

食品工业中的微生物生物膜——综合综述

康拉多·萨拉瓦, 德勒·卡拉斯科萨, 费尔南多·拉希姆, 阿丽亚娜·拉莫斯
食品科学与营养学系, 印度卡纳尔

摘要: 生物膜以微生物的形式存在并存在于表面, 会增加食品交叉污染, 从而改变食品行业的清洁和消毒动态。生物膜是微生物的结合体, 与表面不可逆地连接, 包含在细胞外聚合物基质中, 这对食品工业构成了巨大的挑战。为了避免形成生物膜, 并从可逆附着和不可逆阶段消除它们, 在这些阶段附着的微生物会提高表面附着力, 需要强力消毒剂来消除细菌附着。这篇综述论文从各个角度解决了生物膜问题, 包括食品工业中形成生物膜的病原体、生物膜的消毒剂耐受性和识别方法。由于生物膜在很大程度上是造成食品腐败和爆发的原因, 因此它们也被认为是造成食品加工设备损坏的原因。因此, 需要充分了解有利于其发育或生长的所有因素, 例如附着表面、食物基质成分、环境条件、涉及的细菌细胞和表面的静电充电。总体而言, 这项回顾性研究表明, 由于消毒剂的抗性及其生存机制, 包括细胞间信号系统、环核苷酸第二信使和生物膜相关蛋白, 生物膜对食品工业的真正威胁。

关键词: 生物膜; 食品工业; 食品微生物学; 食品安全

Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review

Conrado Saraiva, Dele Carrascosa, Fernando Raheem, Ariana Ramos
Department of Food Science and Nutrition, Karnal, India.

Abstract: Biofilms, present as microorganisms and surviving on surfaces, can increase food cross-contamination, leading to changes in the food industry's cleaning and disinfection dynamics. Biofilm is an association of microorganisms that is irreversibly linked with a surface, contained in an extracellular polymeric substance matrix, which poses a formidable challenge for food industries. To avoid biofilms from forming, and to eliminate them from reversible attachment and irreversible stages, where attached microorganisms improve surface adhesion, a strong disinfectant is required to eliminate bacterial attachments. This review paper tackles biofilm problems from all perspectives, including biofilm-forming pathogens in the food industry, disinfectant resistance of biofilm, and identification methods. As biofilms are largely responsible for food spoilage and outbreaks, they are also considered responsible for damage to food processing equipment. Hence the need to gain good knowledge about all of the factors favouring their development or growth, such as the attachment surface, food matrix components, environmental conditions, the bacterial cells involved, and electrostatic charging of surfaces. Overall, this review study shows the real threat of biofilms in the food industry due to the resistance of disinfectants and the mechanisms developed for their survival, including the intercellular signalling system, the cyclic nucleotide second messenger, and biofilm-associated proteins.

Keywords: biofilms, food industry, food microbiology, food safety

引言:

生物膜在食品卫生方面引起了相当大的兴趣。特别重要的是微生物在有利条件下附着和生长在食品 and 食品接触表面上的能力。生物膜的形成是一个动态过程, 它们的附着和生长涉及不同的机制。胞外聚合物在微生物

附着和定殖到食品接触表面中起重要作用。已采用各种技术来正确研究和理解生物膜的附着和控制。如果食品接触表面的微生物没有被完全去除, 它们可能会导致生物膜的形成并增加生物转移的潜力。因此, 各种预防和控制策略, 如卫生的工厂布局和设备设计、材料的选择、

清洁剂和消毒剂的正确使用和选择以及物理方法, 都可以适当地应用于控制食品接触表面的生物膜形成。此外, 细菌素和酶越来越重要, 并且在食品工业中具有独特的潜力, 可以有效地生物控制和去除生物膜。这些较新的生物控制策略被认为对于维持无生物膜系统、食品质量和安全非常重要。

