

文章编号: 1674-5566(2017)02-0294-07

DOI:10.12024/jsou.20160401731

## 超高压对单增李斯特菌生物被膜形成的影响

莘似韵<sup>1</sup>, 孙晓红<sup>1,2,3</sup>, 徐忆宁<sup>1</sup>, 赵勇<sup>1,2,3</sup>, 吴启华<sup>4</sup>, 潘迎捷<sup>5</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心农业部, 上海 201306; 3. 水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 4. 美国 USDA-ARS 研究中心, 美国加利福尼亚州 94710; 5. 上海建桥学院, 上海 201306)

**摘要:** 为探究超高压处理对单增李斯特菌被膜形成能力的影响。以 2 株 4b 血清型的单增李斯特菌 (WaX12、ATCC13932) 为研究对象进行超高压处理(100~500 MPa, 15 min, 20 °C), 通过 24 孔板结晶紫染色方法对 2 株菌生物被膜形成能力进行检测, 结合荧光显微镜和扫描电镜来观察生物被膜形成情况。WaX12 比 ATCC13932 形成被膜的能力强。100 MPa 压力处理显著增强 WaX12 的被膜形成能力 ( $P < 0.05$ ), 200 MPa 压力处理使 ATCC13932 被膜形成量显著增多 ( $P < 0.05$ ), 而大于 300 MPa 的超高压处理使 2 株菌的被膜形成量均显著减少 ( $P < 0.05$ )。荧光显微镜和扫描电镜观察结果与结晶紫染色结果相符, 超高压处理对 2 株单增李斯特菌被膜形成能力均有影响。小于 200 MPa 压力处理后单增李斯特菌被膜形成能力增强, 并在 48 h 后被膜形成量达到最大值。

**关键词:** 超高压; 单增李斯特菌; 生物被膜; SEM

**中图分类号:** Q 935      **文献标志码:** A

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种典型的兼性胞内寄生的革兰氏阳性致病菌<sup>[1]</sup>, 临床上该病的病死率高达 20%~30%<sup>[2]</sup>。单增李斯特菌通常以生物被膜的形式存在, 成熟的生物被膜更是对理化因子、杀菌剂、抗生素等具有较强抵抗力<sup>[3]</sup>。KADAM 等<sup>[4]</sup>发现营养较低的培养基能促进单增李斯特菌生物被膜的形成; LEE 等<sup>[5]</sup>发现 0.5% 的过氧乙酸并未对生物被膜态的单增李斯特菌产生影响。单增李斯特菌由于生物被膜的存在, 使其抵御外界不良环境的能力增强, 以致细菌难以去除。

超高压 (Ultra-high pressure, UHP) 杀菌技术是在常温或指定温度下, 将食品置于压力系统中, 以水或其他液体作为传压介质, 经过 100 MPa 以上压力处理而达到杀菌、灭酶并改善食品功能特性等效果食品加工技术<sup>[6]</sup>。虽然超高压处理

能较好保留食品原有品质, 但却无法彻底灭活食品中所有的微生物, 而残留的微生物, 尤其是细菌孢子和亚致死恢复活性的营养体对食品的安全性构成隐患<sup>[7]</sup>。LINTON 等<sup>[8]</sup>在对含单增李斯特菌的乳制品进行超高压处理研究中发现, 500 MPa、10 min、20 °C 处理虽能够降低单增李斯特菌的活菌量, 但仍有细菌存活并繁殖; PATTERSON 等<sup>[9]</sup>将有单增李斯特菌的鸡肉进行 600 MPa、2 min、20 °C 处理后也发现了活菌的存在。在适宜条件下, 存活的单增李斯特菌能继续繁殖, 并形成生物被膜增加了食品的食用危害。

已有研究报道超高压处理不能将单增李斯特菌全部灭活, 但超高压处理对单增李斯特菌生物被膜形成能力的影响尚未有研究, 因此本研究选取了两株 4b 血清型单增李斯特菌进行超高压处理并比较超高压处理对单增李斯特菌生物被膜形成能力的影响。

