

肉源隆德假单胞菌和致腐菌的混合生物被膜形成特征

吴诗媛, 张俊, 鲁重, 陆海霞, 朱军莉*
(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

摘要 为探究肉类优势腐败菌群的混合生物被膜互作规律,采用结晶紫法、苯酚硫酸法、二喹啉甲酸法和激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察等分析在 15℃和 25℃肉源分离株隆德假单胞菌(PL)与 3 种致腐菌的混合生物被膜特性,及对蛋白酶和消毒剂耐受性的影响。结果表明,从腐败牛肉中分离鉴定的 23 株菌中,假单胞菌属占 43.5%,其次为热杀索丝菌、不动杆菌属和类香味菌属。将优势腐败菌隆德假单胞菌与约翰逊不动杆菌、热杀索丝菌及类香味菌共培养,发现低温显著促进双菌混合生物被膜的形成。PL、AJ、BT 在 15℃时的生物被膜形成量均显著高于 25℃时的,混合生物被膜在 15℃时的形成量显著高于 PL 单培养的。PL 与 AJ 共培养时,被膜菌数目比单培养时高 0.75~0.78 lg(CFU/cm²),15℃共培养时,胞外多糖分泌量增加 15.67~22.01 μg/mL,与 AJ、BT 共培养的胞外蛋白分泌量分别增加 7.35,6.70 μg/mL。CLSM 观察发现 PL 与 MP 或 AJ 混合生物被膜聚集团聚,形成不均一结构,被膜厚度增至 48.99~49.22 μm。此外,混合生物被膜的形成,显著提高假单胞菌的蛋白酶活性和化学耐受性。经 0.06%次氯酸钠处理后,15℃时 PL 与 AJ、BT 混合被膜残留率高达 95.61%,96.16%,显著高于 PL 单培养。结论:肉源致腐菌 PL 与 3 种致腐菌形成结构复杂的混合被膜,在低温环境下被膜菌增强对次氯酸钠的抵抗性,为探究肉源腐败微生物混合被膜的污染和控制奠定良好的基础。

关键词 隆德假单胞菌;混合生物被膜;耐受性;腐败;蛋白酶

文章编号 1009-7848(2024)10-0083-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.008

生鲜肉类是人类优质蛋白质的重要来源,是大众消费的主流,然而,在冷链加工贮运过程中,生鲜肉类腐损率仍较高,造成重大的经济损失。冷链生鲜肉类的品质与腐败菌群的互作密切相关,其中假单胞菌(*Pseudomonas*)是有氧冷藏肉类的优势腐败菌^[1],在猪肉、牛肉、鸡肉等多种畜产品中都分离到该属菌株^[2],包括隆德假单胞菌(*Pseudomonas lundensis*)、莓实假单胞菌(*P. fragi*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)和荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)等。已报道分离于猪肉和牛肉的隆德假单胞菌可以分泌较高的蛋白酶和脂肪酶,导致肉品表面发黏,产生难闻气味^[3]。不动杆菌(*Acinetobacter*)污染食品加工设备表面^[4],并通过硫代谢、蛋白酶分泌等方式促进肉品腐败,而热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)也是引起冷鲜肉腐败的重要细菌,由于其耐低温的特性,该菌在低温贮藏肉类中几乎都能检测到^[5-6]。此外,鸡胸肉中类香

味菌(*Myriodes*)的相对丰度与尸胺和酪胺含量呈正相关,从而影响肉品的品质和安全^[7]。

生物被膜是微生物黏附于物体表面后,分泌多糖、蛋白质、核酸等大分子物质形成的胞外多聚物,有利于对逆境条件的抵抗^[8]。生物被膜的形成使得细菌更易于在肉品中存活,并增强腐败菌的适应性与竞争能力,成为优势菌。肉品中腐败菌种类繁多,表明多菌种混合生物被膜在生鲜肉中广泛存在。研究表明,混合被膜中的菌属间互作主要体现在竞争作用和共生作用,被膜中细菌跨越菌种限制的互作,会改变优势菌的生物被膜形成能力,从而改变生物被膜的结构和特性^[9],以及菌体对外界胁迫环境的抵抗能力。Wang 等^[10]从原料奶中分离出的代表性腐败嗜冷假单胞菌与嗜水气单胞菌或金黄杆菌共培养时,所形成双菌种生物被膜比单菌型生物被膜对消毒剂具有更强的耐受性。Zhang 等^[11]将大肠杆菌 O157:H7 与肉源假单胞菌共培养时,呈现竞争性相互作用,大肠杆菌生物量显著减少。隆德假单胞菌与单核细胞增生李斯特氏菌共培养时,形成的混合生物被膜对肉桂精油等防腐剂较单种生物被膜具有更强的抗性^[12]。

收稿日期: 2023-10-30

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(LZ23C200002);
浙江省基础公益项目(LGN20C200007)

