

原料乳及其牧场环境中荧光假单胞菌 生物膜环境适应性变化

邱月¹, 黄镇¹, 陈琛¹, 关宁², 裴晓燕², 杨鑫焱^{1,3}, 姜毓君^{1,3*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 国家乳业技术创新中心, 内蒙古呼和浩特 010000)

(3. 国家市场监督管理总局重点实验室(婴幼儿配方食品), 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 该研究首先对我国三个区域中 6 家牧场的原料乳及其牧场环境样品进行采集, 进而对分离出的 *P. fluorescens* 进行分型分析并评估其生物膜形成能力, 筛选出具有代表性的菌株。通过不同的培养温度, 培养条件和培养表面探究 *P. fluorescens* 生物膜的环境适应性。结果表明, 共分离出 25 株 *P. fluorescens*, 分为 5 个 ST 型, 其中, *P. fluorescens* 18 在 24 h 和 36 h 成膜能力更具有稳定性, 且 OD 值均显著高于其他菌株。*P. fluorescens* 18 在 25、15、4 °C 下的胰蛋白胨大豆肉汤、脱脂乳、全脂乳培养基中均能产生生物膜, 但生成能力不同, 培养时间为 36 h 时, 低温抑制 *P. fluorescens* 18 生物膜胞外物质形成, 培养基为乳基时会促进 *P. fluorescens* 18 生物膜胞外物质形成。扫描电镜结果显示, *P. fluorescens* 18 在不锈钢、玻璃和塑料表面上形成生物膜的附着能力不同, 分别是不锈钢>玻璃>塑料。因此, 原料乳及其牧场环境中分离出的野生 *P. fluorescens* 在生产过程中在乳培养基中存在生成生物膜的风险, 且在不锈钢表面生成风险更高。该研究为今后野生荧光假单胞菌的危害性研究提供了基础。

关键词: 原料乳; 荧光假单胞菌; 生物膜; 环境适应性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1604

Environmental Adaptability of *Pseudomonas fluorescein* Biofilm Isolated From raw Milk and Pasture Environment

QIU Yue¹, HUANG Zhen¹, CHEN Chen¹, GUAN Ning², PEI Xiaoyan², YANG Xinyan^{1,3}, JIANG Yujun^{1,3*}

(1.College of Food Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

(2.National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010000, China)

(3.Key Laboratory of Infant Formula Food, State Administration for Market Regulation, Harbin 150030, China)

Abstract: In this study, raw milk and farm environment samples were collected from 6 farms in three regions of China, and then the isolated *P. fluorescens* was classified and its biofilm forming ability was evaluated, and representative strains were screened. The environmental adaptability of *P. fluorescens* biofilm was investigated by different culture temperatures, conditions and surface. The results showed that 25 strains of *Pseudomonas fluorescens* were isolated and divided into 5 ST types. Among them, *P. fluorescens* 18 had more stable biofilm forming ability at 24 h and 36 h, and OD values were significantly higher than other strains. *P. fluorescens* 18 can produce biofilm in TSB medium, skim milk medium and whole milk medium at 25, 15 and 4 °C, but the production capacity is different. When the culture time is 36 h, low temperature can inhibit the formation of extracellular substances of biofilm of *P. fluorescens* 18, and the extracellular substances of biofilm of *P. fluorescens* 18 can be promoted when the medium is milk-based. The results of scanning electron microscopy showed that the adhesion ability of *P. fluorescens* 18 to form biofilm on the surface of stainless steel, glass and plastic was different, respectively, stainless steel>glass>plastic. Therefore, there is a risk that *P. fluorescens* isolated from raw milk and farm environment will form biofilms in milk medium during production, and the risk is higher on stainless steel surfaces. This study provides a basis for the future study of the harmfulness of wild *P. fluorescens*.

Key words: raw milk; *Pseudomonas fluorescens*; biofilm; environmental adaptability

原料乳作为液态乳生产的原料是品质保障的基础, 其营养丰富特点可至其中的腐败微生物随着储藏时间的

收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2024-12-22; 接受日期: 2024-12-23

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目 (U21A20272); 黑龙江省博士后面上项目 (LBH-Z22081)

作者简介: 邱月 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳制品微生物, E-mail: 2388965110@qq.com

通讯作者: 姜毓君 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学, Email: yujun_jiang@163.com

延长而大量繁殖。在原料乳进入贮奶罐之前, 奶牛乳房中的乳汁被认为是无菌状态, 但现在越来越多针对原料乳的研究发现从健康奶牛乳房挤出的原料乳中存在微生物种群^[1]。原料乳及其牧场环境中微生物多样性丰富, 已确定的微生物种类就超过 150 多种^[2,3], 如假单胞菌属、黄杆菌属、沙雷氏菌属、肉毒杆菌属、白色念珠菌属、乳球菌属、链球菌属和芽孢杆菌等, 以假单胞菌属为代表的嗜冷菌可以在原料乳低温储藏过程中大量繁殖, 其产生的耐热酶在热处理后仍会分解乳制品中的蛋白质、脂肪等营养物质, 导致乳制品产生凝胶化和酸败现象, 缩短乳制品保质期。部分嗜冷菌如 *P. fluorescens* 会产生生物膜^[4], 并通过形成细胞外聚物质 (Extracellular Polymeric Substances, EPS) 增强酶的热稳定性^[5], 传统的灭菌工艺无法破坏已经定植的生物膜和包裹在生物膜内的 *P. fluorescens*。