收稿日期: 2016-04-11

修回日期: 2016-07-22

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2014 第 3-5 号); 上海市科委工程中心能力提升项目(16DZ22803001)

作者简介: 莘似韵(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: cindysiyun@hotmail.com

通信作者: 孙晓红, E-mail: xhsun@shou.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与试剂

单增李斯特菌 ATCC13932(血清型 4b)购自上海疾控中心、单增李斯特菌 WaX12 为本实验室从牛奶中分离的菌株(血清型 4b);PALCAM 培养基、脑心浸出液(BHI)、胰蛋白胨大豆琼脂 TSA 培养基均购自陆桥生物有限公司;乙醇、甲醇、磷酸缓冲液(PBS)均购自北京国药集团化学试剂有限公司;结晶紫购自生工生物技术有限公司;SYBR Green I 购自索莱宝生物技术有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器

HPP. L2-600/2 超高压设备购自华泰森森有限公司;24 孔板(corning)购自生工生物技术有限公司;Bio-Tek 酶标仪 Synergy™ Mx 购自基因有限公司;荧光显微镜 Axiovert A1 购自卡尔·蔡司股份公司;S-3400NSEM 扫描电镜购自日立公司。

### 1.2 菌悬液的制备

无菌挑取冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的单增李斯特菌,用三线法划线接种于 PALCAM 培养基上  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养活化 24 h 获得单菌落,挑取一个菌落于 5 mL 脑心浸出液 BHI 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养,以 1% 的接种量接入 5 mL BHI 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养再次活化,离心(6 000 r/min、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min),弃上清液后用 0.85% 生理盐水悬浮沉淀,调整菌液浓度,活菌数达到约  $10^9$  cfu/mL。

### 1.3 超高压处理

将制备好的单增李斯特菌菌悬液分装于无菌的冻存管,每管约 3 mL。将冻存管置于超高压加压釜中,分别采用 100、200、300、400 和 500 MPa 处理 15 min,升压时间不超过 5 min,泄压时间不超过 1 min,处理温度为  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以未经高压处理的菌悬液为对照组,每个处理做 3 次平行。

### 1.4 微生物计数

采用平板涂布法进行菌落总数的测定。用 0.85% 无菌生理盐水梯度稀释经超高压处理组和对照组,取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液涂布于胰蛋白胨大豆琼脂 TSA 培养基上。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温倒置培养 24 h 后,进行菌落计数,计算单增李斯特菌存活量。

### 1.5 生物被膜的制备

对照组和经超高压处理后的菌液以 1:50 转

接到新鲜 BHI 培养基中,取 1 mL 该培养液转入 24 孔板中,为便于荧光显微镜及扫描电镜的观察,事先将无菌圆形盖玻片(20 mm  $\times$  20 mm)置于 24 孔板中。每个样品设置 12 个平行。将 24 孔板置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  中静置培养,分别培养 24 h、48 h 和 72 h。吸走各孔中的培养液,用  $1\times$  PBS 缓冲液清洗 3 次,室温干燥后待用。

为了排除初始接菌量对生物被膜形成量造成的影响,本实验中为每个压力处理组设置了对照组。对照组的初始接菌量与相对应的超高压处理组的活菌数相同。

### 1.6 结晶紫法测定生物被膜的形成

在经干燥处理的 24 孔板中加入 1 mL 浓度为 0.1% 的结晶紫溶液进行染色。室温染色 30 min 后,弃去染色液,用  $1\times$  PBS 缓冲液洗涤 3 次,干燥后,向每个孔中加入 1 mL 浓度为 95% 的乙醇溶液,脱色 30 min,使结晶紫染色液脱色充分。酶标仪测定其  $\text{OD}_{595}$  的光吸收值,结果采用 Graphpad Prism 5 和 SPSS 20 进行统计分析。

### 1.7 荧光显微镜观察生物被膜内细菌分布

在室温干燥后的圆形盖玻片中加入 2 mL 2.5% 戊二醛固定 2 h,再用  $1\times$  PBS 缓冲液清洗 3 次。室温干燥后,用 SYBR Green I 对粘附在盖玻片上的菌体进行染色 30 min,用  $1\times$  PBS 清洗 3 次后将圆形盖玻片取出放于载玻片上,并在荧光显微镜下进行观察被膜情况。