第一作者: 吴诗媛,女,硕士生

通信作者: 朱军莉 E-mail: junlizhu0305@163.com

然而,目前对肉源性腐败菌混合培养下生物被膜特性的研究仍较少。鉴于此,本研究从冷鲜牛肉中分离的23株腐败菌中,筛选出生物被膜形成能力较强的菌株,并以隆德假单胞菌(PL)为优势腐败菌,分别与其它3种致腐菌——约翰逊不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*,AJ)、热杀索丝菌(BT)及类香味菌(*Myriodes phaeus*,MP)共培养,分析双菌种混合生物被膜形成和结构变化,探究腐败菌群间的互作规律,及其对隆德假单胞菌致腐性和次氯酸钠耐受性的影响。本研究为揭示肉源腐败微生物混合被膜的特性提供科学基础,为有效控制肉源性微生物污染,开发保鲜新技术提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷鲜牛肉购于永辉超市并冰运至实验室;酪蛋白大豆琼脂(TSA)、胰酶大豆肉汤(TSB)、假单胞菌CFC琼脂、热杀索丝菌STAA琼脂、不动杆菌LAM琼脂,青岛海博生物有限公司;结晶紫、NaCl、乙醇、硫酸、苯酚,上海阿拉丁公司;琼脂糖、引物、DNA MarkerDL2000,上海生工有限公司;基因组提取试剂盒,美国默沙东公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒,碧云天生物技术有限公司;6孔、24孔和96孔细胞培养板,无锡NEST生物技术有限公司;荧光染色剂SYTO9,美国赛默飞科技公司。

1.2 仪器与设备

凝胶成像仪JS-680D,上海培清科技有限公司;分光光度计UV-1800,日本京都制碳株式会社有限公司;激光共聚焦显微镜Zeiss LSM780,蔡司光学仪器(上海)有限公司;台式高速冷冻离心机3-18K,德国Sigma公司;生化培养箱LRH-250A,上海一恒科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离与鉴定 无菌操作取冷鲜牛肉25g置于含有225mL无菌生理盐水的无菌均质袋中,拍打后梯度稀释,取100 μ L于PCA培养基涂布。样品培养后,挑取PCA平板上外观形态不同且生长良好的单菌落,纯化后进行革兰氏染色,并使用试剂盒提取细菌基因组。参考顾春涛等^[13]方法扩增16S rDNA片段,测序及拼接序列后,在

NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的BLAST程序进行同源性比对。

1.3.2 结晶紫(Crystal violet,CV)染色测定生物被膜 将PL、AJ、BT、MP4种细菌接种于TSB培养基中,25 $^{\circ}$ C培养过夜,将菌液按1%接种量单独或1:1混合(PL+AJ、PL+BT、PL+MP)后,吸取200 μ L分装至96孔板中,15 $^{\circ}$ C或25 $^{\circ}$ C培养48h后,去除每孔中菌液,用生理盐水漂洗3次,将96孔板置于烘箱充分干燥后,每孔中加入200 μ L 0.2% CV溶液,室温静置染色15min。去除每孔中的CV溶液,经生理盐水漂洗烘干后,加入200 μ L 95%乙醇,静置5min充分溶解,酶标仪测波长590nm处的吸光值。

1.3.3 胞外基质(Extracellular polymeric substances, EPS)的测定 如1.3.2节以相同比例将菌株单独/混合接种于每孔含有9mL TSB培养基的6孔培养板,将6孔板于15 $^{\circ}$ C和25 $^{\circ}$ C静置培养48h。上清液的提取参考Liu等^[14]方法处理后,取1mL上清液加入1mL 5%苯酚溶液、5mL浓硫酸,100 $^{\circ}$ C水浴10min后,使用酶标仪测波长490nm处的吸光值。以葡萄糖作为标准来定量胞外多糖的含量(表示为 μ g/mL)。取上清液为样品,用BCA微量蛋白定量试剂盒进行胞外蛋白定量检测,每组3个平行,以 μ g/mL表示。

1.3.4 浮游菌和被膜菌计数 将1.3.2节所述菌液以2mL分装至24孔板中,加入灭菌不锈钢片(10mm \times 10mm)。15 $^{\circ}$ C和25 $^{\circ}$ C静置培养48h后,参考Nguyen等^[15]的方法采用珠涡流法对黏附于不锈钢片表面的细菌进行计数。具体为用已灭菌的镊子取出不锈钢片,于无菌PBS缓冲液中轻轻漂洗后,放入装有10mL含玻璃珠的无菌生理盐水离心管中,剧烈涡旋3min后,于选择性培养基梯度稀释计数。

1.3.5 细菌胞外酶活性的测定 无菌牛肉汁制备与接种参考顾春涛等^[13]的方法。将细菌菌液如1.3.2节中以相同比例进行单独、混合接种于无菌牛肉汁中,在15 $^{\circ}$ C和25 $^{\circ}$ C培养0,3,5d取样检测蛋白酶活性。蛋白酶活性测定参考SB/T 10317-1999中的福林酚检测法测定蛋白酶活力。1个蛋白酶活力单位即指40 $^{\circ}$ C下每分钟水解酪蛋白产生1 μ g酪氨酸。

1.3.6 显微镜观察生物被膜结构 将 1.3.2 节所述菌液接种至 24 孔板中,每孔中放入灭菌玻璃片(10 mm×10 mm),在 15 ℃或 25 ℃培养 48 h 后取出玻璃片,去除表面的浮游菌后,用 2.0%CV 染色 1 min,清洗干燥后,在光学显微镜(OM)下观察玻璃片上的被膜菌。另外,将 1.3.2 节所述菌液以 3 mL 分装至小培养皿中,15 ℃培养 48 h 后,参考 Liu 等^[16]的方法用 SYTO9 染液处理后,用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察生物被膜结构。每个样品随机选取 3 个部位,取其平均值作为被膜厚度。

