

3株被膜态产志贺毒素大肠杆菌产志贺毒素能力的分析

张萍, 农芳丽, 杜明, 赵勇, 刘海泉

Analysis of Shiga toxin-producing ability of 3 biofilm strains of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*

ZHANG Ping, NONG Fangli, DU Ming, ZHAO Yong, LIU Haiquan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503447>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

一株黄金鲫鱼源蜡状芽孢杆菌的筛选、鉴定及耐性研究

Isolation, identification and probiotic properties of a *Bacillus cereus* strain from Golden crucian carp
上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 883 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-331>

蟹源弗氏柠檬酸杆菌拮抗菌PNB3的分离鉴定与安全性分析

Isolation, identification and safety analysis of antagonistic strain PNB3 against crab-pathogenic *Citrobacter freundii*
上海海洋大学学报. 2021, 30(4): 653 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402988>

高通量基因芯片在压载水中检测致病菌的应用

High-throughput DNA microarray used for pathogens detection in the ballast water
上海海洋大学学报. 2018, 27(3): 431 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180310010>

不同培养条件下sigB对单增李斯特菌生物被膜形成的影响

Effects of sigB on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* under various culture conditions
上海海洋大学学报. 2016, 25(4): 634 <https://doi.org/10.12024/jsou.20151201610>

副溶血性弧菌vtrB基因敲除菌株的构建及其在抵抗胆汁中的作用

Construction of *vtrB* gene knockout strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its role in bile resistance
上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 555 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200403004>

文章编号: 1674-5566(2023)02-0395-10

DOI:10.12024/jsou.20210503447

3 株被膜态产志贺毒素大肠杆菌产志贺毒素能力的分析

张 萍¹, 农芳丽¹, 杜 明², 赵 勇^{1,3,4,5}, 刘海泉^{1,3,4,5}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034; 3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 5. 上海海洋大学 食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 为了解食源性产志贺毒素大肠杆菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)的菌株特征及潜在致病性, 分析其在被膜状态下产志贺毒素能力的变化情况。采用传统 PCR 技术扩增 *stx* 基因亚型, 菌株 1 携带 *stx1c + stx2d* 亚型, 菌株 2 携带 *stx1 + stx2f* 亚型, 菌株 3 携带 *stx2e* 亚型。多位点序列分型(MLST)结果显示 3 株菌株亲缘关系较远, 具有遗传多样性。分别利用结晶紫染色试验和 Vero 细胞毒性试验探究菌株在 4、10、25 和 37 °C 下被膜形成能力和产志贺毒素能力。结果表明, 温度显著影响被膜形成能力和产志贺毒素能力, 37 °C 时 3 株菌株的被膜形成能力和产志贺毒素能力最强。Vero 细胞毒性试验结果表明, 4 个温度条件下, 菌株 2 产志贺毒素能力最弱。菌株 3 在 4 个温度条件下均表现强被膜形成能力和产志贺毒素能力, 尤其在 4 和 10 °C 时, 菌株 3 较其他 2 株菌被膜形成能力强。我国市场零售肉存在 STEC 污染, 部分菌株具有潜在致病性, 尤其是强被膜形成能力、产志贺毒素能力菌株的发现, 应加强对食品加工处理过程中 STEC 的监测。

关键词: 产志贺毒素大肠杆菌; 被膜; 产志贺毒素能力; *stx* 基因

中图分类号: TS 201.3

文献标志码: A

产志贺毒素大肠杆菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)作为一类人兽共患的食源性致病菌, 一旦感染, 患者会出现发热、腹泻症状, 甚至发展为溶血性尿毒综合征(Hemolytic uremic syndrome, HUS)^[1]。其中, 血清型 O157:H7 是 STEC 发现最早、流行趋势最广的致病血清型。如今, 越来越多的非 O157 血清型被发现^[2], 因此, 非 O157 菌株尤其是高致病力菌株逐渐成为关注热点。目前, STEC 已有 400 多种血清分型^[3-4], 但据此无法准确评估菌株的潜在致病力。因此结合分子生物学方法对 STEC 菌株的 *stx* 毒力基因进行分型对精准监管和预测特定 STEC 菌株的感染风险是必要的。

STEC 之所以被划分为危害性大的食源性致病菌, 是因为它具有产志贺毒素(Shiga toxin, Stx)的能力, 低剂量的 Stx 便有很强的致病性。Stx 包

含 2 个没有抗原交叉反应的 Stx1 和 Stx2, 两者氨基酸序列相似度约 60% 且存在不同的亚型。不同志贺毒素亚型的菌株其携带者及致病性存在差异^[5]。如志贺毒素基因亚型 *stx2* 和 *stx2c* 常见于引起 HUS 的菌株; *stx1* 和 *stx2d* 多见于引起人腹泻的菌株, 携带 *stx2e* 的 STEC 多分离自患仔猪水肿病的猪^[6]。在小鼠中, Stx1 的 LD₅₀ > 1 000 ng, 而 Stx2a 的 LD₅₀ 为 6.5 ng, 表明 Stx2a 比 Stx1 具有更强的毒性^[7]。Stx 能够使 Vero 细胞发生病变, 因此可通过 Vero 细胞存活率评估 STEC 所产 Stx 的强弱及生物活性^[8]。利用 CCK-8 试剂盒检测 Vero 细胞毒性试验结果的原理是, 活的哺乳动物细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶被主要试剂 WST-8 还原为高度水溶性的甲瓩产物, 该产物为橙黄色, 产量与活细胞数量成正比^[8]。颜色越浅, 表明 Vero 细胞存活率越低, 则菌株产志贺毒