P. fluorescens 是主要的产生生物膜的嗜冷菌^[6,7], 其在低温条件下生长较活跃并能产生大量胞外多糖^[8], 有助于黏附在设备表面并抵御就地清洗 (Cleaning In Place, CIP) 的影响。据报道, *P. fluorescens* 可以在多种食品接触表面产生生物膜, 如不锈钢、聚苯乙烯和玻璃^[9,10], 这使得食品加工厂的清洗消毒工作更加困难且复杂。在乳制品行业, 细菌附着在原料乳储藏罐和管道的不锈钢内表面会形成单菌种或多菌种嗜冷菌^[7,11]。生物膜形成后, 会对传统的物理、化学消杀手段产生抵抗作用, 很难达到彻底清除的效果^[12,13]。细菌形成生物膜还会导致乳制品缩短保质期、分泌蛋白酶或脂肪酶而改变产品感官特性、使细菌产生致病性及腐蚀金属表面^[14,15]。

本研究以从牧场采集的原料乳及其环境位点中分离出来的野生型 *P. fluorescens* 为研究对象, 基于生物膜形成能力评估, 筛选出一株生物膜生成能力最强的 *P. fluorescens* 并确定其最佳生长时间。在此基础上, 研究该菌株在不同的温度 (25、15、4 °C) 和不同的培养基 (TSB (Tryptic Soy Broth, TSB)、脱脂乳、全脂乳) 生物膜形成能力和生物膜 EPS 含量, 同时研究该菌株在不同材料表面 (不锈钢、玻璃和塑料) 生物膜形态区别, 以期为后续 *P. fluorescens* 的防控提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

TSB 培养基, 青岛海博生物技术有限公司; Luria-Bertani 液体培养基 (Luria-Bertani, LB), 青岛海博生物技术有限公司; 无水乙醇, 天津致远化学试剂有限公司; 甲醇, 天津致远化学试剂有限公司; 质量分数为 0.1% 结晶紫染色液, 白鲨生物科技有限公司; PBS 缓冲液, 北京索来宝生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司。

Bcn1360 型生物超净工作台, 美国德宇仪器制造公司; 精密电子天平 (0.0001 g), 梅特勒-托利多国际贸易有限公司; 低温冷冻离心机, 美国 Sigma-Aldrich 公司; GR85DA 型高压蒸汽灭菌锅, 安阳三强器械有限公司; ZHWY200B 型恒温培养摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美谷分子仪器有限公司; S-3400N 型场发射扫描电子显微镜, 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料乳及环境样本采集

原料乳采集自中国东北、华北和华东三个区域共 6 家牧场, 除采集 6 家牧场新鲜收集的原料乳以外, 每个牧场的采样位点有卧床土、吸奶器、药浴前后乳头、工作人员手套和运奶车的奶罐口, 6 处位点。采集的样本 4 °C 下运送回实验室后直接进行样品分装和微生物培养, 其中原料乳样本到达实验室后立即在超净工作台无菌分装至 50 mL 无菌离心管储存于 -20 °C, 环境样本直接储存于 -20 °C。

1.2.2 原料乳及环境样本嗜冷菌微生物培养及 DNA 鉴定

原料乳样本: 将 9 mL 质量分数为 0.1% 无菌 NaCl 溶液置于 15 mL 无菌离心管中, 加入 1 mL 原料乳样品, 使用涡旋振荡器混合均匀后, 将样品梯度稀释至 10^{-5} 。在不同梯度的样品中分别取 100 μ L, 在提前制备的 LB 平板计数培养基上进行均匀涂布, 将培养基倒置培养。培养环境为需氧条件, 培养温度为 7 °C, 培养时间为 10 d, 在培养后的平板上挑取单一菌落, 并进行划线制备 LB 菌悬液, 等待提取 DNA 进行 16S rDNA 鉴定。

环境样本: 将 9 mL 质量分数为 0.1% 无菌 NaCl 溶液置于 15 mL 无菌离心管中, 加入 1 mL 菌悬液, 使用涡旋振荡器混合均匀后, 将样品梯度稀释至 10^{-5} 。其他处理步骤与原料乳样本一致。

DNA 提取及 16S rDNA 鉴定：使用 TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒完成核酸的提取。利用通用引物 27F 和 1492R 对提取的单一菌落 DNA 进行 PCR 扩增。引物序列、PCR 扩增体系及条件如表 1 所示。将 PCR 扩增产物低温保存，送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行纯化和双向测序，对测序得到的序列进行拼接。将拼接后的嗜冷菌菌株基因序列提交，在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对，选取与参考菌株序列相似性大于 99% 为鉴定阈值确定菌株的分类学地位。