1.3.7 次氯酸钠的耐受性测定 按 1.3.2 节的方法将 4 个菌株单独/混合接种于 6 孔培养板(每孔 9 mL TSB),并放入无菌不锈钢片(10 mm×10 mm),于 15 ℃和 25 ℃静置培养 48 h。参考 Liu 等^[14]方法获得不锈钢片上的生物被膜菌,分别在 0.03%和 0.06%NaClO 溶液中处理 5 min,以无菌生理盐水为对照。将处理后的生物被膜菌使用 D/E 中和液处理 1 min,经剧烈涡旋后,梯度稀释后涂布于 CFC 培养基,25 ℃培养 24 h 后计数。同时,通过结晶紫染色进一步检测两种浓度 NaClO 处理后的被膜生物残留量。

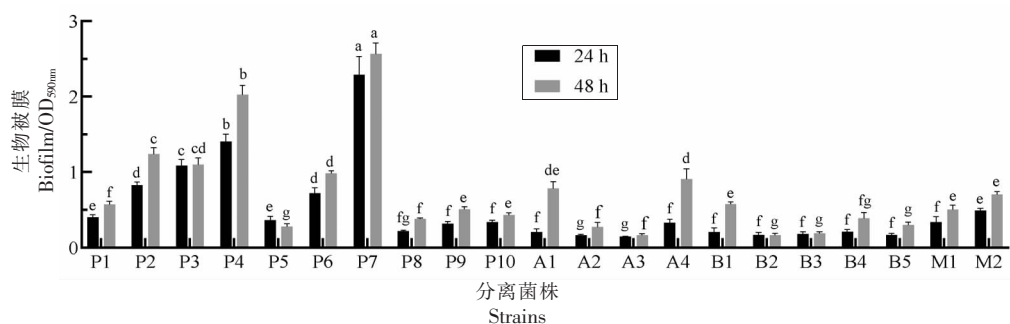
1.3.8 统计学分析 每组试验至少重复 3 次,结果用“平均值±标准偏差”表示。采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据处理与绘图,使用 SPSS

Statistics 20.0 软件的 one-way ANOVA 进行生物被膜结晶紫量/胞外基质等的显著性差异分析,并且对假单胞菌单独/混合生物被膜的抗逆性进行 Pearson 相关性分析,其中 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牛肉优势腐败菌的分离、鉴定

从冷鲜牛肉样品中挑选出不同形态的 23 个菌落,经 16S rDNA 通用引物的 PCR 扩增和测序,将获得序列用 GenBank 数据库中的 BLAST 进行同源性比对。其中,10 株分离株与假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)具有较高同源性,4 株与不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)具有较高同源性,5 株与热杀索丝菌有较高同源性,2 株与类香味菌属(*Myroides* spp.)同源性较高,1 株为巨型微球菌(*Micrococcus caseolyticus*)。经 15 ℃培养 24 h 和 48 h 后,结晶紫染色分析上述 4 个菌属分离株的生物被膜形成量,发现菌属间生物被膜形成量存在显著差异,其中假单胞菌属生物被膜形成量总体较高(图 1)。将各属中强生物被膜菌隆德假单胞菌 *P. lundensis* PL28(PL)、约翰逊不动杆菌 *A. johnsonii* G3 (AJ)、热杀索丝菌 *B. thermosphacta* B13(BT)、类香味菌 *M. phaeus* (MP)进行单独/混合生物被膜研究。



注:P1~P10 为假单胞菌分离株,A1~A4 为不动杆菌分离株,B1~B5 为热杀索丝菌分离株,M1~M2 为类香味菌分离株;不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 1 冷鲜牛肉致腐菌的生物被膜形成能力

Fig.1 Biofilm formation ability of strains isolated from the fresh beef

2.2 隆德假单胞菌和致腐菌混合生物被膜形成

如图 2 所示,PL、AJ、BT 和 MP 在 15 ℃和 25 ℃下单/共培养后,生物被膜量具有显著变化。4 种

致腐菌单独培养时,PL 单菌生物被膜量最高,其次为 AJ 和 MP,BT 被膜量最低。除 MP 外,致腐菌单培养和混合培养在 15 ℃下生物被膜形成量均

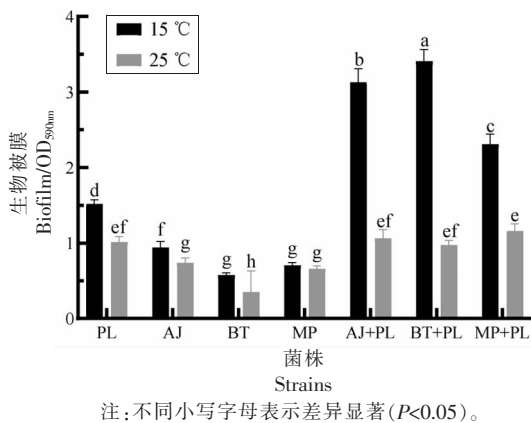


图2 15 °C和25 °C下单/共培养 PL、AJ、BT 和 MP 的生物被膜 CV 生物量

Fig.2 Biofilm biomass of PL, AJ, BT and MP in mono- and dual-species at 15 °C and 25 °C