收稿日期: 2021-05-18

修回日期: 2022-08-21

基金项目: 国家自然科学基金(31972188); 国家重点研发计划(2018YFC1602205); 上海市科学技术委员会上海市“科技创新行动计划”农业领域项目(19391901600); 上海市科技兴农项目(沪农科推字 2017 第 4-4 号); 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056)

作者简介: 张 萍(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: 1018461156@qq.com

通信作者: 刘海泉, E-mail: hqliu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

素能力越强。相较于 MTT 法, CCK-8 试剂盒无需二甲基亚砷溶解, 对人体更为安全。

被膜是大自然中细菌群落最为广泛的存在形式^[9]。研究表明, STEC 菌株能够在不同环境下形成生物被膜, 包括食物表面、食品加工厂管道、加工器械表面及水体中^[10-11], 且被膜形成能力具有明显的菌株差异性^[12]。不同的环境压力, 例如寡营养、低氧和低温条件, 也会影响被膜的形成及 Stx 的产生^[13-14]。有研究指出 STEC 生物被膜形成能力与致病性之间有联系^[15]。因此, 本文探究了 STEC 的被膜形成能力, 并测定其在被膜状态产毒规律的变化, 旨在引起公众对被膜状态的 STEC 潜在危害性的重视。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

1.1.1 菌株来源和细胞来源

3 株产志贺毒素大肠杆菌(序号为 1、2 和 3)由本实验室筛选自市场零售牛肉, 经形态学分析、生化特性以及分子生物学鉴定, 由农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海)保藏。菌株基本信息^[16]见表 1。

Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)购于中国科学院细胞库。

表 1 产志贺毒素大肠杆菌菌株信息

Tab. 1 Properties of 3 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains

菌株序号 Strain	stx 基因型 stx gene	血清型 Serotype	种系分型 Phylogenetic group
1	stx1 + stx2	O45: H2	B1
2	stx1 + stx2	O128: HNT	D
3	stx2	O77: H30	A

1.1.2 试剂和仪器

LB 固体培养基(Luria agar, LA)、LB 液体培养基(Lysogeny broth, LB)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Tryptase soya agar, TSA)购于北京陆桥技术责任有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; PCR Master Mix 购于宝日生物技术(北京)有限公司; 琼脂糖、50 × TAE 缓冲液购于生工生物工程(上海)股

份有限公司; 5% 乙醇购于国药集团化学试剂有限公司; 磷酸盐缓冲液、DMEM (1 ×) 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素 (10 000 U/mL)、0.25% 胰酶购于美国 Thermo Fisher 公司; 1% 结晶紫溶液、二甲亚砷、0.1% 台盼蓝染液购于美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。0.22 μm 过滤器购于美国 PALL 公司; 24 孔板、96 孔板购于美国 Thermo Fisher 公司。

5331 PCR 仪, 艾本德中国有限公司 (Eppendorf); Power HC 电泳仪、ChemiDoc XRS + 凝胶成像系统和凝胶成像分析仪器, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司 (Bio-Rad); BioTek 酶标仪, 美国博腾仪器有限公司 (BioTek); CKX41SF 倒置显微镜, 奥林巴斯(北京)销售服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及增菌

-80 °C 冻存的菌株接种于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 16 ~ 20 h。挑取新鲜单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 200 r/min, 过夜培养。

1.2.2 志贺毒素基因亚型分析

用细菌基因组提取试剂盒提取细菌株总 DNA, 采用传统 PCR 技术, 对菌株进行 stx1、stx2 基因亚型的扩增。PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳确定其基因大小及纯度。引物序列及反应条件^[5, 17]见表 2, 无酶水为空白对照。

1.2.3 多位点序列分型 (MLST) 分析

用细菌基因组提取试剂盒提取细菌株总 DNA, 根据 Warwick 分型方案, 选择 7 个管家基因 *adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* 和 *recA* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) 进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳确认基因大小及纯度, 无酶水做空白对照。

PCR 阳性产物送至上海生工有限公司进行测序。通过 DNAMAN 软件将管家基因正向序列、反向序列进行比对、拼接, 上传至大肠杆菌 MLST 网站 (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), 与数据库中的等位基因序列号及序列型 (ST) 比对。引物扩增序列见表 3^[18]。

表 2 *stx* 亚型基因传统 PCR 所用引物列表Tab. 2 Oligo nucleotides for screening the *stx* variant genes used in this study

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物长度 Fragment size/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
<i>stx1a</i>	ATGAAAAAACATTATTAATAG AGCTATTCTGAGTCAACG	272	52
<i>stx1c</i>	GAACGAAATAATTTATATGT CTCATTAGGTACAATTCT	555	48
<i>stx1d</i>	CTTTTCAGTTAATGCGATTGCT AACCCCATGATATCGACTGC	192	62
<i>stx2a</i>	AGATATCGACCCCTCTTGAA GTCAACCTTCACTGTAATG	969	60
<i>stx2b</i>	TATACGATGACACCGGAAGAAG CCTCGATTTCAGAAAAGCAGC	300	65
<i>stx2c</i>	TTTATATACAACGGGTA GGCCACTTTTACTGTGAATGTA	163	51
<i>stx2d</i>	CTTTATATACAACGGGTG CTGAATTGTGACACAGATTAC	359	54
<i>stx2e</i>	CAGGAAGTTATATTTCCGTAGG GTATTCTCTTCTGACACCTTC	911	55
<i>stx2f</i>	TTTACTGTGGATTCTCTTCGC TCAGTAAGATCCTGAGGCTTG	875	61
<i>stx2g</i>	GTTATATTTCTGTGGATATC GAATAACCGTACAGTA	573	55