### 1.8 扫描电镜观察被膜形态的细菌

在干燥后的圆形盖玻片中加入  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  预冷的 1.5 mL 2.5% 戊二醛进行固定,置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  固定 10 h 以上。用  $1\times$  PBS 缓冲液清洗 3 次,室温干燥后,用梯度浓度(依次加入 30%、50%、70%、90% 4 个浓度)的乙醇溶液对样品进行脱水,各脱水 1 次,时间为 15 min。加入 100% 乙醇溶液,脱水 2 次,时间 15 min。室温干燥后,将圆形盖玻片取出,喷金处理,用扫描电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 超高压处理对单增李斯特菌存活量的影响

单增李斯特菌经 100 ~ 500 MPa、 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min 处理后,测定其菌落总数,计算经超高压处理后单增李斯特菌的存活率,以未经高压处理的单增李斯特菌为对照(图 1)。由图 1 可见,WaX12 和 ATCC13932 两个菌株经小于 200 MPa 超高压处

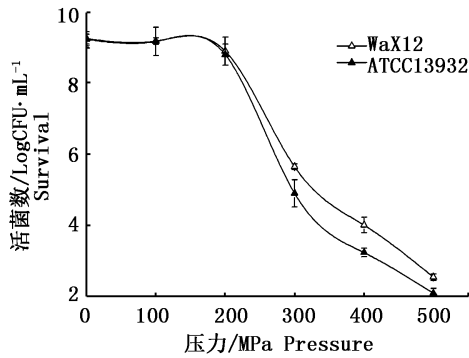


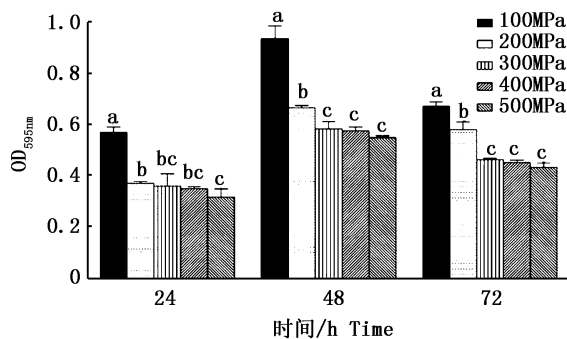
图1 超高压处理对单增李斯特菌 WaX12 和 ATCC13932 存活率的影响

Fig.1 Effect of ultra high pressure on the survival number of *Listeria monocytogenes* WaX12 and ATCC13932

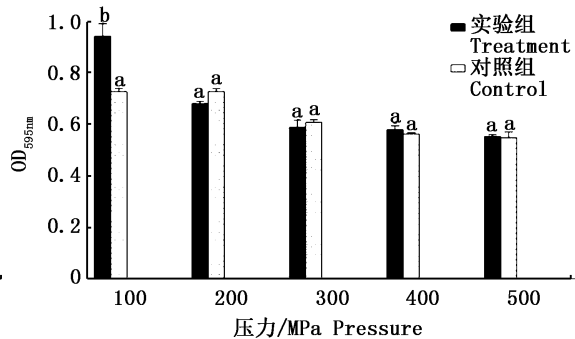
理后菌落总数无明显减少。而大于 200 MPa 超高压处理后菌落总数均有明显下降,并且 WaX12 菌株的存活率明显高于 ATCC13932 菌株。由此推断超高压处理较难完全杀灭单增李斯特菌株,并且 WaX12 菌株对压力的耐受能力强于 ATCC13932 菌株。

## 2.2 结晶紫染色法比较单增李斯特菌生物被膜形成量

结晶紫能与单增李斯特菌的生物被膜结合,



(a) WaX12在24、48h和72h时的被膜形成量  
The biofilm formation of WaX12 after 24, 48h, and 72h



(b) WaX12在48h的实验组与对照组的被膜形成量  
The comparison of the biofilm formation of treatment groups and the control groups after 48h