显著高于25 °C ($P < 0.05$)。混合生物被膜在15 °C下形成量显著高于PL单培养(1.52),特别是PL与AJ、BT共培养时,形成的被膜量分别为3.13和3.41 ($P < 0.05$)。而25 °C下PL单菌与双菌种生物被膜量无显著性变化 ($P > 0.05$)。在肉源腐败菌中,假单胞菌是强生物被膜形成株^[16],且在低温下表现出更强的生物被膜形成能力。Liu等^[17]发现猪肉隆德假单胞菌分离株4 °C和10 °C时形成的生物被膜量高于30 °C。Røder等^[18]发现与单一物种生物被膜相比,多物种混合培养增强了生物被膜的形成,这与本结果相一致,PL与3种致腐菌在低温下混合培养能够显著促进生物被膜的形成。

2.3 隆德假单胞菌和3种致腐菌共培养下的被膜菌

如表1所示,在15 °C和25 °C下,PL、AJ、BT和MP单培养和共培养48 h后,浮游菌及被膜菌的数量。结果显示,4株致腐菌在25 °C下单培养的浮游菌数都显著高于15 °C,其中25 °C数量为7.32~8.06 lg(CFU/cm²),而PL、AJ和MP在15 °C为6.40~7.29 lg(CFU/cm²),BT仅为5.69 lg(CFU/cm²)。PL在15 °C与BT共培养时数量低于单培养,而与AJ、MP共培养时明显高于单培养 ($P < 0.05$)。与25 °C下PL与AJ共培养比PL单独的浮游菌高0.84 lg(CFU/cm²) ($P < 0.05$),而PL与BT共培养时下降0.77 lg(CFU/cm²) ($P < 0.05$)。

4种肉源腐败菌都能黏附于不锈钢片表面形成生物被膜,其中在15 °C单培养时被膜态菌量高于25 °C,且PL被膜菌量最高。PL在15 °C时与AJ、MP共培养时,被膜菌数目比单培养时高0.52~0.78 lg(CFU/cm²) ($P < 0.05$),而与BT共培养时被膜菌数无明显变化。在25 °C下,PL与AJ混合被膜菌数比单PL时高0.75 lg(CFU/cm²) ($P < 0.05$),而与BT和MP则无明显变化,提示共培养过程中,被膜菌生长表现出明显菌株依赖性,PL与AJ共培养能显著促进混合生物被膜的生长。

PL和3种致腐菌的混合生物被膜菌计数结果与被膜量较一致,故推测腐败菌间共培养能够促进生物被膜的形成。Wang等^[19]发现荧光假单胞菌与金黄色葡萄球菌形成的混合生物被膜高于假

表1 15 °C和25 °C下单/共培养 PL、AJ、BT 和 MP 的浮游菌和被膜菌计数

Table 1 Populations of PL, AJ, BT and MP in mono- and dual-species biofilm and planktonic cells at 15 °C and 25 °C

菌株种类	温度/°C	单培养/[lg(CFU/cm ²)]				共培养/[lg(CFU/cm ²)]					
		PL	AJ	BT	MP	AJ+PL		BT+PL		MP+PL	
						AJ	PL	BT	PL	MP	PL
浮游菌	15	7.00 ± 0.06 ^{Cb}	7.29 ± 0.08 ^{Bb}	5.69 ± 0.12 ^{Fc}	6.40 ± 0.17 ^{Ec}	6.53 ± 0.21 ^{DfB}	7.27 ± 0.06 ^{Bc}	5.46 ± 0.22 ^{Fb}	6.65 ± 0.16 ^{Da}	7.72 ± 0.07 ^{Aa}	7.76 ± 0.03 ^{Aa}
	25	8.06 ± 0.06 ^{Ba}	7.79 ± 0.15 ^{Ca}	7.32 ± 0.25 ^{Da}	7.56 ± 0.06 ^{Ba}	7.89 ± 0.16 ^{BCa}	8.90 ± 0.07 ^{Aa}	6.84 ± 0.18 ^{Ea}	7.08 ± 0.31 ^{DEa}	7.75 ± 0.23 ^{Ca}	8.08 ± 0.10 ^{Ba}
被膜菌	15	6.99 ± 0.10 ^{Bb}	5.62 ± 0.22 ^{Ec}	6.54 ± 0.27 ^{Cb}	6.72 ± 0.03 ^{BCb}	6.16 ± 0.28 ^{Db}	7.77 ± 0.06 ^{Ab}	5.49 ± 0.23 ^{Fb}	6.92 ± 0.06 ^{Ba}	6.55 ± 0.27 ^{Cb}	7.26 ± 0.21 ^{Bb}
	25	6.85 ± 0.15 ^{Bb}	5.35 ± 0.28 ^{Dl}	5.25 ± 0.21 ^{Dc}	5.58 ± 0.19 ^{Dl}	6.22 ± 0.25 ^{Cb}	7.60 ± 0.19 ^{Ab}	5.59 ± 0.09 ^{Clb}	6.51 ± 0.56 ^{BCa}	6.06 ± 0.09 ^{Cb}	6.92 ± 0.20 ^{Bb}

注:不同大写字母表示同行差异显著 ($P < 0.05$);不同小写字母表示同列差异显著 ($P < 0.05$)。

单胞菌单培养的生物量。而尽管 PL 和 BT 共培养下的浮游菌量显著下降,被膜 CV 量明显增加,推测两者之间存在生长竞争关系,然而不影响菌体黏附和被膜形成。类似地,Zhang 等^[11]将莓实假单胞菌与大肠埃希氏菌共培养后,表现为相互竞争,然而不影响两者在生物被膜中的共存。