表 3 MLST 分型的 7 个管家基因引物列表

Tab. 3 Oligo nucleotides for 7 housekeeping genes for MLST used in this study

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增产物长度 Fragment size/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
<i>adhk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583	54
<i>fumC</i>	TCACAGTTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTTC	806	54
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCCTTACCGGCATC	911	60
<i>icd</i>	ATGGAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	54
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCCGAGTCTCGGCGTCTGCGGG TTAACGAACTCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	932	60
<i>purA</i>	CGCGTGTATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816	54
<i>recA</i>	CGCATTGCTTTACCCGTGACC TCGTGAAATCTACGGACCGGA	780	58

1.2.4 生物被膜的形成能力的测定

无菌 LB 液体培养基调整过夜培养的 STEC 增菌液至 0.5 麦氏比浊度(约 1.5×10^8 CFU/mL),作为接种液备用。

接种液与无菌 LB 液体培养基按体积比 1:100 混匀,移取 1 mL 至 24 孔板中。分别在 4、10、25 和 37 °C 恒温培养箱静置培养 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 d 后,利用结晶紫染色法^[16, 19]测定形成的生物被膜量。每组 3 个平行,无菌 LB 液体

培养基为空白对照。

培养结束后,取出 24 孔板,避免晃动。小心去除悬浮液,无菌 1 × PBS 轻柔洗涤被膜 3 次,去除未黏附的浮游菌。50 °C 烘箱烘干 15 min,每孔加入 1 mL 0.1% 结晶紫染液,染色 30 min。染色结束后,去除结晶紫染液,无菌 1 × PBS 轻柔洗涤 3 次。室温干燥 15 min,每孔加入 1 mL 95% 乙醇,溶解与被膜结合的结晶紫染液。溶解 15 min 后,移取 200 μL 至 96 孔板中,酶标仪测定波长

600 nm 处的吸光值。

设定空白值 + 3 倍标准偏差为截点 (OD_c)，被膜形成能力基于此划分为 4 个等级：无被膜形成能力 ($OD \leq OD_c$)；弱被膜形成能力 ($OD_c < OD \leq 2OD_c$)；中等被膜形成能力 ($2OD_c < OD \leq 4OD_c$)；强被膜形成能力 ($OD > 4OD_c$)。

1.2.5 被膜态细菌培养物上清液的提取

被膜培养结束后，取出孔板，避免晃动。细胞刮刀刮下被膜，吹打均匀，收集至离心管中，4 °C，4 000 × g，离心 30 min。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，取滤液划线于 TSA 平板上，验证上清滤液中是否有细菌。收集无菌滤液，-20 °C 保存备用。

1.2.6 Vero 细胞毒性试验

Vero 细胞的培养：取出液氮冻存的 Vero 细胞复苏传代，制备 1×10^5 cells/mL 的单细胞悬液，铺板，37 °C，5% CO₂ 条件的培养箱中培养 24 h。取出孔板，100 μL 1 × PBS 洗涤 3 次，加入 100 μL 细胞完全培养液，加入 10 μL 上清液样品。37 °C，5% CO₂ 条件的培养箱中孵育 24 h。取出孔板，细胞完全培养液洗涤孔板 3 次，加入 1:10 体积比预混的细胞完全培养液 (CCK8 溶液)，37 °C，5% CO₂ 条件的培养箱孵育 2 h，在 450 ~ 630

nm 处测量其吸光值并记录。无细胞，仅有细胞完全培养液的为空白对照，细胞 + 细胞完全培养液为阴性对照。

细胞的存活率 (C) 计算公式：

$$C(\%) = 100 \times (T - T_0) / (T_c - T_0) \quad (1)$$

式中： T 为各检测孔 OD 值， T_0 为空白组 OD 值； T_c 为对照组 OD 值；各孔检测 OD 值为 6 个平行孔 $OD_{630} - OD_{450}$ ，去除最值，取其平均值，空白组即为细胞完全培养液 + CCK-8，无细胞；对照组即为单细胞悬液 + CCK-8。

1.3 数据处理

采用 MS Excel 2019 对数据进行整理，SPSS 25.0 软件对实验数据进行显著性差异分析， $P < 0.05$ 为差异显著。通过 Origin 2021 (Learning edition) 作图分析。

2 结果

2.1 志贺毒素基因亚型检测结果

菌株 1 和菌株 2 携带 $stx1 + stx2$ 基因， $stx1$ 基因亚型分析显示，菌株 1 为 $stx1c$ 亚型，菌株 2 未能分型， $stx2$ 基因亚型分别是 $stx2d$ 和 $stx2f$ 。菌株 3 仅携带 $stx2$ 基因，亚型分析显示为 $stx2e$ 亚型 (表 4)。

表 4 STEC 分离株志贺毒素基因亚型检测结果
Tab. 4 The *stx* variant genotype of STEC isolates in this study

菌株序号 Strain	<i>stx</i> 基因亚型 <i>stx</i> gene variant	管家基因 Allele							ST 型 ST
		<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
1	$stx1c + stx2d$	6	29	5	26	24	8	6	937
2	$stx1^* + stx2f$	6	31	5	28	1	129	2	4441
3	$stx2e$	6	7	57	1	8	8	2	540

注：* 表示使用已知 PCR 分型引物检测均为阴性。

Notes: * above means the PCR result of *stx* gene variant was negative.