图2 超高压处理后单增李斯特菌 WaX12 生物被膜形成能力的比较

Fig.2 The comparison of the biofilm formation of *Listeria monocytogenes* WaX12 after the ultra-high pressure processing by crystal staining assay

a, b, c, d 说明各组有显著差异 ( $P < 0.05$ )

a, b, c, d indicates there was a significant difference between the groups

37 °C 下 ATCC13932 经过 72 h 培养,被膜形成量最多(图 3a);200 MPa 处理后,ATCC13932 的被膜形成量比对照组显著提升了 20.9% ( $P < 0.05$ ),而其他各压力处理组与对照组均无显著

因此其吸光值的高低即可反映生物被膜量的多少。将经 100 ~ 500 MPa 压力处理组和对照组的菌液以 1:50 转接到新鲜 BHI 培养基中于 37 °C 静置培养 24 h、48 h 和 72 h,对其形成的生物被膜进行检测。

### 2.2.1 不同压力处理对单增李斯特菌生物被膜形成量的影响

WaX12 经大于 200 MPa 的压力处理后,在 3 个时间点的生物被膜量均低于对照组和 100 MPa 压力处理组,并随处理压力增大 WaX12 的被膜量减少。37 °C 下 WaX12 经过 48 h 培养,被膜形成量最多(图 2a)。为排除初始接菌量不同对被膜量造成的影响,实验中对每个压力处理组均设置了相同接菌量的对照组,100 MPa 实验组的被膜量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),与对照组相比其被膜形成量提升了 28.8%;而其他各压力处理组与对照组均无显著差异。结果说明,100 MPa 的超高压处理增强了 WaX12 的生物被膜形成能力;较高的压力未改变 WaX12 的被膜形成能力,只是由于菌量的减少使生物被膜量也降低(图 2b)。

差异(图 3b)。结果说明,200 MPa 超高压处理增强了 ATCC13932 的生物被膜形成能力。

### 2.2.2 不同菌株形成被膜的能力不同

为便于比较 WaX12 和 ATCC13932 两株菌生

物被膜形成能力的差异,均选取了这两株菌的最大被膜形成量,即 WaX12 在 48 h, ATCC13932 在 72 h 的被膜形成量进行比较(图 4)。

WaX12 的最大被膜量与 ATCC13932 相比增加了 44.7%。两株菌被膜形成量最少的组均为

500 MPa 压力处理组, WaX12 的最小被膜量比 ATCC13932 高 36.4%。WaX12 达到最高被膜形成量所需的时间比 ATCC13932 短,且 WaX12 的被膜形成量高于 ATCC13932。由此推断, WaX12 形成生物被膜的能力大于 ATCC13932。

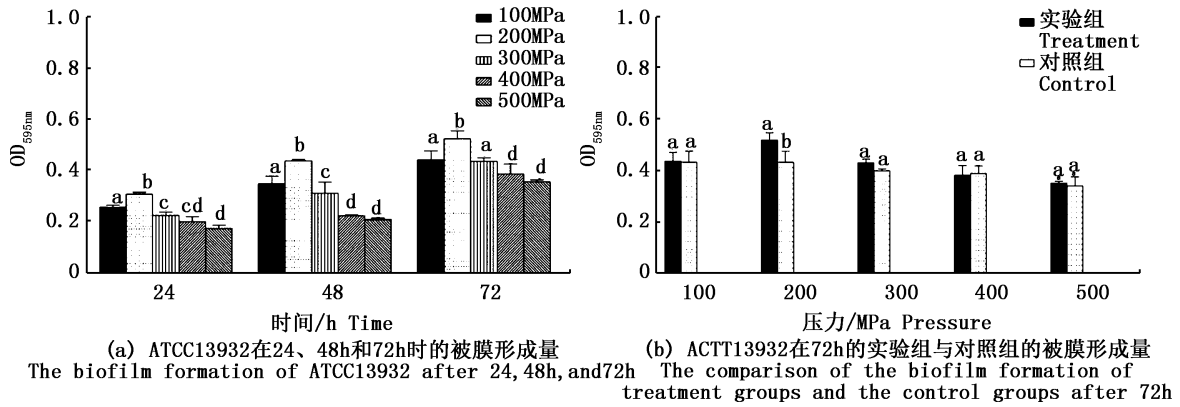


图 3 超高压处理后单增李斯特菌 ATCC13932 生物被膜形成能力的比较

Fig.3 The comparison of the biofilm formation of *Listeria monocytogenes* ATCC13932 after the ultra-high pressure processing by crystal staining assay

