 探究了在 1.0 mg/mL ECP 作用下 LM 生长曲线的变化, 结果表明 LM 生长不但没有受到抑制, 反而有轻微的促生长作用, 可能是 LM 可以降解加入的 ECP 为细菌的生长提供额外的碳源, 从而促进细菌生长。该结果表明 ECP 并非通过抑菌作用对生物被膜产生抑制, 这一结果和刘姝灵等<sup>[27]</sup>的研究结果相似。研究还发现 ECP 对不同 ST 型 LM 的生物被膜形成具有抑制活性, 能抑制不同成膜能力的菌株形成生物被膜, 表明发酵乳杆菌 CSC-19 的 ECP 抑制 LM 生物被膜形成具有广谱性。ECP 可能是通过降低 LM 的自聚集和细胞表面疏水性抑制细菌粘附、减少胞外聚合物的产量、下调生物被膜相关基因的表达等作用影响生物被膜形成能力<sup>[28]</sup>。

综上所述, 本研究通过筛选获得了一株能抑制 LM 生物被膜形成的发酵乳杆菌 CSC-19, 所分泌的 ECP 具有良好的抑制 LM 生物被膜形

成活性。但 ECP 中含有部分杂质, 还需进行活性组分的分离纯化和结构解析, 进一步探究其抑制 LM 生物被膜形成的分子机制。

## 参考文献

- [1] CAMARGO AC, MOURA A, AVILLAN J, HERMAN N, MCFARLAND AP, SREEVATSAN S, CALL DR, WOODWARD JJ, LECUIT M, NERO LA. Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(12): 4478-4487.
- [2] 闫军. 北京市售食品中单增李斯特菌致病力及比较基因组学研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2018.  
YAN J. Research of virulence and comparative genomics of *Listeria monocytogene* from market-sold food in Beijing city[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [3] BHINU VS. Insight into biofilm-associated microbial life[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2005, 10(1): 15-21.
- [4] DONLAN RM. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(9): 881-890.
- [5] van HOUTT R, MICHELS CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1117-1131.
- [6] SREY S, JAHID IK, HA SD. Biofilm formation in food industries: a food safety concern[J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 572-585.
- [7] RODRÍGUEZ-LÓPEZ P, RODRÍGUEZ-HERRERA JJ, VÁZQUEZ-SÁNCHEZ D, LÓPEZ CABO M. Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol[J]. *Foods: Basel, Switzerland*, 2018, 7(6): 85.
- [8] Bonsaglia ECR, SILVA NCC, FERNADES A Jr, ARAÚJO JP Jr, TSUNEMI MH, RALL VLM. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 386-391.
- [9] CARPENTIER B, CERF O. Review: persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 1-8.
- [10] WANG YQ, WU JT, LV MX, SHAO Z, HUNGWE M, WANG JJ, BAI XJ, XIE JL, WANG YP, GENG WT. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 612285.
- [11] SALAZAR N, GUEIMONDE M, de los REYES-GAVILÁN CG, RUAS-MADIEDO P. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(9): 1440-1453.
- [12] 赵霞, 王若愚. 细菌胞外多糖生物活性的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2016, 44(3): 67-71.  
ZHAO X, WANG RY. Progress of bioactivities for bacterial exopolysaccharides[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2016, 44(3): 67-71 (in Chinese).
- [13] CHEN MT, CHENG JH, ZHANG JM, CHEN YT, ZENG HY, XUE L, LEI T, PANG R, WU S, WU HM, ZHANG SH, WEI XH, ZHANG YX, DING Y, WU QP. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 946.
- [14] CHEN MT, CHENG JH, WU QP, ZHANG JM, CHEN YT, ZENG HY, YE QH, WU S, CAI SZ, WANG J, DING Y. Prevalence, potential virulence, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from edible mushrooms in Chinese markets[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1711.
- [15] XU ZB, LIANG YR, LIN SQ, CHEN DQ, LI B, LI L, DENG Y. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification[J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(4): 474-482.
- [16] SAKR EAE, MASSOUD MI. Impact of prebiotic potential of stevia sweeteners-sugar used as synbiotic preparation on antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant activities[J]. *LWT*, 2021, 144: 111260.
- [17] JIANG P, LI JB, HAN F, DUAN GF, LU XZ, GU YC, YU WG. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18514.
- [18] 黄承敏, 肖茜, 王蓉蓉, 刘成国, 姚慧, 周辉. 一株高产胞外多糖乳酸菌的分离鉴定及其产胞外多糖的研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(1): 80-83.  
HUANG CM, XIAO Q, WANG RR, LIU CG, YAO H,