表 1 引物序列、PCR 扩增体系及条件

Table 1 Primer sequences and PCR amplification system

引物序列 (5'-3')	PCR 扩增体系	PCR 扩增条件
27 μ L ddH ₂ O		
27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16 μ L 2 $\times$ Taq PCR MasterMix	94 $^{\circ}$ C 5 min, 35 $\times$ (94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C
1492R: TACGGCTACCTTGTACGACTT	DNA 模板 5 μ L	1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 72 $^{\circ}$ C 10 min
上下游引物各 1 μ L		

1.2.3 *P. fluorescens* 多位点序列分型及生物膜形成能力分析

利用 *P. fluorescens* 的 7 对管家基因引物对提取的不同菌株 DNA 进行特异性扩增，基因分别为：*glnS*、*gyrB*、*ileS*、*nuoD*、*recA*、*rpoB* 和 *rpoD*。引物序列如表 2 所示，扩增体系及条件与 16S rRNA PCR 反应相同。随后将 PCR 产物进行送样测序分析，单向测通，得到菌株 7 个管家基因的核酸序列。登录假单胞菌的 MLST 数据库 (<https://www.pubmlst.org/pseudomonas>)，选择分型序列查询功能，对每株假单胞菌的 7 个管家基因测序结果进行查询并确定等位基因编号，编号组合即可确定该菌株的序列型。

表 2 七对管家基因的 PCR 引物

Table 2 Seven sets of PCR primers for housekeeping genes

序号	引物编号	引物序列 (5'→3')
1	<i>glnS</i> -F	ACCAACCCGGCCAAGAAGACCAGG
	<i>glnS</i> -R	TGCTTGAGCTTGCGCTTG
2	<i>gyrB</i> -F	GGTGGTCGATAACTCCATCG
	<i>gyrB</i> -R	CGCTGAGGAATGTTGTTGGT
3	<i>ileS</i> -F	TTCCCAATGAARGCCGGCCTGCC
	<i>ileS</i> -R	GGGGTGGTGGTCCAGATCACG
4	<i>nuoD</i> -F	GAAGTCCTGACCTTCCTGC
	<i>nuoD</i> -R	GAAGAACTCGGCCATCATG
5	<i>recA</i> -F	TGGCTGCGGCCCTGGGTCAGATC
	<i>recA</i> -R	ACCAGGCAGTTGGCGTTCTTFAT
6	<i>rpoB</i> -F	TGGCCGGTCGTACCGTAACA
	<i>rpoB</i> -R	CCGAAACGCTGACCACCGAAC
7	<i>rpoD</i> -F	CTGATCCAGGAAGGCAACATCGG
	<i>rpoD</i> -R	ACTCGTCGAGGAAGGAGCG

96 孔板法测 *P. fluorescens* 生物被膜形成能力的方法根据袁磊^[16]的方法稍作修改。使用酶标仪测定 590 nm 处吸光度值，作为生物膜形成能力的评价指标，每株菌设置三个生物学重复。菌株的生物被膜形成能力用 OD_c (OD_{阴性对照}+SD) 表示。其中当 OD $\leq$ OD_c 时，表明该菌株不能形成生物被膜；当 OD_c<OD $\leq$ 2 $\times$ OD_c 时，表明该菌株具有较弱的生物被膜形成能力；当 2 $\times$ OD_c<OD $\leq$ 4 $\times$ OD_c 时，表明该菌株具有中等的生物被膜形成能力；当 4 $\times$ OD_c<OD 时，表明该菌株具有强生物被膜形成能力。

1.2.4 *P. fluorescens* 在不同温度不同营养成分下生物膜环境适应性

选用 UHT 全脂牛奶、UHT 脱脂牛奶和 TSB 培养基探究不同培养基对荧光假单胞菌生物被膜形成的影响。将培养 24 h 后的菌液分别用 UHT 全脂牛奶、UHT 脱脂牛奶和 TSB 培养基稀释至 10⁴ cfu/mL，然后在 12 孔板的单个孔中加入 10 mL 的稀释菌悬液，均在 25、15、4 $^{\circ}$ C 培养 36 h 后取出，吸出每孔中的培养基，用 PBS 冲洗贴壁

的细胞,通过刮取收集生物膜并将其重悬于 5 mL 浓度为 0.01 mol/L 的 KCl 溶液中,并于 300 W 功率下超声破碎 1 min。超声后的菌悬液于 4 ℃ 7 000 g 离心 10 min,收集上清液,用 0.22 μm 膜过滤器进行过滤。采用苯酚-硫酸法测定胞外多糖的含量。采用 Micro BCA 蛋白检测试剂盒按照说明书检测胞外蛋白含量。

1.2.5 *P. fluorescens* 在不同材料表面生物膜形态差异

不锈钢片(型号 304,大小 0.5 cm×0.5 cm×0.1 cm)在使用前,在丙酮中浸泡 30 min 除去表面的油脂,用体积分数为 75%的乙醇清洗后,再用超纯水冲洗干净,晾干后于 121 ℃ 灭菌 15 min 后备用。玻璃片(大小 0.5 cm×0.5 cm×0.1 cm)在使用前用体积分数为 75%乙醇充分擦拭清洗,再用超纯水冲洗干净,晾干后于 121 ℃ 灭菌 15 min 后备用。PET 塑料片(大小 0.5 cm×0.5 cm×0.1 cm)在使用前用体积分数为 75%乙醇充分擦拭清洗,再用超纯水冲洗干净,置于提前高温灭菌的锥形瓶中并进行密封处理放在超净台中紫外线照射 12 h。

扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)观察强生物被膜形成菌株在不锈钢、玻璃和塑料表面所形成的生物被膜结构。用无菌镊子取出在 TSB 培养基中、25 ℃ 培养 36 h 后的三种材料,用无菌 PBS 清洗后,样本经固定、冲洗、乙醇梯度脱水、置换、干燥、粘样和真空镀膜等前处理后,利用 SEM 对细菌生物膜进行镜检,观察 *P. fluorescens* 在不同材料表面生成的生物膜形态差异。

1.3 数据处理

所有试验均平行测定 3 次,数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 SPSS 程序对数据进行差异显著性分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P>0.05$ 为差异不显著。采用 Origin Pro 2019 软件作图。

2 结果与分析

2.1 原料乳和环境样本微生物纯培养结果

本次通过纯培养从原料乳及其环境样本中共分离出 55 个属,167 个种,其中在种水平上,*P. fluorescens* 数量占比最高为 8.48%,其次是 *Pseudomonas brenneri* 和 *Acinetobacter junii*(如图 1 所示)。纯培养结果表明,*P. fluorescens* 对原料乳及其环境样本具有较高的污染风险,且易在 4 ℃ 条件下利用乳中的营养物质进行繁殖。Teh 等^[17]从原料乳生产设备中分离出定植的 *P. fluorescens*,发现相较于浮游微生物,生物膜中分离出来的 *P. fluorescens* 产生的耐热酶具有更强的腐败能力。因此,本研究对分离出的优势嗜冷菌 *P. fluorescens* 进行后续生物膜生成能力以及环境适应性探究。

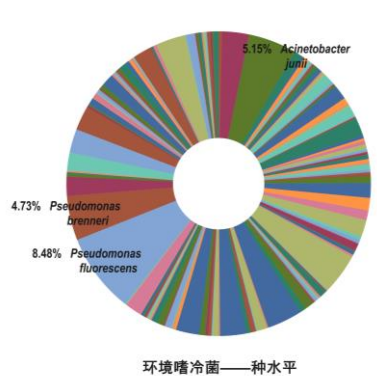


图 1 原料乳及其环境样本纯培养分离结果

Fig.1 Results of pure culture separation of raw milk and environmental samples

2.2 *P. fluorescens* 细菌多位点序列分型结果及产生物膜能力分析

本研究对分离出的 *P. fluorescens* 进行细菌 MLST。根据表 3 可知,*P. fluorescens* 共分为 5 个序列型,分别是 ST8、ST33、ST37、ST126 和 ST127,其中 ST8 型占比最高,ST8 型分离自天津原料乳。

表 3 25 株 *P. fluorescens* ST 分型情况

Table 3 ST typing of 25 strains of *P. fluorescens*

菌株编号	管家基因							
	<i>glnS</i>	<i>gyrB</i>	<i>ileS</i>	<i>nuoD</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoD</i>	<i>ST</i>
Pf1, Pf12, Pf14, Pf15, Pf16, Pf17, Pf18, Pf28, Pf29, Pf39	8	8	8	8	8	8	8	8
Pf30, Pf31, Pf32, Pf33	32	33	32	33	31	32	32	33
Pf6	34	37	36	37	33	35	33	37
Pf21, Pf22, Pf23, Pf42, Pf44, Pf45, Pf48, Pf49, Pf50	77	97	32	33	31	32	33	126
Pf54	77	84	32	80	31	95	32	127

原料乳从牧场到工厂的转运时间一般规定为 48 h 内完成，因此对分离出的 25 株菌进行 24 h 和 36 h 生物膜结晶紫染色实验，截至 24 h 时，7 株菌生物膜生成能力为中等，1 株菌不成膜，其余菌为弱生物膜生成；36 h 时，只有 3 株菌生物膜生成能力为中等，其余菌为弱生物膜生成（见表 4），这 3 株中等生物膜生成能力的菌株中，*Pf* 18 与 *Pf* 16 的成膜能力随培养时间的增加而变强，且两株菌间成膜能力比对发现，*Pf* 18 的误差值更小更稳定，此选择该株菌进行后续的生物膜环境适应性试验。