微生物表面管理与评估和决定是否在合适的水平上发现了残留微生物种类, 以及是否去除了有害微生物。获得的结果将允许设定标准, 例如如何清洁表面和食品质量。

感官测试包括目视检查具有良好照明、闻到难闻气味以及感觉表面结痂或油腻的表面, 以立即克服可见的卫生缺陷, 而通常进行微生物评估以保证与微生物标准的一致性并进行改进卫生程序。目视检查与细菌计数不一致的事实已得到充分证明。必须针对上述所有目的对食品接触表面的卫生条件进行适当检查。然而, 用于检测和量化生物膜的各种方法之间缺乏融合确实使食品行业更难找到最有效的方法。已经制定了危害分析和关键控制点 (HACCP) 系统和良好生产规范来规范食品安全和质量。食品加工设施所采用的 HACCP 系统中没有直接提及细菌生物膜。因此, 考虑评估食品环境中的生物膜并建立适当的卫生计划的更新 HACCP 系统有望提供更清晰的污染信息, 并促进食品工业的无生物膜加工系统的生产。生物膜对食品工业的重要性和影响已在几项工作中变得清晰, 其中这些食品中的交叉污染很常见, 病原体范围广泛, 包括单核细胞增生李斯特菌、小肠结肠炎耶尔森菌、空肠弯曲杆菌、沙门氏菌属、葡萄球菌 spp.、蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌 O157: H7。

本综述的主要目的是确定食品工业中最重要的生物膜示例, 并提出可视化原位生物膜生产的方法、如何避免这种生产以及去除生物膜的方法。本研究侧重于影响食品工业的微生物生物膜, 并概述了当食品与表面接触时它们在交叉污染中的重要性。虽然详细介绍每个学科, 具体到微生物学的生物膜分离和鉴定, 不是本工作的目标, 但它提供了从食品安全和质量角度控制和根除食品工业中生物膜的技术的新知识。

一、食品加工环境中的生物膜发展

现代食品加工线是在食品接触表面上形成生物膜的合适环境, 这主要是由于制造工厂的复杂性、生产周期长、大量产品生产和大的生物膜生长区域。因此, 许多食源性细菌可能会与这些区域的接触表面结合, 这可能会增加细菌性食源性疾病的风险。例如, 据信美国 80% 的细菌感染与生物膜中的食源性病原体特别相关。

混合物种生物膜的生产非常动态, 取决于附着表面

的特征、食物基质成分、环境条件和所涉及的细菌细胞。

疏水性、静电充电、界面粗糙度和形貌等附着表面特性会影响生物膜的形成, 从而影响表面的整体卫生状况。然而, 某些参数的精确结果在特定的实验室条件下会有很大差异。一些实验表明, 细菌附着更可能发生在较粗糙的表面上, 而另一些实验则发现粗糙度与细菌附着之间没有关联。疏水性表面往往会吸引更多的细菌, 但已经测试疏水性效应的研究提出了相反的结果, 其他实验表明亲水性表面比疏水性表面能够实现更多的细菌粘附。缺乏明确结果的事实可能在于所采用的各种方法和菌株, 以及可能由于多种原因而建立的整体附着。食品工业中最受欢迎的食品接触材料是 304 型不锈钢, 因为它具有化学惰性、易于清洁并且在一系列加工温度下极耐腐蚀。鉴于其连续使用, 这种材料的地形通常会呈现裂缝和裂缝, 以保护细菌免受消毒处理和机械清洁方法的影响。

食品加工环境中的食品基质成分也会影响细菌附着; 例如, 食物垃圾, 如富含脂肪、蛋白质和碳水化合物的牛奶和肉类分泌物, 促进微生物生长和繁殖, 并有利于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的双物种生物膜发育。牛奶乳糖通过激活 LuxS 介导的群体感应系统和金黄色葡萄球菌通过细胞间多糖粘附发展来改善枯草芽孢杆菌的生物膜生产。Geobacillus spp 提高了生物膜的生产。在牛奶中会导致高浓度的游离 Ca²⁺ 和 Mg²⁺。

微生物细胞特性, 尤其是疏水性、细胞膜成分 (例如, 蛋白质和脂多糖)、附属物 (例如, 菌毛、鞭毛、菌毛) 和细菌分泌的 EPS, 在刺激生物膜产生中也起着关键作用。已经确定了不同基因型和血清型的物种或菌株之间生物膜形成能力的波动, 这揭示了不同遗传背景下生物膜形成增强的演变。类似的物种也可以在混合微生物群落中相互影响, 最终导致某些物种的共同定殖。

二、食品工业中最相关的生物膜的例子

在食品工业中, 形成生物膜的物种出现在工厂环境中, 并且可能对人类致病, 因为它们会形成生物膜结构。食品工业的加工环境, 例如木材、玻璃、不锈钢、聚乙烯、橡胶、聚丙烯等, 是这些病原体的人工基质 [37, 38]。在考虑清洁和消毒过程时, 加工环境中食品上细菌生长形式的特征涉及不同的行为。当必须决定正确的策略时, 控制食品工业中的生物膜形成可能会很困难。