2.4 隆德假单胞菌和致腐菌混合生物被膜的 EPS 分泌变化

PL 和 3 种致腐菌单/共培养时在 15 °C 和 25 °C 条件下 2 种 EPS 分泌量。如图 3 所示,4 种肉源致腐菌的被膜菌都能分泌胞外多糖,特别是 PL 和 AJ,且共培养时所分泌的胞外多糖量都显著高于 PL 单培养 ($P<0.05$)。相对于 PL 单培养,与 AJ、BT、MP 在 15 °C 下共培养时胞外多糖分泌量分别增加 15.67,17.32,22.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而 25 °C 下共培养的胞外多糖则增加 3.46,4.60,9.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与 25 °C 相比,15 °C 下 4 种致腐菌在单/共培养下胞外多糖的分泌量显著升高 ($P<0.05$)。而 PL 单独和混合被膜胞外蛋白分泌情况与胞外多糖有所差异。4 个单培养假单胞菌胞外蛋白的分泌量最高,其次

为 MP,AJ、BT 很低。在 15 °C 共培养时,PL 与 AJ、BT 的胞外蛋白比单培养的分量分别增加 7.35,6.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P<0.05$),而与 MP 共培养时则无显著差异 ($P>0.05$)。可见,在低温环境下 PL 与致腐菌共培养能显著促进 EPS 的分泌。

研究表明,低温条件会刺激嗜冷性致腐假单胞菌生物被膜和 EPS 的生成。Wickramasinghe 等^[20]也报道 2 株肉源致腐假单胞菌在 10 °C 时,分泌的生物被膜基质中碳水化合物和蛋白质含量高于 25 °C, EPS 产量增加不仅反映生物被膜在低温环境下对嗜冷性假单胞菌的高度保护,并且在生物过程中作为碳/能量储存库发挥作用。肉源致腐菌种间的相互作用也影响着 EPS 的分泌,PL 和 AJ 混合被膜的 EPS 分泌量显著增加。与之类似的研究报道,在铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌共培养时会增加 EPS 的分泌,从而增强对抗生素的耐药性^[21]。EPS 参与混合生物被膜的共黏附,在初期黏附过程中, EPS 分泌菌比非 EPS 菌更具竞争优势。

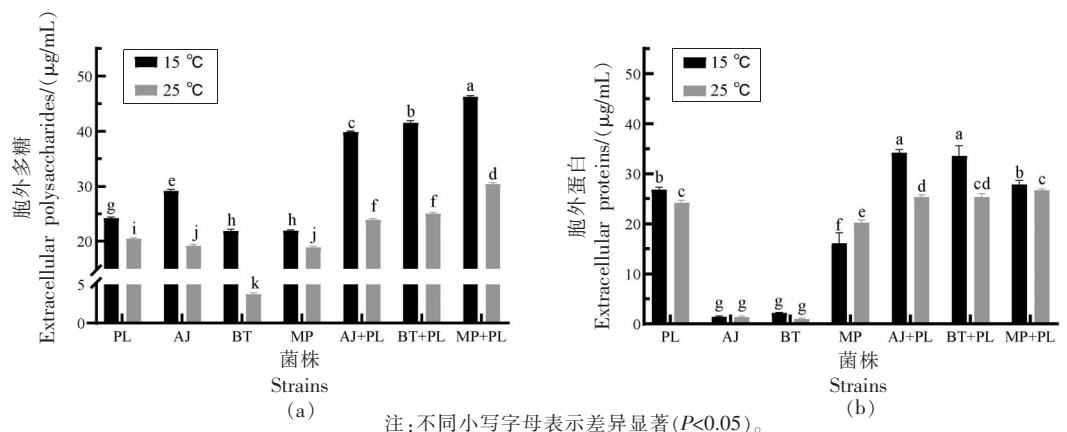


图 3 15 °C 和 25 °C 时 PL 与 AJ、BT、MP 单/共培养下胞外多糖(a)胞外蛋白(b)的分泌

Fig.3 Extracellular polysaccharides (a) and proteins (b) in mono- and dual-species biofilm matrix of PL, AJ, BT and MP at 15 °C and 25 °C

2.5 隆德假单胞菌和 3 种致腐菌混合生物被膜的结构

通过 OM 和 CLSM 观察 PL 与 3 种致腐菌在单/混合生物被膜结构和黏附。如图 4 和图 5 所示,PL 在 15 °C 和 25 °C 单培养 48 h 后,大量细菌被染成紫色并均匀致密地黏附到玻璃片上,而 PL 与 AJ、MP 共培养时,细菌发生明显的聚集,形成

了有重叠的团块。PL 与 BT 共培养时,细菌形成了具有链状结构的聚集,并且 15 °C 比 25 °C 下的聚集更加明显。进一步通过 CLSM 对 15 °C 下的生物被膜结构观察发现,PL 生物被膜分布致密、均匀,平均厚度为 12 μm ,而共培养下 PL 与 AJ、BT、MP 混合生物被膜的平均厚度分别为 49.22,13.10,45.99 μm 。PL 与 BT 的混合生物被膜较为致密,而

PL 与 AJ 和 MP 共培养下细菌聚集形成了团聚等不均一的结构,并且厚度明显增加,其中 AJ 混合被膜表面较为粗糙,而 MP 菌体黏附较为致密平坦。可见,PL 与 3 种致腐菌在共培养条件下,生物