表 4 25 株 *P. fluorescens* 的生物膜形成风险等级

Table 4 Risk level of biofilm formation in 25 strains of *P. fluorescens*

菌株编号	24 h 吸光度	成膜能力	36 h 吸光度	成膜能力
<i>Pf</i> 1	0.490±0.076	++	0.375±0.032	+
<i>Pf</i> 6	0.371±0.056	+	0.320±0.030	+
<i>Pf</i> 12	0.356±0.043	+	0.390±0.032	+
<i>Pf</i> 14	0.433±0.050	+	0.379±0.028	+
<i>Pf</i> 15	0.550±0.059	++	0.434±0.036	+
<i>Pf</i> 16	0.456±0.057	++	0.485±0.055	++
<i>Pf</i> 17	0.510±0.042	++	0.450±0.038	++
<i>Pf</i> 18	0.555±0.043	++	0.583±0.023	++
<i>Pf</i> 21	0.444±0.049	++	0.326±0.013	+
<i>Pf</i> 22	0.375±0.089	+	0.301±0.032	+
<i>Pf</i> 23	0.458±0.092	++	0.336±0.030	+
<i>Pf</i> 28	0.440±0.041	+	0.384±0.015	+
<i>Pf</i> 29	0.419±0.038	+	0.395±0.037	+
<i>Pf</i> 30	0.400±0.056	+	0.296±0.011	+
<i>Pf</i> 31	0.294±0.004	+	0.361±0.023	+
<i>Pf</i> 32	0.397±0.052	+	0.337±0.024	+
<i>Pf</i> 33	0.219±0.024	-	0.280±0.017	+
<i>Pf</i> 39	0.430±0.057	+	0.384±0.039	+
<i>Pf</i> 42	0.338±0.030	+	0.301±0.009	+
<i>Pf</i> 44	0.369±0.031	+	0.329±0.023	+
<i>Pf</i> 45	0.380±0.027	+	0.265±0.045	+
<i>Pf</i> 48	0.279±0.039	+	0.319±0.025	+
<i>Pf</i> 49	0.263±0.010	+	0.276±0.045	+
<i>Pf</i> 50	0.285±0.030	+	0.270±0.023	+
<i>Pf</i> 54	0.297±0.055	+	0.273±0.019	+

注：++为中等生物膜生成，+为弱生物膜生成，-为不成膜。

为探究 *Pf* 18 生物膜形成规律，明确 *Pf* 18 的最佳生物膜形成时间，对 *Pf* 18 进行不同培养时间生物膜含量测定。通过图 2 结晶紫染色结果得出该菌株生物膜生成能力随培养时间的增加呈现先上升后下降的趋势，在第 36 h

时生物膜生成能力最强为 0.583, 因此该菌生物膜最佳培养时间在后续试验中定为 36 h。

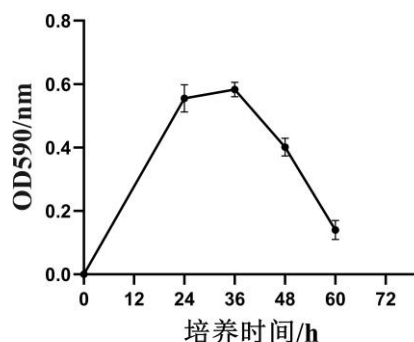


图 2. *P. fluorescens*18 在不同培养时间下生物膜含量

Fig.2 Contents of biofilm of *P. fluorescens*18 in different culture times

2.3 *P. fluorescens*18 生物膜在不同温度和营养条件下适应性研究

首先对筛选出的 *Pf* 18 进行不同温度和不同营养成分条件下生物膜研究。根据图 3a 和图 3b 的结晶紫染色结果可以看出, 培养温度与营养成分对生物膜的生成都有影响。在同一培养温度下 (图 3a), 相较于 TSB 培养基, 营养成分为脱脂乳时生物膜含量差异更为显著 ($P<0.05$); 在同一营养成分条件下 (图 3b), 温度对生物膜含量的影响差异更显著 ($P<0.05$), 在 25 °C 培养更有利于 *P. fluorescens*18 生物膜生长^[15,18]。根据图 3c, 图 3d 和图 3e 结果可知, 在同一培养时间下低温可以抑制生物膜 EPS 含量, 4 °C 时 EPS 中的蛋白质和多糖含量显著低于 25 °C ($P<0.05$); 根据图 3f, 图 3g 和图 3h 结果, 同一温度下牛乳条件有利于增强生物膜附着, 牛乳条件下 EPS 中的蛋白质含量均显著高于 TSB 条件 ($P<0.05$), 多糖含量有所提高但差异不显著。

Teh 等^[19]研究得出环境中营养物质的不同会影响 *P. fluorescens* 生物膜生长, 本研究中 *P. fluorescens*18 在全脂乳、脱脂乳和 TSB 三种不同培养基下生物膜生成能力和生物膜成分不同, 这与 Jae-Ik^[20]的研究相同。Mary 等^[21]发现乳中较 TSB 有更丰富的碳源及氮源, 这种生长条件能够促进微生物生物膜生成, 但乳中的多糖成分能够影响微生物细胞膜通透性, 抑制生物膜胞外多糖的形成^[22,23]。相较于营养成分的变化, 温度对生物膜成分的变化影响更大, 温度降低导致 *P. fluorescens* 营养代谢减慢^[24,25], 影响细胞内部和周围化合物的物理性质^[26-29]。Liu 等^[30]研究发现, 与 25 °C 48 h 相比, 7 °C 10 d 可以使微生物在 96 孔板上生成更致密紧致的生物膜结构。Michela 等^[18]用激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal laser scanning microscope, CLSM) 对 4 °C 和 15 °C 下 48 h 内生长过程中的 *P. fluorescens* 生物膜进行观察, 发现该菌在 15 °C 培养 1 d 后可以观察到成熟的生物膜结构, 菌落大小更大并且 EPS 数量明显多于 4 °C。相反, 在 4 °C 形成时, 生物膜呈小的、形状不规则的、松散的微菌落, EPS 含量较少。本研究中在相同的 36 h 培养时间下, 因低温不是微生物生长的适宜温度从而抑制生物膜附着, 并且随温度的降低, 生物膜生成量 (图 2b) 以及生物膜 EPS 含量 (图 2c~e) 都有所减少, 并且差异显著 ($P<0.05$)。