a, b, c, d 说明各组有显著差异 ( $P < 0.05$ )

a, b, c, d indicates there was a significant difference between the groups

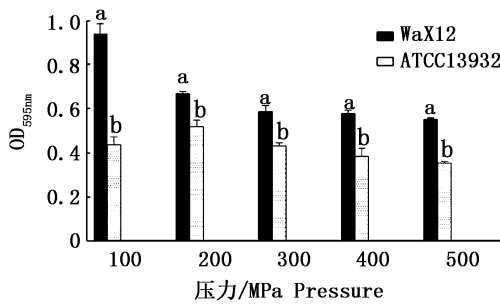


图 4 单增李斯特菌 WaX12 和 ATCC13932 最大被膜形成量

Fig.4 Maximum amount of biofilm formation of *Listeria monocytogenes* WaX12 and ATCC13932

a, b 说明两组有显著差异 ( $P < 0.05$ )

a, b indicates there was a significant difference between two groups

### 2.3 荧光显微镜观察结果

为直接观察单增李斯特菌经不同压力处理后生物被膜形成情况,本实验选择成膜量最多和最少的组,即 WaX12 在 100、500 MPa 处理后, ATCC13932 在 200、500 MPa 处理后,及各自的对照组,采用荧光显微镜观察被膜形成情况(图版 I)。

由图版 I a 可以观察到 WaX12 经过 100 MPa

处理后 48 h 形成的生物被膜最致密,菌体之间交联度高,染色部分最稀疏的是 500 MPa 处理后 24 h 形成的生物被膜,荧光部分最少,且几乎不交联。由图版 I b 观察到 ATCC13932 经 200 MPa 处理后 72 h 形成的生物被膜荧光染色部分最多且交联度较高,染色部分最少最稀疏的是经 500 MPa 处理后 24 h 形成的生物被膜。

两株菌相比, WaX12 菌体之间交联更明显更致密, ATCC13932 的交联度均较低,分布稀疏,结合结晶紫染色的结果可知 WaX12 较 ATCC13932 形成生物被膜的能力高。

### 2.4 扫描电镜观察结果

进一步采用扫描电镜观察单增李斯特菌被膜形成情况,并选取 WaX12 和 ATCC13932 最大和最小被膜形成量时的生物被膜形态(图版 II)。结果显示, WaX12 经 100 MPa 处理后 48 h 形成的生物被膜较其他组别生物被膜更加稠密,且在单个菌之间有明显的细丝相连。这一现象与 SHIRTLIFF 等<sup>[10]</sup>的研究结果一致,说明单增李斯特菌 WaX12 被膜形成能力明显强于 ATCC13932。

### 3 讨论

细菌的被膜形成受到较多因素的影响,如粘附表面的材质、营养物质、pH 及温度等<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,超高压对单增李斯特菌生物被膜形成能力有影响;不同菌株被膜形成能力不同。

#### 3.1 超高压对单增李斯特菌生物被膜形成能力的影响

KADAM 等<sup>[4]</sup>发现在营养贫瘠的培养基中,单增李斯特菌的被膜形成能力强于营养丰富的培养基;付娇娇等<sup>[12]</sup>发现,不同培养条件下,单增李斯特菌形成的被膜量不同,其中温度对单增李斯特菌的被膜形成影响较大。细菌形成被膜的能力易受到环境的影响。本实验中,经过较小的压力(100~200 MPa)处理后,单增李斯特菌的被膜形成能力提升;而使用大于 200 MPa 压力处理后,由于高压处理后菌量的减少使得单增李斯特菌的生物被膜量也减少,但是生物被膜形成能力没有变化。由此推测,经过较小的压力处理后,单增李斯特菌通过形成更多生物被膜来抵抗外界压力刺激;而经过较大的压力处理后,由于单增李斯特菌的活菌数显著减少,因此其生物被膜形成量也减少。