被膜的形成存在协同作用,其菌体黏附量、生物被膜结构以及胞外基质分泌比 PL 单培养显著增加,特别是 PL+AJ。

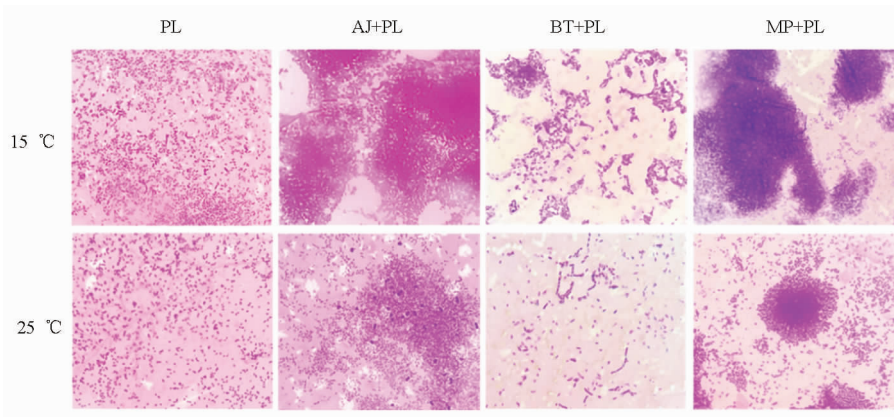


图 4 光学显微镜观察 PL 在 15 °C 和 25 °C 单/共培养下的生物被膜菌黏附与结构

Fig.4 Adhesion and biofilm formation of PL in mono- and dual-species at 15 °C and 25 °C observed by OM

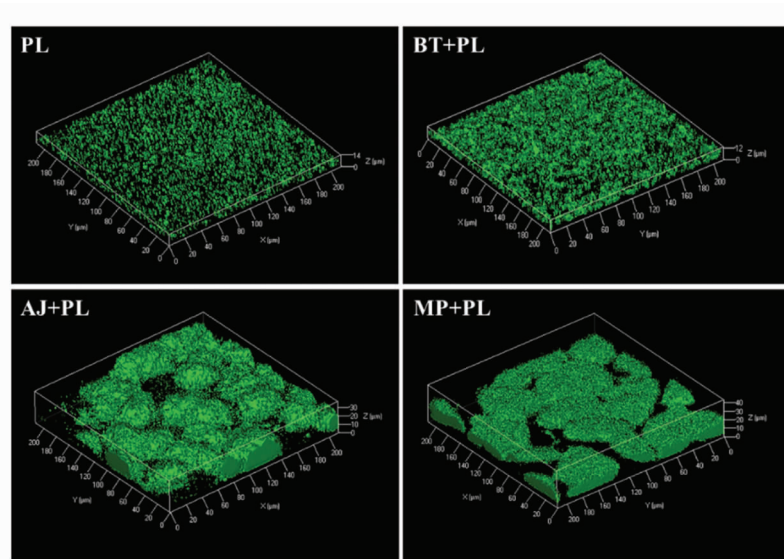


图 5 CLSM 观察 PL 在 15 °C 下单/共培养的生物被膜菌黏附与结构

Fig.5 Adhesion and biofilm formation of PL in mono- and dual-species at 15 °C observed by CLSM

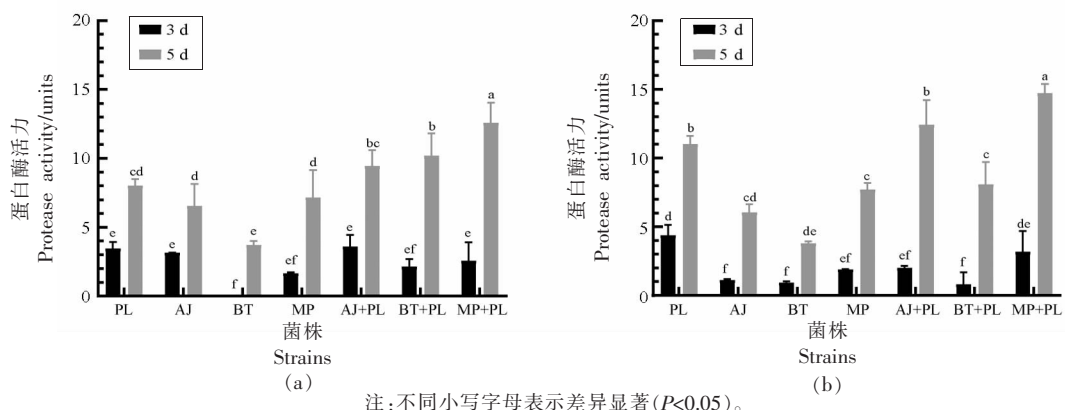
2.6 隆德假单胞菌和 3 种致腐菌混合培养对胞外蛋白酶的影响

如图 6 所示,致腐菌 PL、AJ、MP 在 15 °C 和 25 °C 下都表现出蛋白酶活性,并随着培养时间的延长而显著增加,而 BT 蛋白酶活性很低。在 25 °C 下 PL 单培养及 PL 与 AJ、MP 共培养 5 d 时,蛋白酶活性都显著高于 15 °C ($P < 0.05$)。在 15 °C 培养 5 d 后,PL 与 3 种致腐菌共培养的蛋白酶活性增加