2.2 MLST 分析

MLST 将 3 株 STEC 分离株分为 3 种不同的 ST 型：ST 937、ST 4441 和 ST 540 (表 4)。ST 型间存在 3 个以上等位基因的差异，亲缘关系较远。

2.3 被膜形成能力分析

通过结晶紫染色试验监测 STEC 生物被膜在不同温度下随着时间变化的动态形成过程 (图 1)。4 °C 和 10 °C [图 1(a)] 和 [图 1(b)] 时，菌株 3 被膜生成量最多，分别在 5 ~ 8 d 和 2 ~ 8 d 为强被膜形成能力，6 d 和 5 d 被膜生成量达到最大值，后缓慢减少。菌株 1 和菌株 2 除了被膜生成量峰值 (5 d)，均表现为弱或者无被膜形成能力。

4 °C 时，菌株 1 和菌株 2 被膜生成量 0.5 ~ 8 d 无显著差异 ($P > 0.05$)。10 °C 时，菌株 1 和菌株 2 的被膜生成量在 2、3、5、6、7 和 8 d 无显著差异 ($P > 0.05$)。在低温培养条件下，菌株 3 的被膜形成能力最强，菌株 1 和菌株 2 随着时间增长被膜形成能力相近且稳定。

在 25 °C 和 37 °C (图 1c 和 1d) 时，3 株菌株均表现出强被膜形成能力。25 °C 时，被膜生成量峰值从高到低依次为菌株 1 (7 d)、菌株 3 (5 d) 和菌株 2 (4 d)。菌株 1 在 0.5 ~ 2 d 为弱被膜形成能力且被膜生成量无显著差异 ($P > 0.05$)，4 ~ 8 d 为强被膜形成能力，4 ~ 7 d 被膜生成量明显增

加($P < 0.05$)。菌株 2 的被膜形成在 0.5 ~ 2 d 与菌株 1 无显著差异,3 ~ 5 d 为强被膜形成能力,6 ~ 8 d 为中等被膜形成能力且被膜生成量无显著差异($P > 0.05$)。菌株 3 在 0.5 ~ 8 d 为强被膜形成能力,被膜生成量在 0.5 ~ 5 d 均高于其他菌株,6 ~ 8 d 低于菌株 1。

37 °C 时,被膜生成量峰值从高到低依次为菌

株 2(1 d)、菌株 3(3 d)和菌株 1(3 d),1 ~ 7 d(4 d 除外)菌株间被膜生成量有显著性差异($P < 0.05$)。菌株 1 和菌株 3 在 1 ~ 8 d 是强被膜形成能力,3 ~ 8 d 被膜生成量最高。菌株 2 在 0.5 ~ 6 d 为强被膜形成能力且被膜生成量变化最大。结果表明,同一温度,不同菌株的被膜生成量和被膜形成能力有显著性差异。