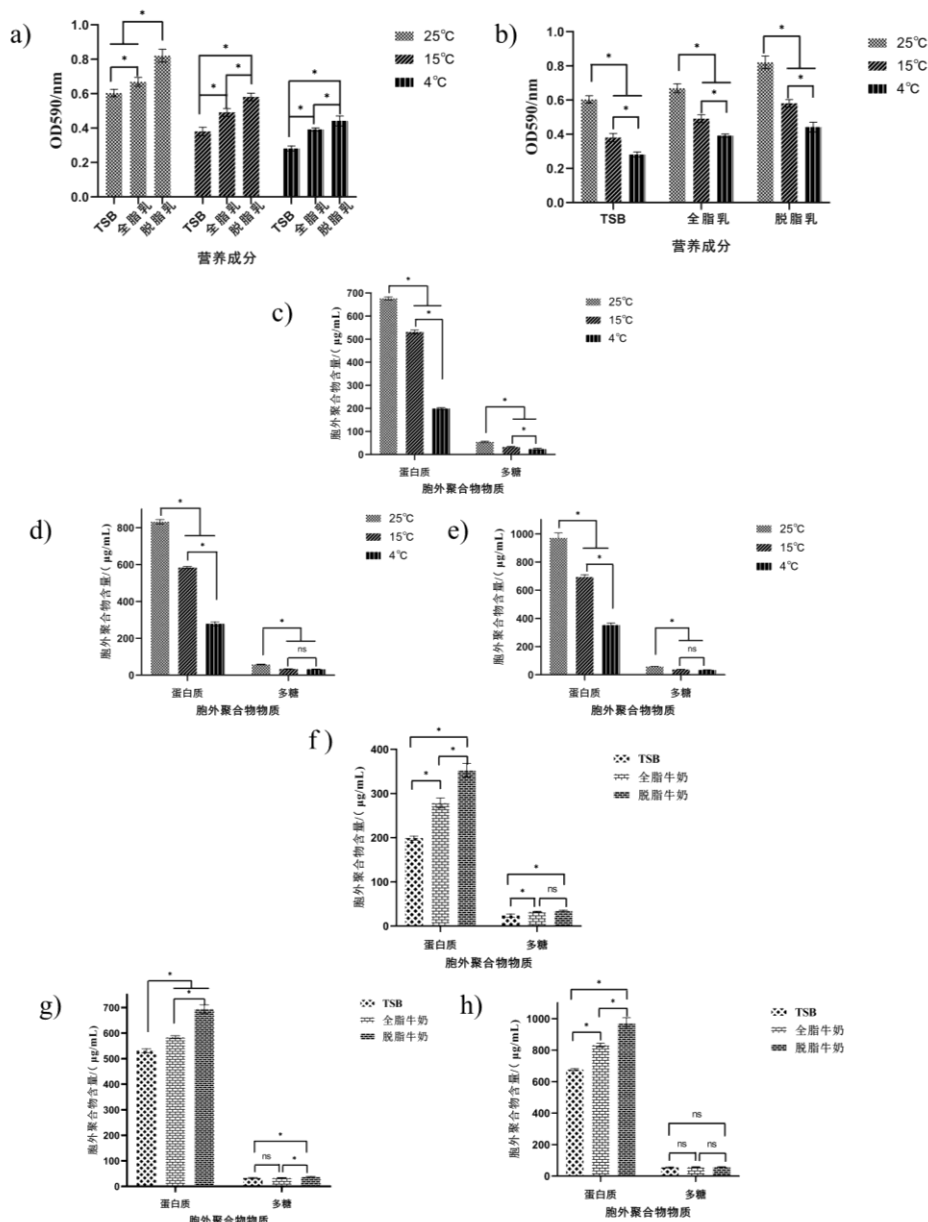


图3 (a) 同一温度不同营养成分结晶紫染色; (b) 同一营养成分不同温度结晶紫染色; (c~e) TSB 培养基、全脂乳培养基和脱脂乳培养基不同温度条件下胞外蛋白, 胞外多糖含量; (f~h) 4、15 和 25 °C 不同营养条件下胞外蛋白, 胞外多糖含量

Fig.3 (a) Crystal violet staining with different nutrients at the same temperature. (b) Crystal violet staining at different temperatures for the same nutrient. (c~e) Extracellular protein and extracellular polysaccharide contents in TSB medium, whole milk medium and skim milk medium under different temperature conditions. (F~h) Contents of extracellular protein and extracellular polysaccharide under different nutritional conditions at 4, 15 and 25 °C