#### 3.2 不同菌株被膜形成能力不同

王少辉等<sup>[13]</sup>对上海市动物源性食品中单增李斯特菌的污染状况的报告中表明:相同血清型不同来源的单增李斯特菌的被膜形成能力不同。在本实验中,经过超高压处理后,ATCC13932 的活菌率低于 WaX12,这一结果表明单增李斯特菌对超高压处理有一定的耐受能力,且这两株菌的耐受能力不同,WaX12 比 ATCC13932 更耐高压。同时,两株菌生物被膜形成能力也不同,ATCC13932 的生物被膜量显著少于 WaX12。荧光显微镜观察的结果表明,ATCC13932 形成的生物被膜比 WaX12 更稀疏,被膜内细菌的交联更疏松,而且孔径也更大;扫描电镜的观察结果表明,WaX12 形成的生物被膜中菌体之间互联的细丝更多,表明它的被膜形成能力较高。这两株菌之间被膜形成能力的差异表明单增李斯特菌被膜形成能力受到自身基因的调控,这一结果与 NILSSON 等<sup>[14]</sup>的研究一致,他们发现不同来源的单增李斯特菌的被膜形成能力有差异;KAZMIERCZAK 等<sup>[15]</sup>的研究也发现,单增李斯特

菌被膜形成受到 *sigB*, *prfA* 等基因的共同调控。

单增李斯特菌生物被膜的形成受到外界环境以及基因的调控等因素影响,因此避免由于环境改变造成生物被膜增加而造成的危害对食品加工很重要,所以阐明影响单增李斯特菌生物被膜形成的因素和机制是今后研究的重点。

#### 参考文献:

- [1] GOUIN E, QUEREDA J J, COSSART P. Intracellular bacteria find the right motion[J]. *Cell*, 2015, 161(2): 199-200.
- [2] 蒋原. 食源性病原微生物检测指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- JIANG Y. Guide for the detection of foodborne pathogens [M]. Beijing: China Standards Press, 2010.
- [3] 柯春林, 方维焕. 单增李斯特菌生物膜及其形成机制的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2011, 23(6): 574-577.
- KE C L, FANG W H. Research on the biofilm and its mechanism of *Listeria monocytogenes* [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(6): 574-577.
- [4] KADAM S R, DEN BESTEN H M W, VAN DER VEEN S, et al. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(3): 259-264.
- [5] LEE S H I, CAPPATO L P, CORASSIN C H, et al. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 2384-2390.
- [6] KOVA Č K, DIEZ-VALCARCE MHERNANDEZ M, et al. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21(11): 558-568.
- [7] 姜雪, 于鹏, 肖杨, 等. 天然抑菌剂与超高压协同作用的研究进展 [J]. *食品科技*, 2016, 41(2): 296-299.
- JIANG X, YU P, XIAO Y, et al. Development and application of synergistic effect between HPP and natural antibacterial agents [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(2): 296-299.
- [8] LINTON M, MACKLE A B, UPADHYAY V K, et al. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9(4): 423-428.
- [9] PATTERSON M F, MACKLE A, LINTON M. Effect of high pressure, in combination with antilisterial agents, on the growth of *Listeria monocytogenes* during extended storage of cooked chicken [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(8): 1505-1508.
- [10] SHIRTLIFF E, MADER J T, CAMPER A K. Molecular