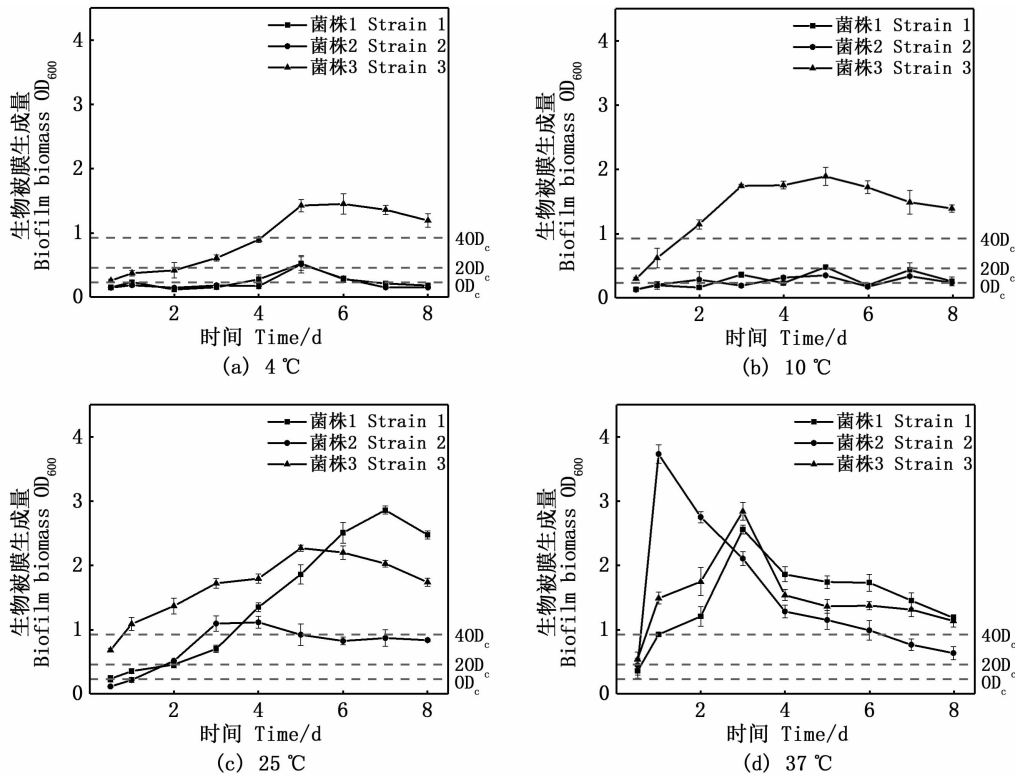


图 1 不同温度下产志贺毒素大肠杆菌的被膜形成能力

Fig. 1 Biofilm forming ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* at different temperature

由图 2 可以看出,温度能够影响菌株的被膜生成量和被膜形成能力。菌株 1 和菌株 2 在 37 °C 或 25 °C 时被膜形成能力均强于 4 °C 和 10 °C,被膜生成量在 2 ~ 8 d 有显著性差异($P < 0.05$)。菌株 3 的被膜生成量在 1 ~ 3 d 时,从高至低依次为 37 °C、25 °C、10 °C 和 4 °C。在 37 °C 时,其被膜生成量在第 4 天开始减少,5 ~ 8 d 降低至与 4 °C 无显著差异($P > 0.05$),但仍然是强被膜形成能力。较菌株 1 和菌株 2,菌株 3 在 4 个温度下至少能够连续 4 天表现出强被膜形成能力。3 株菌株在 37 °C 的被膜生成量分别在 5 d、7 d 和 4 d 时开始小于 25 °C,其中菌株 1 在 25 °C 的被膜生成量峰值(7 d)高于 37 °C。

2.4 被膜态产志贺毒素能力分析

图 3 表示的是被膜态 STEC 培养物上清液处理 Vero 细胞后的细胞存活率,细胞存活率越低,表明上清液毒性越大,菌株产志贺毒素能力越强;反之越弱。

结果表明:同一温度下,随着天数增加,细胞存活率降低,菌株的产志贺毒素能力增强。从 4 个培养温度连续 9 个时间点的细胞存活率变化趋势来看,被膜在 0.5 ~ 8 d 的形成过程中,3 株 STEC 菌株的产志贺毒素能力有显著性差异($P < 0.05$),且菌株 2 的细胞存活率显著低于菌株 1 和菌株 3,表明菌株 2 的产志贺毒素能力最弱。4 °C [图 3(a)] 时,菌株 1 在 0.5 d 时产志贺毒素能

力明显强于菌株 3 ($P < 0.05$), 1 ~ 8 d 后其细胞存活率高于菌株 3, 除了 1 d 和 7 d, 其余时间点无显著差异 ($P > 0.05$)。10 °C [图 3(b)], 除了 0.5 d, 菌株 1 和菌株 3 的产志贺毒素能力无显著差异 ($P > 0.05$)。25 °C [图 3(c)], 除了 5 d, 菌株 1 和菌株 3 的产志贺毒素能力无显著差异 ($P > 0.05$)。37 °C [图 3(b)] 时, 菌株 1 和菌株 3 在 0.5 ~ 8 d 的产志贺毒素能力无显著差异 ($P > 0.05$)。值得注意的是, 25 °C 和 37 °C 时, 菌株 2

在 1 d 的产志贺毒素能力弱于 0.5 d。菌株 1 和菌株 3 产志贺毒素能力相近。菌株 2 产志贺毒素能力变化区间较菌株 1 和菌株 3 大。4 °C 时, 菌株 2 细胞存活率从 94.71% (0.5 d) 降低到 66.98% (8 d), 变化了 27.73%。菌株 1 细胞存活率从 66.45% (0.5 d) 降低到 51.21% (8 d), 变化了 15.24%。菌株 3 从 73.60% (0.5 d) 降低到 50.75% (8 d), 变化了 22.85%。

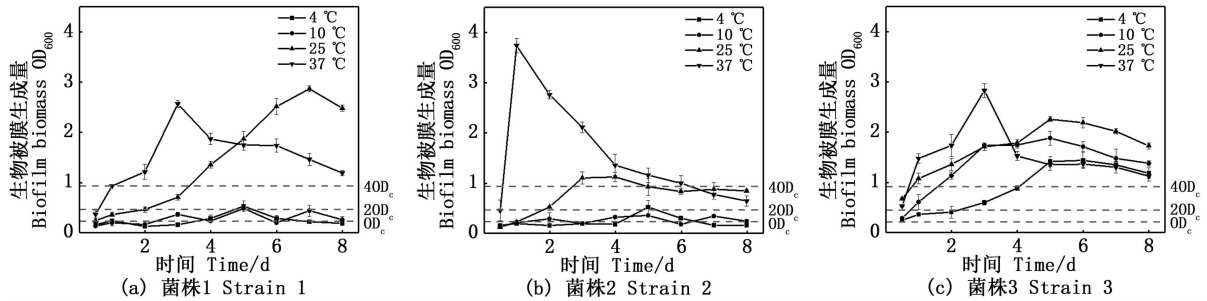


图 2 产志贺毒素大肠杆菌在不同温度被膜形成能力的比较

Fig. 2 Biofilm forming ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* at different temperature