注: *为 $P < 0.05$, 具有显著差异。

2.4 *P. fluorescens*18 生物膜在不同接触表面下适应性研究

在扫描电镜观察下不锈钢表面(图 4a)上的 *P. fluorescens*18 生物膜形成能力更强, EPS 黏附情况强于其他两种表面材料: 玻璃和塑料(图 4b 和图 4c), 说明该微生物在不同表面材料下生物膜形成能力不同, 而黏附情况越强说明微生物在该材料表面上形成生物膜后越难清除, 容易在输奶管道和奶罐车表面残留在加工过程中会导致管道腐蚀, 还会为其他细菌的生长提供适宜条件^[11]。在 PET 表面和玻璃表面荧光假单胞菌以单个微生物形态存在的情况居多, 微生物之间存在黏附但弱于不锈钢表面。Minyeon 等^[22]对蜡样芽孢杆菌在不同材料表面产生生物膜的研究中同样发现, 蜡样芽孢杆菌在不锈钢材料上生成的生物膜量显著多于玻璃和塑料表面。熊富忠等^[31]表明在微

生物产生生物膜的过程中材料表面电荷特为重要影响因素, 不锈钢表面与微生物细胞间产生静电相互作用和范德华力, 使微生物产生致密、均质和单一的生物膜结构。为了减少对原料乳品质及加工设备的影响, 一些安全、环保的技术应用于原料乳生产方面是有必要的, 例如在原料乳生产过程中可以采用超声耦合乳酸^[32]技术对荧光假单胞菌产生的生物膜进行高效清除或利用噬菌体^[33]抑制荧光假单胞菌的繁殖能力。

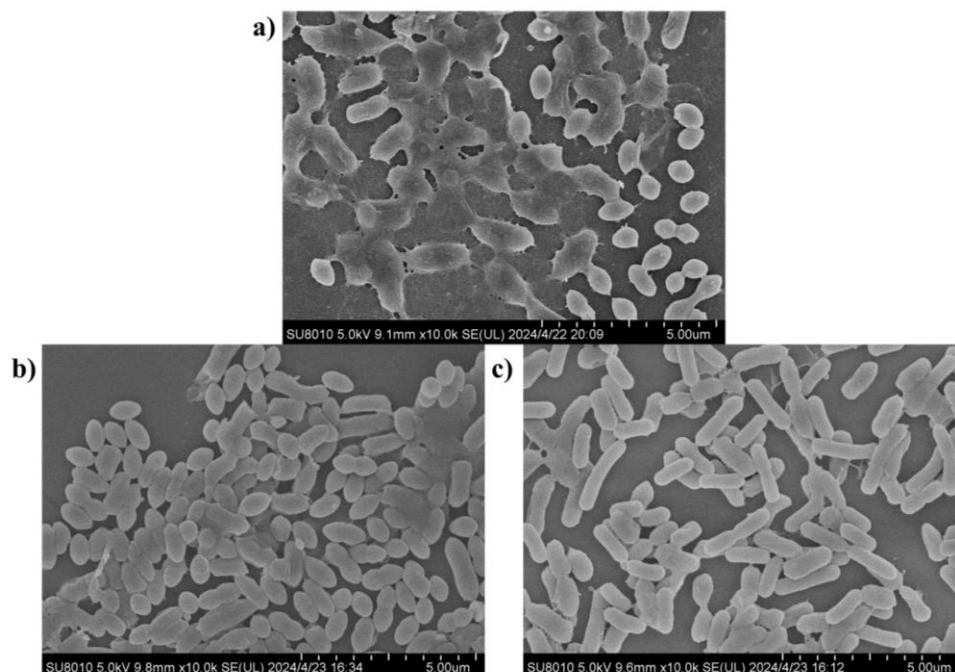


图4 扫描电镜下不锈钢表面、玻璃表面和塑料表面 *P. fluorescens*18 形成的生物膜形态

Fig.4 Biofilm morphology of *P. fluorescens*18 on stainless steel, glass and plastic surfaces under scanning electron microscopy

3 结论

本研究的结果表明, 原料乳及其生产环境嗜冷菌多样性丰富, *P. fluorescens* 为分离出的主要嗜冷菌种。在本研究中共分离出 25 株 *P. fluorescens*, 分为 5 个 ST 型, 25 株 *P. fluorescens* 随着培养时间增加生物膜生产量发生变化。*P. fluorescens*18 在不同的温度和营养成分均能产生生物膜, 但生成能力不同, 该菌株在 25 °C, 36 h 培养条件下, 在脱脂乳培养基中生物膜形成能力更强, 说明温度和环境营养成分均能改变菌株的成膜能力。*P. fluorescens*18 在不锈钢表面产生的生物膜 EPS 多于其他两个表面, 黏附能力更强。乳制品加工设备(如储罐、输送机和设备)多用不锈钢, 彻底清除生物膜具有挑战性, 为了更贴近实际生产环境, 在接下来的研究中应针对乳制品厂中常用消毒剂进行菌株耐受性实验, 探究 *P. fluorescens*18 生物膜生成的具体基因表达水平和耐受基因表达水平。