- inter-actions in biofilms[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9 (8): 859-871.
- [11] DONLAN R M. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(9): 881-890.
- [12] 付娇娇, 王旭, 刘海泉, 等. 不同培养条件下 *sigB* 对单增李斯特菌生物被膜形成的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(4): 634-640.
- FU J J, WANG X, LIU H Q, et al. Effects of *sigB* on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* under various culture conditions[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(4): 634-640.
- [13] 王少辉, 刘萍萍, 魏建超, 等. 上海市动物源性食品中单增李斯特菌的流行病学及生物被膜形成能力研究[J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23(4): 31-36.
- WANG S H, LIU P P, WEI J C, et al. Epidemiology and biofilm-formation capacity of *Listeria monocytogenes* from animal origin food in Shanghai [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2015, 23(4): 31-36.
- [14] NILSSON R E, ROSS T, BOWMAN J P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 150(1): 14-24.
- [15] KAZMIERCZAK M J, WIEDMANN M, BOORK J. Contributions of *Listeria monocytogenes* sigmaB and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth[J]. *Microbiology*, 2006, 152 (6): 1827-1838.

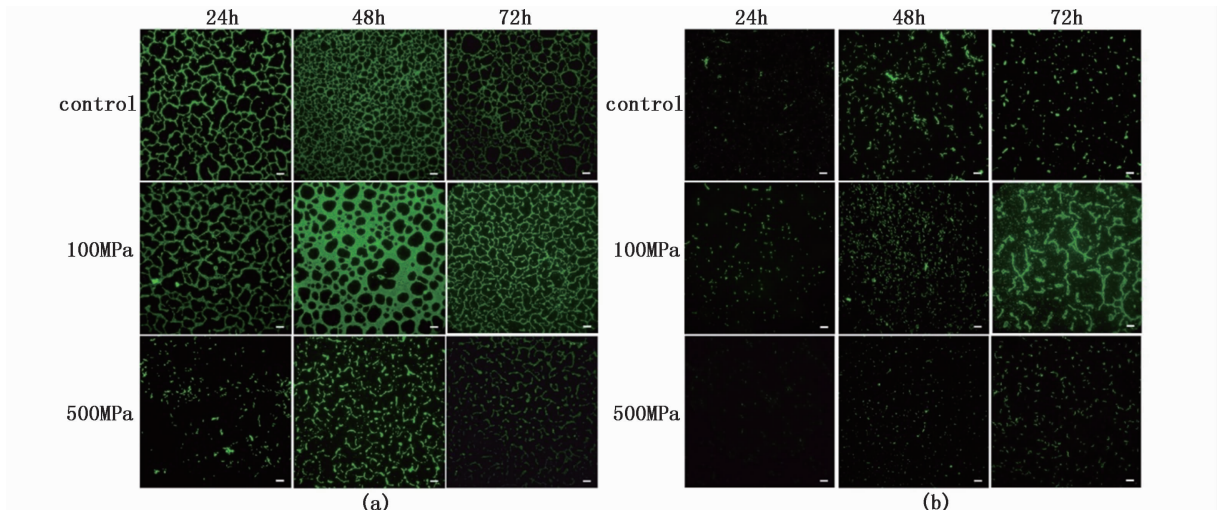
## Effects of ultra-high pressure (UHP) processing on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*

SHEN Siyun<sup>1</sup>, SUN Xiaohong<sup>1,2,3</sup>, XU Yining<sup>1</sup>, ZHAO Yong<sup>1,2,3</sup>, WU Vivian Chihua<sup>4</sup>, PAN Yingjie<sup>5</sup>

(1. *Collage of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China*; 3. *Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China*; 4. *Produce Safety and Microbiology Research Unit, USDA-ARS, CA 94710, USA*; 5. *Shanghai Jianqiao University, Shanghai 201306, China*)