蜡状芽孢杆菌

蜡状芽孢杆菌是一种革兰氏阳性厌氧或兼性厌氧芽孢细菌, 可以在各种温度 (4℃ -50℃) 的各种环境中生长。它耐化学品、热处理和辐射。B. cereus 是一种经常与食物和食品 (如大米、乳制品、蔬菜和肉类) 分离

的土壤居民。它分泌的毒素会导致人类生病和腹泻症状。

B. cereus 负责在食品接触表面形成生物膜, 例如不锈钢管、传送带和储罐。它还可以形成漂浮或浸没的生物膜, 可以在生物膜中分泌大量的细菌素、代谢物、表面活性剂以及酶, 例如蛋白酶和脂肪酶, 从而影响食物的感官品质。细菌鞭毛的运动性提供了进入合适的生物膜形成表面的途径, 并且是生物膜在非定植表面上传播所必需的。然而, 尚未发现蜡状芽孢杆菌鞭毛直接参与对玻璃表面的粘附, 但可以通过它们的运动性在生物膜形成中发挥关键作用。

空肠弯曲杆菌

弯曲杆菌属, 主要是空肠弯曲菌, 是革兰氏阴性螺旋、杆状或弯曲的嗜热和双极鞭毛运动细菌。空肠弯曲菌, 也称为厌氧菌, 可以在微需氧 (5% O₂ 和 10% CO₂) 和需氧 (20% O₂) 条件下形成生物膜。尽管它是一种挑剔的有机体, 但空肠弯曲杆菌可以在到达人类宿主之前在禽类肠道外存活。一系列环境因素引发了生物膜的形成, 然后受到一系列内在因素的影响。欧盟 One Health 2018 年人畜共患病报告将空肠弯曲菌归类为机会性病原体, 被认为是大多数细菌性胃肠炎病例的病原体, 并被认为是食用动物和家禽的常见共生体, 尤其是火鸡和母鸡。当食品或水的制备和加工区域受到污染时, 例如未经巴氏消毒的牛奶, 空肠弯曲菌通过感染和定植胃肠道到达人类宿主, 从而引起疾病。

肠出血性大肠杆菌 (EHEC)

大肠杆菌是革兰氏阴性杆状细菌。大多数大肠杆菌菌株构成人体肠道微生物群的一部分, 不会造成健康问题。然而, 大肠杆菌的毒力类型包括产肠毒素 (ETEC)、侵入肠 (EIEC)、致病肠 (EPEC) 和产维罗细胞毒素 (VTEC)。O157: H7 EHEC 是美国最常见的与人类 EHEC 感染相关的血清型。大肠杆菌在自然环境中的广泛传播在很大程度上是由于它能够作为生物膜生长。值得考虑的是, 几种大肠杆菌菌株可能导致人类疾病, 而肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 菌株与食品工业最相关。EHEC 血清型 O157: H7 是导致全球血性腹泻暴发和溶血性尿毒症综合征 (HUS) 的人类病原体。它们可以通过生牛奶、饮用水或新鲜肉类、水果和蔬菜传播; 例如, 甜瓜、西红柿、欧芹、香菜、菠菜、生菜等。

当鞭毛在附着后丢失并且细菌开始产生有助于赋予细菌更好地抵抗消毒剂的细胞外聚合物 (EPS) 时, 大肠杆菌可以利用菌毛、鞭毛和膜蛋白启动对无生命表面的附着。有报道指出, 虽然 EHEC 可以在不同的食品工业表面形成生物膜, 但由于抗生素治疗往往会增加溶血性尿毒症和肾功能衰竭的风险, 因此既没有预防 EHEC

生物膜形成的有效手段, 也没有有效治疗其感染的方法。

李斯特菌

单核细胞增生李斯特菌是一种革兰氏阳性细菌, 是一种普遍存在的食源性病原体, 可出现在土壤、食物和水中。它的摄入会导致孕妇流产, 以及老年人和儿童的其他严重并发症。病原体可以传播到几种食物类型, 例如乳制品、海鲜、肉类、水果、即食食品、冰淇淋、软奶酪、未经高温消毒的牛奶、冷冻蔬菜、蜜饯苹果和家禽, 但它不是已知对巴氏杀菌处理有抵抗力。病原菌在低温条件下增殖, 能形成纯培养生物膜或多菌种生物膜生长。单核细胞增生李斯特菌可以在酸性条件下存活很长时间, 并且可以形成无氧生长的生物膜。根据存在的竞争微生物, 其在生物膜中的数量可能会上升或下降。