参考文献

- [1] 邱月,程婧祺,何梦丽,等.冷藏原料乳中微生物及品质的动态变化规律[J].现代食品科技,2024,40(10):181-190.
- [2] 郭小杰.原料乳中嗜冷菌多样性及其主要水解酶特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2020.
- [3] 杜兵耀.生乳中微生物风险关键点分析及假单胞菌特征研究[D].兰州:兰州大学,2022.
- [4] BURGESS S A, LINDSAY D, FLINT S H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(2): 215-225.
- [5] ALFEI S. Shifting from ammonium to phosphonium Salts: A promising strategy to develop next-generation weapons against biofilms [J]. Pharmaceutics. 2024,16(1): 80.
- [6] ROSSI, CHIARA SERIO, ANNALISA CHAVES-LOPEZ, et al. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry [J]. Food Control, 2018, 86: 241-248.
- [7] DILAY KÜTÜK AYHAN, TEMİZ A, SANA F A, et al. Surface properties and exopolysaccharide production of surface-associated microorganisms isolated from a dairy plant [J]. Annals of Microbiology, 2019, 69(9): 895-907.

- [8] READ R R, OSTERTON J W. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, 33(12):1080-1090.
- [9] SHARAN M, VIJAY D, DHAKA P, et al. Biofilms as a microbial hazard in the food industry: A scoping review. Journal of Applied Microbiology. 2022, 133(4): 2210-2234.
- [10] CARRASCOSA C, RAHEEM D, RAMOS F, et al. Microbial biofilms in the food industry-A comprehensive review [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(4): 2014.
- [11] YUAN L, SADIQ F A, URMLLE M, et al. Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: A review [J]. Journal of food protection, 2020, 82(7): 1148-1159.
- [12] PHILIPP L A, KATJA Bühler, ULBER R, et al. Beneficial applications of biofilms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 22(5): 276-290.
- [13] MARCHAND S, BLOCK J D, JONGHE V D, et al. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety [J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2012, 11(2): 133-147.
- [14] KUMAR C G, ANAND S K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 42(1-2): 9-27.
- [15] ROSSI, CHAVES-LOPEZ, SERIO, et al. Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants [J]. Italian Journal of Food Safety, 2016, 2016, 5(3): 154-157.
- [16] 袁磊.原料奶中嗜冷菌的潜在危害研究—基于腐败特性及其生物被膜形成的角度[D].杭州:浙江大学,2020.
- [17] TEH K H, FLINT S, PALMER J, et al. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers [J]. International Dairy Journal, 2011, 21(10): 742-747.
- [18] MAIFRENI M, DI BONAVENTURA G, MARINO M, et al. Biofilm formation under food-relevant conditions and sanitizers' tolerance of a *Pseudomonas fluorescens* group strain [J]. Journal of Applied Microbiology. 2023, 134(6): 117.
- [19] TEH K H, LINDSAY D, PALMER J, et al. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker [J]. International Journal of Dairy Technology, 2014, 67(2): 176-181.
- [20] JAE-IK, LEE, SANG-SOON, et al, Characteristics of *Staphylococcus aureus* biofilm matured in tryptic soy broth, low-fat milk, or whole milk samples along with inactivation by 405 nm light combined with folic acid [J]. Food Microbiology, 2023, 116: 104350.
- [21] FABRES-KLEIN M, CAIZER SANTOS, MÁRIO, et al. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus* [J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11(1): 1-8.
- [22] KWON M, USSAIN M S, OH D H. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions [J]. Food Science & Biotechnology, 2017, 26: 1103-1111.
- [23] KARYGIANNI L, REN Z, KOO H, et al. Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities [J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(8): 668-681.
- [24] TREVO R G, MANMOHAN B, ZHANG Z B. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces [J]. Progress in Natural Science, 2008, 18(9): 1049-1056.
- [25] STEPANOVIC S, IRKOVIC I, IJAC V, et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp [J]. Food Microbiology, 2003, 20(3): 339-343.
- [26] ADAM S R, BESTEN H M, EEN 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.
- [27] POIMENIDOU S, ELESSI C A, GIAOURIS E D, et al. *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(22): 7182.
- [28] BONSAGLIA E C R, SILVA N C C, A. FERNANDES JÚNIOR, et al. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures [J]. Food Control, 2014, 35(1): 386-391.
- [29] SKOWRON K, AECKA Z E, GRUDLEWSKA K, et al. Disinfectant susceptibility of biofilm formed by *Listeria monocytogenes* under selected environmental conditions [J]. Microorganisms, 2019, 7(9): 280.
- [30] LIU J, WU S, FENG L, et al. Extracellular matrix affects mature biofilm and stress resistance of psychrotrophic spoilage *Pseudomonas* at cold temperature [J]. Food Microbiology, 2023, 112: 104214.

-
- [31] 熊富忠,赵小希,廖胤皓,等.材料表面特征对生物膜形成的影响及其应用[J].微生物学通报,2018,45(1):155-165.
- [32] 张延河.钙离子介导的乳源性荧光假单胞菌生物被膜的形成及其控制[D].扬州:扬州大学,2024.
- [33] 袁鑫海.荧光假单胞菌噬菌体的分离及生物学特性及其在乳制品腐败防控中的应用[D].扬州:扬州大学,2024.