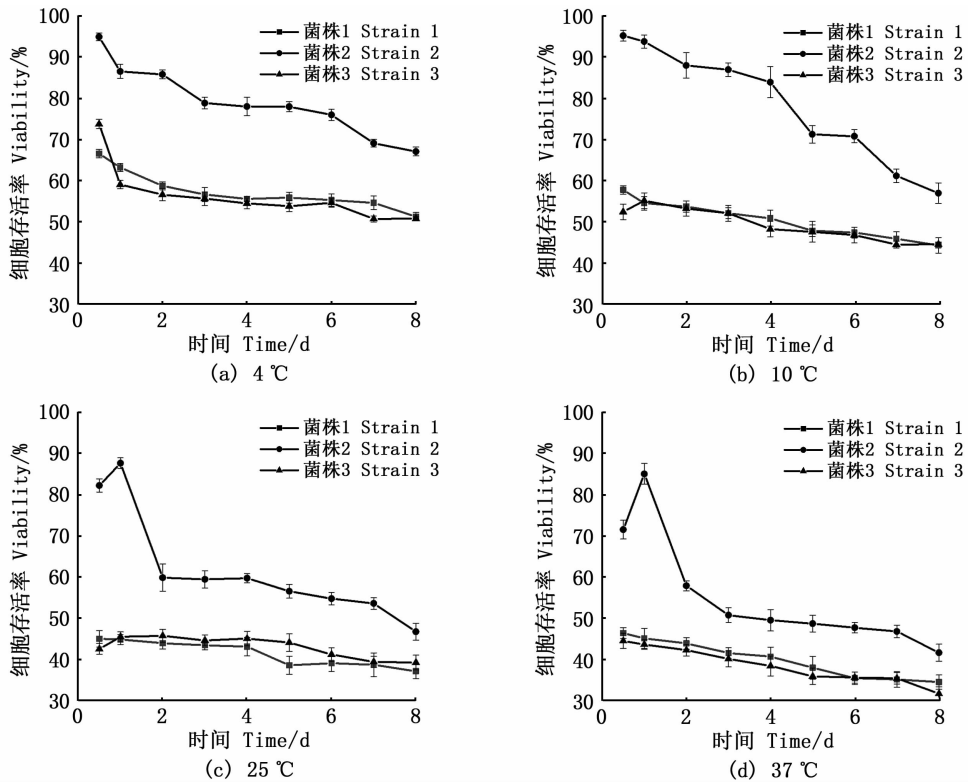


图 3 被膜态不同温度产志贺毒素大肠杆菌产生的志贺毒素对 Vero 细胞毒性的比较

Fig. 3 Comparison of cytotoxicity of Vero cells treated with Stx collected from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in biofilm condition at different temperature

图 4 为同一菌株在不同温度下其产志贺毒素能力的差异,温度越高,细胞存活率越低,STEC 产志贺毒素能力越强。其中菌株 2 [图 4(b)]产志贺毒素能力受温度影响最大。0.5 d 时,菌株 2 在 4 °C 和 37 °C 下的细胞存活率相差 50.32%,8 d

时相差 35.38%。菌株 1 [图 4(a)]在 25 °C 和 37 °C 时细胞存活率差异不明显,表明其产志贺毒素能力相近。菌株 3 [图 4(c)],4 个温度条件下,2~8 d 的产志贺毒素能力差异明显($P < 0.05$)。

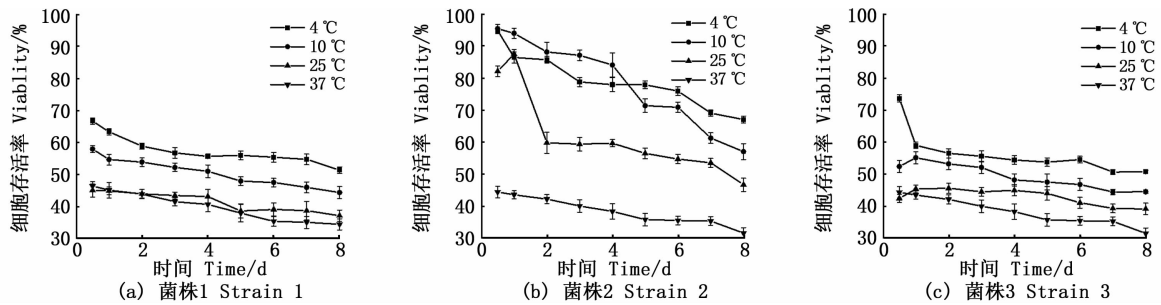


图 4 被膜态产志贺毒素大肠杆菌在不同温度产生的志贺毒素对 Vero 细胞毒性的比较

Fig. 4 Comparison of cytotoxicity of Vero cells treated with Stx collected from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in biofilm condition at different temperature

3 讨论

许多国家和地区报道过不同肉类食品中分离检测出 STEC。在欧美国家,牛肉作为最常见的食用肉类,是 STEC 重要的感染源^[20-21]。在我国,市场零售肉类也存在不同程度的 STEC 污染,熟肉在加工处理过程中存在被 STEC 污染的风险^[22]。3 株零售牛肉源的非 O157 STEC 检出鉴定表明我国零售肉市场上存在 STEC 污染情况,且菌株之间亲缘关系较远,具有遗传多样性。考虑到非 O157 STEC 菌株在活体动物和食品中高流行、人群中低发病率的特点^[21],我们应该加强不同食品 STEC 的检测,严格监督加工链中的卫生安全,预防 STEC 引起的食源性疾病的暴发及流行。