鉴于菌毛、鞭毛和膜蛋白的存在, 流行的单核细胞增生李斯特菌菌株在食品加工环境中具有良好的粘附能力。

三、生物膜控制和消除

众所周知, 在与浮游条件不同的非常特殊的条件下, 生物膜细菌在基因转录和生长速率方面呈现出具有基因型的独特表型。生物膜能够粘附在具有不同生物和非生物成分的各种表面上, 包括人体组织和医疗器械。一旦形成生物膜, 它们就会成为主要威胁, 因为它们会导致传染病和经济损失。在 1940 年代, 几位作者对海洋微生物和海水的生物膜演化和表面关系进行了进一步的研究。然而, 鉴于电子显微镜的结合取得了显著进展, 它允许在比光学显微镜高得多的放大倍率下进行高分辨率显微术。事实上, 与生物膜消除关系的最有启发性的发现是对其结构、周围基质材料的描述, 以及包裹在这些生物膜中的细胞是多糖, 正如特殊染色所揭示的那样。毫无疑问, 自 1973 年以来, 消毒剂已被证明在对抗生物膜方面更有效, 而 Characklis (1973) 对氯等消毒剂表现出显著的持久性和抗性。

食品工业中的生物膜消除

已经在食品工业和医院环境中研究了生物膜的形成。也许, 在所进行的研究中, 医院在消除生物膜方面取得了更大的成功, 这要归功于在医疗环境中更容易的应用和特殊的表面成分 (抗生物膜活性), 例如植入物、假肢、工具和手术室的表面。

迄今为止, 已经做出了许多努力来减少食品工业表面的生物膜形成, 但这些工作主要基于具有不同功效的新型消毒剂。这些结果已根据初始表面附着、发展群体结构和生态系统以及分离 [75] 的特定机制得到了不同的结果。

如今, 消毒剂是消除生物膜的最佳盟友。然而, 其他研究领域, 例如防止细菌粘附的材料表面组成和开发噬菌体以对抗形成生物膜的细菌, 已经取得了良好的成果。

毫无疑问, 大多数研究工作都集中在细菌生物膜上, 而没有讨论丝状真菌负责生物膜形成的假设。几位作者[92, 93]支持这一理论, 其中烟曲霉的存在被认为是由生物膜引起的。在这种情况下, 细菌学和丝状真菌生物膜的显着相似性是基于形态变化、细胞外聚合物基质的存在、差异基因表达以及与弥散或松散相关(浮游)菌落相比对抗真菌药物的不同敏感性。

在我们继续解释可能影响细菌粘附和生物膜形成的几个因素之前, 我们应该牢记食品行业的卫生设计。为了防止微生物进入食品生产, 工厂和使用的卫生设备应设计成限制微生物进入。无菌设备必须与微生物和外来微粒隔离。为了防止微生物生长, 设备的设计应防止微生物可以藏匿和生长的任何区域, 以及间隙、缝隙和死区。这在生产过程中也很重要, 因为微生物可以在有利的条件下快速生长。

根据这样的前提, 食品公司有能力和应用创新来设计行业及其设备。在美国和欧盟(EU), 这一领域的监管趋势与其说是政府监管机构的指挥和控制, 不如说是食品行业的自主决定。特别是, 危害分析和关键控制点(HACCP)系统提供了用要实现的总体目标代替详细监管要求的技能。美国食品药品监督管理局(FDA)和美国农业部(USDA)食品安全检验局(FSIS)共同承担监管美国食品安全的主要责任。一个例子是对设备和过程控制的建议:“食品接触表面的接缝应平滑粘合或保持, 以减少食品颗粒、污垢和有机物的积累, 从而最大限度地减少微生物生长的机会”。

欧盟(EU)法规文件包括 EC 法规编号。852/2004(食品卫生)和 EC 法规编号。853/2004(动物源性食品的具体规则), 要求食品制造商通过 HACCP 系统控制食品安全风险。

简而言之, 避免生物膜形成的清洁和消毒程序(CDP)的执行应从适当设计设备、表面和装置的卫生开始。今天, CDP 已被证明是对抗生物膜的有效措施。

与细菌有关的因素

与表面或细菌相关的几个因素会影响浮游阶段和生物膜演化的粘附, 例如:

表面:

-表面电荷: 颗粒表面电荷与电极表面电荷的结合会影响粘附顺序。

-疏水性: 表面活性有机物的吸附会影响表面的疏

水或亲水特性, 并改变表面张力。

-温度: 温度和接触时间会影响细菌粘附和生物膜形成过程, 增加数学模型的制定对于评估这两个因素及其相互作用如何影响该过程是必要的。

-底物的存在: 电解质成分的吸附和颗粒表面同样重要。表面活性有机物的吸附会影响表面的疏水或亲水特性, 也会改变表面张力。

细菌细胞表面成分:

随着一个或多个相关表面的非极性增强, 疏水相互作用趋于增加, 并且大多数细菌带负电荷。这意味着细胞表面的疏水性是粘附过程中的一个相关因素。

-菌毛、菌毛和鞭毛: 菌毛、非鞭毛附属物, 除了那些与病毒或细菌核酸(称为菌毛)的转移有关的附属物之外, 还负责细胞表面的疏水性。大多数研究的菌毛含有高比例的疏水氨基酸残基。菌毛包括附着在某种基质上的粘附素, 因此细菌可以承受剪切力并获得营养。因此, 菌毛在细胞表面疏水性和附着中发挥作用, 可能是通过克服细胞和基质之间的初始静电排斥屏障。

研究的响应面方法不仅用于开发和优化食品加工系统和操作的模型, 还用于更好地阐明细菌粘附和生物膜形成过程。响应面法提供有价值的信息, 以帮助制定有关食品工业中使用的器具、设备和容器的消毒和清洁程序的决策。因此, 设备的表面和材料, 加上地板和墙壁, 也会影响生物膜, 以及死角、裂缝、多孔和粗糙的材料表面, 必须消除这些表面以避免形成生物膜。

控制生物膜最常用的策略是结合清洁剂和消毒剂的卫生程序。碱性清洁剂可消除表面的有机和无机酸性清洁剂废物, 而消毒剂可减少腐败微生物, 减少或消除病原体, 达到安全水平。酶清洁剂已经取代了传统的碱性和酸性清洁剂, 因为酶(蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶)可以去除食品工业中的生物膜, 因为酶通过削弱形成 PS 的脂质、蛋白质和碳水化合物的结构键来降低 PS 的物理完整性。结构体。与去污剂相比的其他优势包括低毒性和可生物降解性, 但应用成本和要求(温度、时间)高于去污剂。这就是为什么一些洗涤剂制造商推出了酶、螯合剂、表面活性剂和溶剂的协同组合。

四、生物膜识别技术和原位可视化生物膜的方法

生物膜研究技术的一般方面

毫无疑问, 生物膜在临床微生物学和卫生食品领域都可能构成重大挑战。在后一个领域, 一些作者认为它们是真正的威胁。目前, 旨在分析生物膜形成和发展的方法尚未标准化。已经遵循不同的方法来定性和定量地评估生物膜, 每一种方法都可用于估计一种特殊的生物膜生活方式方面。尽管如此, 识别和获取生物膜知识的

研究已经允许从微生物学或细胞组织学中开发和改编不同的技术。评估生物膜形成对于生物膜量化的敏感、特异性和可重复的方法至关重要。

不同的方法对在非常不同的表面上检测生物膜所遵循的方法进行分类: (i) 最简单的方法分类是直接或间接 [17]。(ii) 卫生控制的快速测试以及微观、生物分子、细胞外聚合物、物理或化学物质 (EPS) 的方法是另一种可能的分类 [158]。(iii) 最近的一份出版物 [159] 仅提及所提及方法的技术被归类为物理、物理化学或化学, 并推荐了三种有效的测试生物膜的方法: (a) 通过不同视野的各种显微方法进行观察在同一点; (b) 显微图像处理期间的深入数据分析; (c) 使用原子力显微镜 (AFM) 和化学分析的组合研究。也许这是生物膜分析最先进和最合适的方法, 其中表面的详细图像将有助于在生物膜基质、相互作用和其他因素 (如 pH 值、表面) 之间建立关系 [159]。然而, 在另一种情况下, 细菌种类可以帮助减少生物膜, 其中地衣芽孢杆菌可以表达能够减少有害生物膜的水解酶 [160]。