1.42~4.56 个酶活力单位 ($P < 0.05$)。在 25 °C 条件下,PL 与 MP 共培养时,蛋白酶活力明显上升 ($P < 0.05$),而与 BT 共培养时蛋白酶活力显著下降 ($P < 0.05$)。研究表明,PL 与 AJ、MP 在 15 °C 和 25 °C 下共培养时,都显著提高了蛋白酶活性,进而提高分解蛋白底物的能力,增强致腐性,而 PL 与 BT 共培养的蛋白酶活性仅在 15 °C 下有明显上升。Wang 等^[22]也发现荧光假单胞菌和约翰逊不动杆菌接种

至无菌鱼片,二者共同接种比单独接种表现出更高的腐败潜力。另外,蛋白酶活力的变化与上述浮

游菌计数结果相一致。



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 6 15 °C(a)和 25 °C(b)下共培养 PL 对蛋白酶活性的影响
Fig.6 Protease activity changes of PL in different co-culture conditions at 15 °C (a)and 25 °C(b)

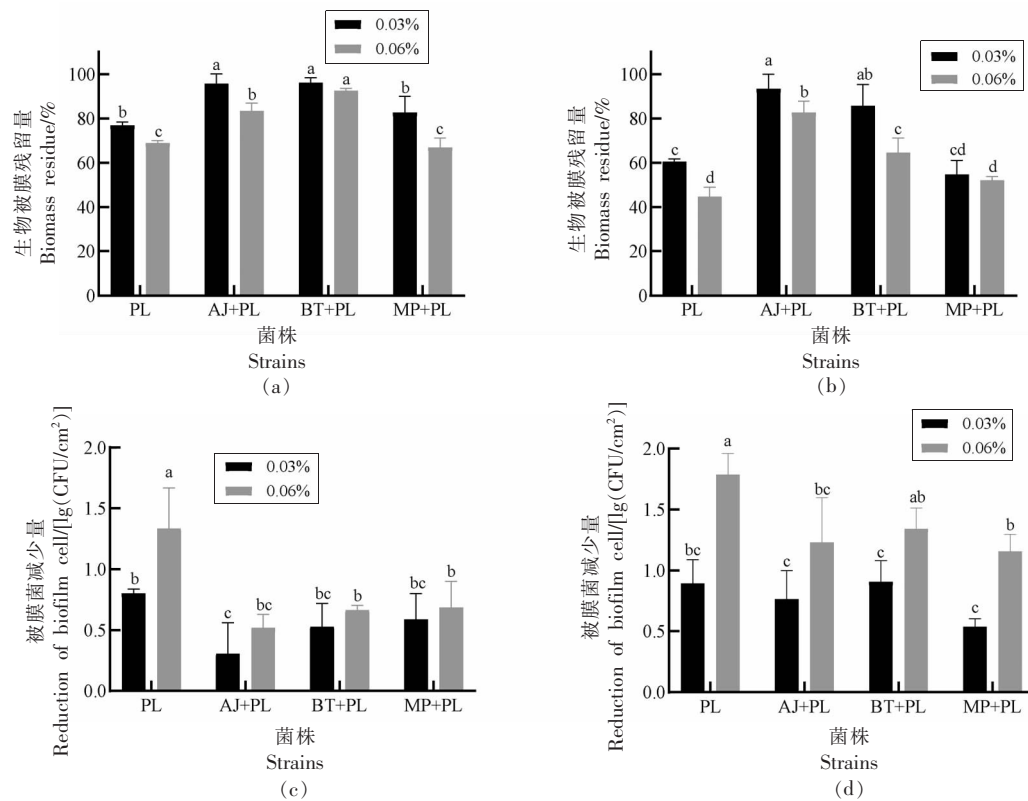
2.7 隆德假单胞菌单/混合生物被膜对次氯酸钠的耐受性

与单菌被膜相比,混合细菌形成的生物被膜被报道能增强驻留细胞对消毒剂的抵抗力,增强菌体在食物表面接触的持久性^[9]。如图 7 所示,CV 染色和活菌计数结果显示,次氯酸钠能减少 15 °C 和 25 °C 下 PL 成熟单/混合生物被膜量,且呈现浓度依赖性。经 0.06% 次氯酸钠处理,相对于 15 °C 时 PL 单被膜 CV 残留率为 76.85%,PL 与 AJ/BT 混合被膜残留率仍有 95.61%,96.16% (图 7a 和 7b);而 25 °C 下 PL 与 AJ/BT 混合被膜 CV 残留率则比 PL 单培养时高 14.47%~23.71% ($P<0.05$)。结果表明,与 PL 单培养相比,两种温度下 PL 与 AJ、BT 混合被膜均表现更多的生物量残留,提示混合生物被膜增强了内部菌体对次氯酸钠的抗性。进一步分析次氯酸钠处理下,PL 单/混合被膜菌减少量的变化。如图 7c 和 7d 所示,次氯酸钠处理导致 25 °C 和 15 °C 下 PL 的单/混合被膜菌减少,特别是单培养时减少量为 0.80~1.79 lg(CFU/cm²)。经 0.06% 次氯酸钠处理后,PL 与 AJ 在 15 °C 下混合生物被膜 PL 减少量为 0.52 lg(CFU/cm²),显著低于单培养时的减少量 1.33 lg(CFU/cm²) ($P<0.05$)。而 25 °C 下 PL 与 AJ 或 MP 混合生物被膜的被膜菌数分别下降 1.23,1.15 lg(CFU/cm²),显著低于 PL 单被膜减少量 1.79 lg(CFU/cm²) ($P<0.05$)。