Stx 是 STEC 的主要致病物质,可以与丙糖酰基鞘氨醇 (Globotriaosylceramide, Gb3) 受体结合,通过胞吞进入靶细胞抑制蛋白质合成,从而导致细胞损伤或死亡。Stx 存在不同亚型,其对人的致病性有所差异,如 *stx2a* 亚型与出血性肠炎、HUS 等疾病密切相关,携带 *stx2e*、*stx2f* 和 *stx2g* 亚型的菌株则具有低致病性^[22];携带 *stx2* 基因的菌株,比同时携带 *stx1 + stx2* 或者 *stx1* 的菌株致病率更高^[23]。同一种系的菌株拥有类似的基因型、表型、生活史和致病性。提示菌株可能具有潜在致病性^[24]。所以毒力基因的携带情况对精准预

估 STEC 菌株的致病力有重要作用^[25-26]。

在含有蛋白质、碳水化合物和胞外 DNA 的环境中,细菌能够结合在食品加工器械的不锈钢和高分子材料表面并形成生物被膜^[27]。形成生物被膜的细菌对热处理、冷刺激和消毒剂等的耐受性增加^[28]。有研究^[29]表明,经历常规的清洗程序后其生物活性仍然保留,这极大的增加了食品污染的可能性,进而对食品卫生和安全造成潜在威胁。

解范迪等^[30]从腹泻患者粪便标本中分离出 78 株 STEC,其中 73.1% 的菌株能够产生被膜,其耐药率明显高于不产被膜的 STEC 菌株,因此,应该关注 STEC 被膜形成能力及其被膜状态下的产志贺毒素能力的变化。

除了室温条件,市场零售肉类多保存在 5~15 °C 的低温环境下^[31],所以选取了在 4、10、25 和 37 °C 检测其被膜形成能力和产志贺毒素能力。在 4 °C 和 10 °C 下,菌株 1 和菌株 2 的被膜生成量无显著差异,均为弱或者无被膜形成能力,菌株 1 的产志贺毒素能力强于菌株 2。弱或者无被膜形成能力的菌株 1 和强被膜形成能力的菌株 3 产志贺毒素能力相近,均强于菌株 2。这表明,被膜形成能力的强弱与产志贺毒素能力的强弱无明显关联。有可能是低温条件下细菌的生长速度减缓,从而细菌量有差异,导致了被膜形成能力和产志贺毒素能力的不同。25 °C 和 37 °C

时,STEC 的被膜形成能力和产志贺毒素能力显著增强。被膜形成能力增强主要体现在被膜生成量峰值增加和提前,产志贺毒素能力的增强体现在 0.5 和 8 d 时,Vero 细胞存活率的降低。

编码 Stx 的 *stx* 基因位于 STEC 染色体的前噬菌体基因组中,该前噬菌体具有转导能力,可以使受体菌获得产生相应毒素的能力。有研究^[32]表明,编码 *stx* 基因的前噬菌体在生物膜中转移到潜在致病性大肠杆菌中,导致新的 STEC 菌株出现。这表明被膜可以成为基因水平转移的环境,因此,在实际食品生产加工环境中,强被膜形成能力、产志贺毒素能力的 STEC 的潜在危害性更需引人注目。

参考文献:

- [1] ETCHEVERRÍA A I, PADOLA N L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization[J]. *Virulence*, 2013, 4(5): 366-372.
- [2] MAJOWICZ S E, SCALLAN E, JONES-BITTON A, et al. Global Incidence of human shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(6): 447-455.
- [3] LEOTTA G A, MILIWEBSKY E S, CHINEN I, et al. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8(1): 46.
- [4] MORA A, BLANCO M, BLANCO J E, et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003[J]. *BMC Microbiology*, 2007, 7(1): 13.
- [5] SCHEUTZ F, TEEL L D, BEUTIN L, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing Stx nomenclature [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(9): 2951-2963.
- [6] FRATAMICO P M, BAGI L K, BUSH E J, et al. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's swine 2000 study [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7173-7178.
- [7] FULLER C A, PELLINO C A, FLAGLER M J, et al. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency [J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(3): 1329-1337.
- [8] 刘素贞,曹晓敏,许丽娟,等.应用 CCK8 法检测鸡淋巴细胞活性的检测最佳条件研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(7): 212-214.
LIU S Z, CAO X M, XU L J, et al. [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(7): 212-214.
- [9] OTOOLE G, KAPLAN H B, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 49-79.
- [10] VOGELEER P, TREMBLAY Y D N, MAFU A A, et al. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 317.
- [11] HOUDT R V, MICHELS C W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(4): 1117-1131.
- [12] VOGELEER P, VINCENT A T, CHEKABAB S M, et al. Regulation of *waaH* by PhoB during P_i starvation promotes biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(18): e00093-19.
- [13] WANG J Y, STANFORD K, MCALLISTER T A, et al. Biofilm formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of nine serogroups of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2016, 13(6): 316-324.
- [14] RYU J H, KIM H, FRANK J F, et al. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(4): 359-362.
- [15] VILLEGAS N A, BARONETTI J, ALBESA I, et al. Relevance of biofilms in the pathogenesis of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection [J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 607258.
- [16] NONG F L, ZHANG P, MENG J, et al. Characterization of shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail raw meats in Southeast China [J]. *Food Control*, 2021, 126: 108061.
- [17] 白向宁. 中国动物源性产志贺毒素大肠杆菌的分离及菌株特征分析 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2013.
BAI X N. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals in China [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2013.
- [18] 蒋沁爻. 耐碳青霉烯类大肠埃希菌的耐药机制及其同源性分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
JIANG Q W. Antimicrobial-resistant mechanism and homology analysis of carbapenem-resistant *Escherichia coli* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [19] LI Y F, TAN L, GUO L, et al. Acidic electrolyzed water more effectively breaks down mature *Vibrio parahaemolyticus* biofilm than DNase I [J]. *Food Control*, 2020, 117: 107312.
- [20] BUMUNANG E W, MCALLISTER T A, ZAHEER R, et al. Characterization of non-O157 *Escherichia coli* from cattle faecal samples in the north-west province of south Africa [J]. *Microorganisms*, 2015, 7(8): 272.