因此, 根据设定的目标, 即我们希望通过生物膜实现的目标, 我们应该根据我们的研究选择一种技术。并非所有技术都适合特定目的, 但可能是兼容的。因此, 一些方法适用于量化生物膜基质, 而其他方法则能够评估活细胞和死细胞, 或专门量化生物膜中的活细胞。

通过考虑生物膜结构的复杂性和异质性, 应设定确切的研究目标。EPS 的数量、嵌入生物膜中的细菌细胞总数或生物膜中的实际活细菌数量必须被视为需要不同实验方法的不同目标。我们应该记住, 生物膜体积主要由细胞外基质 (95-65% 范围) 构成, 主要由蛋白质和其他成分组成, 例如多糖 (1-2%)、DNA 分子 (<1%)、RNA (<1%)、离子 (结合和游离), 最后是 97% 的水。因此, 生物膜研究方法应解决细菌和其他基质成分的鉴定问题。

为了对细菌生物膜的形成和存在有一个基本的了解, 我们的分析应该包括细菌和基质的检测。评估生物膜异质性最常用的方法是局部生物膜形态的直接显微成像或局部生物膜厚度的显微测量。对于许多应用, 具有共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 的延时显微镜是一种理想的工具, 用于以微米级的空间分辨率进行监测, 并且它允许通过检查不同深度的所有层来对生物膜进行无损研究。这样, 就可以重构出三维结构。基质检测可以通过结合 CLSM 的双重染色技术实现, 该技术可以同时生物膜中的细菌细胞和糖萼进行成像。

比色法

- 评估生物膜基质

研究人员广泛使用对微量滴定板孔中生长的生物膜进行染色, 以筛选和比较不同细菌或在各种条件下形成的生物膜。在文献中描述的方法中, 结晶紫 (CAS 号 931418 92 7) 是最广泛用于生物膜生物量量化的方法。这种碱性染料结合带负电荷的分子, 因此, 染色剂能够对细菌和周围的生物膜基质进行染色。乙酸可用作萃取溶剂, 通过 700-600 nm 的吸光度测定。番红染色也可用于生物膜生物量定量, 但其光密度低于结晶紫染色, 因此对检测少量生物膜可能不敏感。

结晶紫染色测试掺入细菌细胞壁的染料浓度, 取决于细胞的完整性, 而不是活力。然而, 其他方法如 ATP 生物发光报告细胞的代谢状态, 并在细胞死亡后几分钟内降至无法检测到的极限。采用这两种方法可以提供有关暴露于消毒剂的细胞的补充信息。结果可以表明, 尽管消毒剂处理后生物膜中的活细胞数量急剧下降, 但大量完整细胞或细胞碎片可能仍然能够保留染料。这一观察结果引发了关于结晶紫染色作为监测生物膜消毒方法的可靠性的问题。

活细胞的另一种比色法是二乙酸荧光素 (CAS 编号 596 09 8), 它采用一种有用的活细胞荧光染料, 在活细胞中水解成荧光荧光素。信号可以用分光光度法测量。这适用于具有完整膜的细胞活力测定, 因为死细胞无法代谢荧光素二乙酸盐。因此, 没有荧光信号。

- 细胞染色

用荧光化合物可视化细胞为分析细胞功能提供了广泛的信息。各种活动和细胞结构可以作为荧光化合物染色的目标。这些细胞成分主要是细胞膜、核苷酸和蛋白质。取决于分子电荷、疏水性或反应性, 染色剂可以传递给细胞。因此, 小的中性和带正电荷的荧光化合物通常可以到达线粒体进行染色。带负电荷的分子不能通过活细胞膜。酯是用于染色活细胞的合适官能团, 因为它可以穿过活细胞膜, 在那里它被细胞酯酶水解成带负电荷的化合物。

可以运行其他补充技术来检查用于研究微生物生物膜的先进显微技术 (即共聚焦激光扫描显微镜、质谱、电子显微镜、拉曼光谱) 的性能。

用于定量革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌生物膜的荧光分光测定法是一种利用小麦胚芽凝集素-Alexa Fluor 488 偶联物 (WGA) 与生物膜中 N-乙酰氨基葡萄糖的特异性结合的方法。这种凝集素结合物还与革兰氏阳性菌肽聚糖层上的 N-乙酰神经氨酸结合。WGA 与多糖粘附素 (聚 N-乙酰氨基葡萄糖) 特异性结合, 后者参与革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的生物膜形成。Burton 等人将比色法与荧光分光法进行了比较, 其结果表明 WGA 染