- ZHOU H. Isolation and identification of a lactic acid bacteria with high-yield extracellular polysaccharide and their production of extracellular polysaccharide[J]. *China Brewing*, 2019, 38(1): 80-83 (in Chinese).
- [19] 王凤婷, 靳盼盼, 刘芳, 孙芝兰, 王道营, 张芳, 许晓曦, 徐为民. 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.
- WANG FT, JIN PP, LIU F, SUN ZL, WANG DY, ZHANG F, XU XX, XU WM. Biofilm formation ability of a food-borne *Enterobacter cloacae*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 34(4): 943-948 (in Chinese).
- [20] 朱洪日. 副溶血弧菌生物膜的形成特性及消毒剂的清除作用[D]. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2018.
- ZHU HR. The formation characteristics of the biofilm of *Vibrio parahaemolyticus* and the scavenging effect of disinfectants[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2018 (in Chinese)
- [21] 宋雪艳, 刘志欢, 谢翠萍, 刘莹莹, 杨永亚, 刘建华. 细菌生物被膜形成的调控机制与消除方法[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(3): 112-115.
- SONG XY, LIU ZH, XIE CP, LIU YY, YANG YY, LIU JH. Regulation mechanism and elimination method of bacterial biofilm formation[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(3): 112-115 (in Chinese).
- [22] 宋莹龙, 梁雪, 宋杏, 牟光庆, 妥彦峰, 姜淑娟, 钱方, 冯璐. *Lactobacillus plantarum*-12 胞外多糖抑制志贺氏菌生物膜形成的研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(8): 144-151.
- SONG YL, LIANG X, SONG X, MU GQ, TUO YF, JIANG SJ, QIAN F, FENG L. The study on the inhibition of *Shigella* biofilm formation by the exopolysaccharides of *Lactobacillus plantarum*-12[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(8): 144-151 (in Chinese).
- [23] SONG YL, SUN MY, FENG L, LIANG X, SONG X, MU GQ, TUO YF, JIANG SJ, QIAN F. Antibiofilm activity of *Lactobacillus plantarum* 12 exopolysaccharides against *Shigella flexneri*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(15): e00694-20.
- [24] KIM Y, OH S, KIM SH. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(2): 324-329.
- [25] RENDUELES O, TRAVIER L, LATOUR-LAMBERT P, FONTAINE T, MAGNUS J, DENAMUR E, GHIGO JM. Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides[J]. *mBio*, 2011, 2(3): e00043-e00011.
- [26] 丁莉. 一株细菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化活性研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2021.
- DING L. Isolation, purification and antioxidant activity of exopolysaccharides from a bacterial strain[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2021 (in Chinese)
- [27] 刘姝灵, 税剑, 马小华, 潘建华, 石国民, 喻容, 周前选, 龙江文, 易一行, 向延根. 肺炎克雷伯菌胞外多糖抗生物膜活性研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2021, 21(3): 303-308.
- LIU SL, SHUI J, MA XH, PAN JH, SHI GM, YU R, ZHOU QX, LONG JW, YI YH, XIANG YG. Anti-biofilm activity of *Klebsiella pneumoniae* extracellular polysaccharide[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2021, 21(3): 303-308 (in Chinese).
- [28] KIM YJ, YU HH, SONG YJ, PARK YJ, LEE NK, PAIK HD. Anti-biofilm effect of the cell-free supernatant of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* against *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Control*, 2021, 121: 107667.