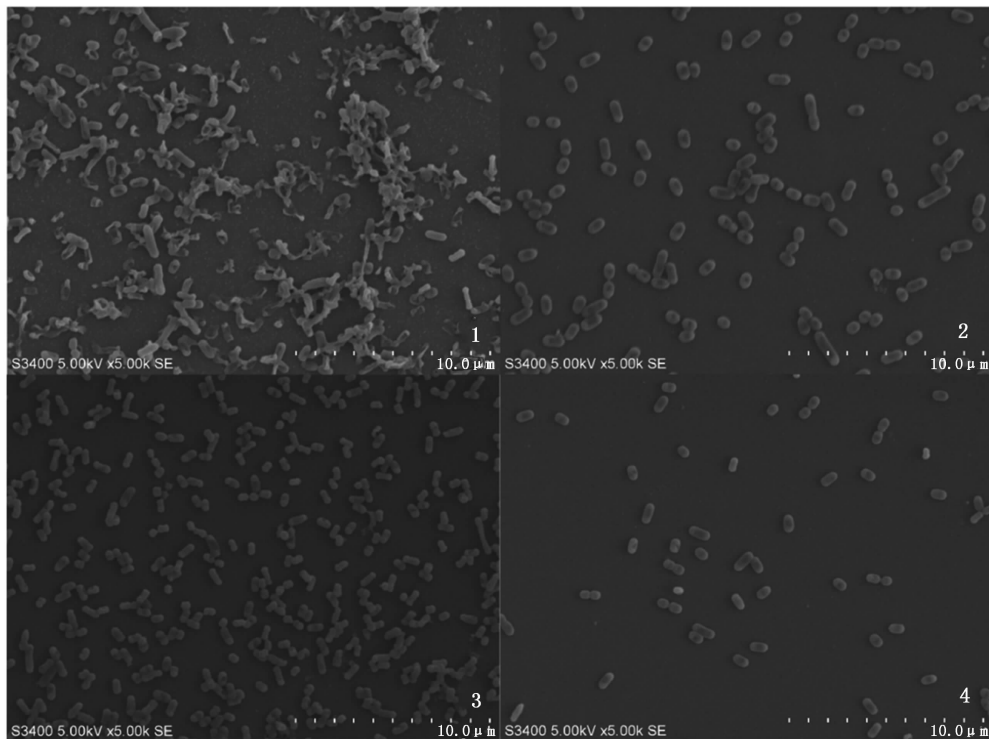
**Abstract:** We found *Listeria monocytogenes* was still alive after the ultra-high pressure processing. Based on the result of our former experiments, this research aims to investigate whether the ultra-high pressure processing affects the biofilm formation of *L. monocytogenes*. 2 strains of *L. monocytogenes* were applied in the research, both serotypes were 4b. Crystal violet staining assay was used to investigate the biofilm forming capacity of 2 strains, while the fluorescent microscopy and SEM were applied to observe the structures of the biofilm. The biofilm forming capacity of WaX12 was higher than ATCC13932. After 100 MPa UHP processing, WaX12 formed more biofilm than the control group, while 200 MPa improved the biofilm forming capacity of ATCC13932. The biofilm formation of both strains reduced after 300 MPa and higher UHP processing. The images of biofilm formation of the 2 strains obtained by fluorescent microscopy and SEM were consistent with the results of crystal violet staining assay. Results suggested that the UHP processing may increase the biofilm formation of *L. monocytogenes*. If the pressure was lower than 200 MPa, the biofilm formation was strengthened, and reached the maximum after 48 h. It is important to choose proper pressure during UHP processing.

**Key words:** UHP processing; *Listeria monocytogenes*; biofilm; SEM



图版 I 单增李斯特菌 WaX12 (A) 和 ATCC13932 (B) 在不同压力及未经高压处理后被膜形成情况的荧光显微镜结果 ( $\times 400$ )。标尺为  $20.0 \mu\text{m}$

Plate I Microscopical analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* WaX12 (A) and ATCC13932 (B) after different pressures ( $\times 400$ ). Scale bar =  $20.0 \mu\text{m}$



图版 II 单增李斯特菌生物被膜扫描电镜结果 ( $\times 5\ 000$ ) (1) WaX12 最大被膜形成量, (2) WaX12 最小被膜形成量, (3) ATCC13932 最大被膜形成量, (4) ATCC13932 最小被膜形成量。标尺为  $10.0 \mu\text{m}$

Plate II Scanning electron microscopy of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* ( $\times 5\ 000$ )  
 (1) The maximum of the biofilm formation of WaX12; (2) The minimum of the biofilm formation of WaX12;  
 (3) The maximum of the biofilm formation of ATCC13932; (4) The minimum of the biofilm formation of ATCC13932. Scale bar =  $10.0 \mu\text{m}$