色可能是大肠杆菌和表皮葡萄球菌生物膜检测和定量的一种更具体的方法。

拉曼显微镜 (RM)

这种非破坏性分析技术提供具有光学显微镜空间分辨率的指纹光谱。这种原始技术允许以高灵敏度和特异性对复杂生物膜基质中的生化变化进行定量、无标记、非侵入性和快速监测。拉曼光谱研究的特点是特异性高,通常显示比红外光谱更清晰、更清晰的条带,以及较小的水背景。与红外显微镜相比,可见光激发可用于拉曼光谱,从而可以使用标准光学器件。其他优点包括它在表征和识别不同生物系统(真菌、细菌、酵母菌)方面的应用,因为所有生物相关分子(例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物)都表现出不同的光谱特征。因此,Ivleva等人通过RM分析了七种不同的特定微生物,以表征生物膜中的微生物。

另一位作者评估了抗生素对生物膜的影响,以及石墨烯的氧化对不同年龄的恶臭假单胞菌生物膜的抗菌活性。

结论:

在过去的30年中,生物膜已成为食品工业中一个主要的环境微生物学问题。由于生物膜可能污染食物,这个话题很突出;它们造成了超过20%的食物中毒病例,并且它们对抗生素的耐受性是浮游生物的1000倍。

生物膜的形成将发生在与液体接触的固体表面上。液体中的有机和无机物质沉淀到固体物质上。随后,具有生物活性的微生物将被吸引到该调节过的表面并粘附在其上。微生物细胞将开始生长,形成附着基质并发展成复杂的群落,形成微生物生物膜。这种微生物生物膜在与许多不同种类的液体、淡水、海水、油、牛奶等接触的固体表面上很常见。这些生物膜可能对它们形成的环境有益或有害。本综述的目的是总结有关在这些不同环境中微生物生物膜发育的文献,特别强调食品加工厂环境中发生的情况。讨论了在食品加工厂中控制粘附微生物和随后的生物膜的方法。从已经审查的数据中可以明显看出,在食品加工厂环境中存在微生物生物膜发展的潜力。

许多细菌物种具有形成生物膜的能力,例如微生物生存体(当面临来自环境的敌意时)、抗生素和消毒剂。由于这些原因,食品行业的清洁和消毒必须带来有利于消除生物膜的变化,因为一旦形成,由此产生的成本和风险将非常高。正如之前在许多出版物中发现的那样,细菌形成生物膜的能力比发现的要大。因此,它们必须被淘汰。新的非破坏性技术(例如激光解剖)研究生物膜及其结果的进步应应用于食品工业中的生物膜诊断,

以更好地了解微生物和生物膜的生理解剖学,以及未来在食品工业中的应用。

参考文献:

- [1] Satpathy S., Sen S.K., Pattanaik S., Raut S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2016;7:56 - 66. doi: 10.1016/j.bcab.2016.05.002.
- [2] Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8:623 - 633. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- [3] Hall-Stoodley L.J., Costerton W., Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2:95 - 108. doi: 10.1038/nrmicro821.
- [4] Acker H.V., Dijk P.V., Coenye P.V. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* 2014;22:326 - 333. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.001.
- [5] Alvarez-Ordóñez A.L., Coughlan M., Briand R., Cotter P.D. Biofilms in food processing environments: Challenges and opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2019;10:173 - 195. doi: 10.1146/annurev-food-032818-121805.
- [6] Costerton J.W., Ellis B., Lam K., Johnson F., Khoury A.E. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38:2803 - 2809. doi: 10.1128/AAC.38.12.2803. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [7] Simoes M., Simoes L., Vieira M. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT Food Sci. Technol.* 2010;43:573 - 583. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008. [CrossRef] [Google Scholar]
- [8] Fung D.Y.C. Rapid methods and automation in microbiology: A review. *Ir. J. Agric. Food Res.* 2000;39:301 - 307. doi: 10.1080/87559129409541006. [CrossRef] [Google Scholar]
- [9] Bouix M., Leveau J.Y. Les applications de la cytométrie en flux en microbiologie. *L' Eurobiologiste.* 2002;36:31 - 43. [Google Scholar]
- [10] Holah J.T., Taylor J.H., Dawson D.J., Hall K.E. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia Coli*. *J. Appl. Microbiol.* 2002;92:111S - 120S. doi: 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x.