- [21] MOMTAZ H, DEHKORDI F S, RAHIMI E, et al. Incidence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat [J]. *Meat Science*, 2013, 95 (2): 381-388.
- [22] 白向宁, 王红, 赵爱兰, 等. 食源性产志贺毒素大肠杆菌的分离及菌株特征分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(4): 312-317.
- BAI X N, WANG H, ZHAO A L, et al. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates in foods [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(4): 312-317.
- [23] ORTH D, GRIF K, KHAN A B, et al. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007, 59 (3): 235-242.
- [24] CHAHED A, GHAFIR Y, CHINA B, et al. Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999 to 2003 [J]. *Euro Surveillance: Bulletin Européen sur les Maladies Transmissibles*, 2005, 10(3): 33-36.
- [25] TENAILLON O, SKURNIK D, PICARD B, et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli* [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(3): 207-217.
- [26] DONG H J, LEE S, KIM W, et al. Prevalence, virulence potential, and pulsed-field gel electrophoresis profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle [J]. *Gut Pathogens*, 2017, 9(1): 22.
- [27] VOGEELEER P, TREMBLAY Y D N, JUBELIN G, et al. Biofilm-forming abilities of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with human infections [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(5): 1448-1458.
- [28] WANG R, LUEDTKE B E, BOSILEVAC J M, et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from high-event period beef contamination have strong biofilm-forming ability and low sanitizer susceptibility, which are associated with high pO157 plasmid copy number [J]. *Journal of Food Protection*, 2016, 79(11): 1875-1883.
- [29] GIBSON H, TAYLOR J H, HALL K E, et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(1): 41-48.
- [30] 解范迪, 牛术孟, 施锦杰, 等. 产志贺毒素大肠埃希菌生物被膜形成能力与毒力基因表达的关系 [J]. *检验医学*, 2015, 30(6): 617-621.
- XIE F D, NIU S M, SHI J J, et al. Relationship between STEC biofilm formation ability and the expression of virulence genes [J]. *Laboratory Medicine*, 2015, 30(6): 617-621.
- [31] DI BONAVENTURA G, PICCOLOMINI R, PALUDI D, et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(6): 1552-1561.
- [32] SOLHEIM H T, SEKSE C, URDAHL A M, et al. Biofilm as an environment for dissemination of *stx* genes by transduction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (3): 896-900.

Analysis of Shiga toxin-producing ability of 3 biofilm strains of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*

ZHANG Ping¹, NONG Fangli¹, DU Ming², ZHAO Yong^{1,3,4,5}, LIU Haiquan^{1,3,4,5}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 4. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry and Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 5. Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a zoonosis and food-borne pathogenic bacterium. It is necessary to understand its characteristics and potential pathogenicity and analyze the production ability of Shiga toxin (Stx) in the biofilm state. The traditional PCR was performed to amplify the *stx* variant gene subtype. The results showed that strain 1 carried *stx1c + stx2d* subtype, strain 2 carried *stx1 + stx2f* subtype, and strain 3 carried *stx2e* subtype. The results of multilocus sequence typing (MLST) showed that the three strains were relatively distantly related and possessed genetic diversity. The crystal violet staining test and the cytotoxicity test of Vero cell were used to explore the biofilm-forming ability and Stx-producing ability at 4 °C, 10 °C, 25 °C, and 37 °C. It showed that temperature significantly affected the biofilm-forming ability and Stx-producing ability. All STEC strains had the strong ability of biofilm formation and Stx production at 37 °C. The results of the cytotoxicity test of Vero cell showed that strain 2 had the weakest Stx-producing ability under the four different temperature conditions and strain 3 showed strong biofilm-forming ability and Stx-producing ability. Especially at 4 °C and 10 °C, strain 3 had the strongest biofilm-forming ability compared to strain 1 and strain 2. Retail meat in China is contaminated with STEC which could be potentially pathogenic. Especially with the discovery of strains with strong biofilm-forming ability and Stx-producing ability, we should strengthen the monitoring of STEC during food processing.

Key words: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC); biofilm; Stx-producing ability; *stx* gene