此外,Pearson 相关性分析显示,NaClO 浓度

和培养温度与单/混合生物被膜生物量残留率呈负相关,与被膜菌减少量呈正相关(表 2)。NaClO 浓度与 PL 单培养($PCC=0.802$)的被膜菌减少量具有显著相关性($P<0.01$),而 PL 与 3 种致腐菌混合生物被膜的形成降低了 NaClO 的清除作用($PCC = 0.341\sim 0.656$)。培养温度也与 PL 单培养生物被膜残留率($PCC = -0.839$)呈负相关($P<0.01$),混合生物被膜的形成尤其是 AJ+PL ($PCC = -0.204$)显著降低了培养温度对生物被膜生物量残留率的影响,表明在低温环境下,假单胞菌形成的生物被膜可以增强耐消毒剂能力,特别是混合被膜($P<0.01$)。

可见,低温环境下混合生物被膜中假单胞菌对次氯酸钠的抵抗力比单培养更强,与低温刺激 EPS 的分泌密切相关^[14],而 3 株致腐菌与 PL 也能促使双菌混合被膜 EPS 产生,从而提高对菌体的保护作用。Wang 等^[19]报道食品环境中的腐败菌和致病菌形成复杂的多物种生物被膜后,由于微生物的相互作用以及共培养中 EPS 的产生,导致菌体对化学消毒剂和紫外线辐射的存活率和耐受性增强。EPS 能够作为一种物理屏障,阻止各种抗菌剂和药物深入生物被膜,以此增强被膜菌对抗菌药物的耐受性^[1],与本结果相一致。PL 与 3 种致腐菌的混合被膜显著提高了 PL 对次氯酸钠的抵抗能力,并且低温下增强了 PL 在单/混合被膜中对次氯酸钠的耐受性。



注:a,b为被膜 CV 生物量残留率;c,d为被膜菌的减少量。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图7 15 °C和25 °C时 PL 单和混合生物被膜对次氯酸钠耐受性的影响

Fig.7 The resistance of mono- and dual-species biofilm formed at 25 °C and 15 °C against NaClO

表2 PL 与3种致腐菌混合培养与培养温度和次氯酸钠耐受性的 Pearson 相关性分析

Table 2 Pearson correlation coefficient matrix of co-culture of *Pseudomonas* between biofilm resistance to NaClO and culture temperature

	CV				计数			
	PL	AJ+PL	BT+PL	MP+PL	PL	AJ+PL	BT+PL	MP+PL
次氯酸钠	-0.493	-0.782**	-0.551*	-0.830**	0.802**	0.437	0.341	0.656
培养温度	-0.839**	-0.204	-0.691*	-0.741**	0.267	0.752*	0.813**	0.389

注:**. $P<0.01$;*. $P<0.05$ 。

3 结论

研究表明,PL 和3种致腐菌在15 °C比25 °C环境下显著促进单/混合生物被膜形成,混合生物被膜表现明显的相互作用。PL与AJ在2种温度下混合生物被膜的生物量、被膜菌数量、胞外基质分泌都明显上升,与BT共培养时生物被膜生物量以及胞外多糖分泌显著增加;与MP共培养促进了菌体数目增加和胞外多糖分泌,且被膜厚度明显升高。同时,PL与3种致腐菌形成的混合生物,

在低温环境下被膜菌对次氯酸钠抵抗性显著增强,这与共培养下的混合生物被膜协同作用有关。PL与AJ、MP在2个温度下共培养时,都能显著提高蛋白酶活性,增强致腐性,而PL与BT在25 °C下的共培养时,浮游菌数目以及蛋白酶活力显著降低。研究有利于阐明肉源腐败微生物混合被膜的共培养特性,为肉品微生物污染的有效控制和保鲜新技术的开发提供数据支撑。

参 考 文 献

- [1] REICHHARDT C, PARSEK M R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1–9.
- [2] ERCOLINI D, RUSSO F, BLAIOTTA G, et al. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (7): 2354–2359.
- [3] KOUTSOUMANIS K, STAMATIOU A, SKANDAMIS P, et al. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 124–134.
- [4] TROND M, SOLVEIG L. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, 16 (5): 1022–1041.
- [5] NOWAK A, RYGALA A, OLTUSZAK W E, et al. The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(6): 1304–1310.
- [6] HÖLL L, HILGARTH M, GEISLER A J, et al. Metatranscriptomic analysis of modified atmosphere packaged poultry meat enables prediction of *Brochothrix thermosphacta* and *Carnobacterium divergens* in situ metabolism [J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(7): 1945–1955.
- [7] MIN H, AN F Q, WEI T, et al. Microbial community structure and biogenic amines content variations in chilled chicken during storage[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(2): 627–638.
- [8] FLEMMING H C, WINGENDER J, SZEWZYK U, et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563–575.
- [9] YUAN L, HANSEN M F, RØDER H L, et al. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60 (13): 2277–2293.
- [10] WANG N, JIN Y J, HE G Q, et al. Intraspecific and interspecific extracellular metabolites remodel biofilms formed by thermophilic spoilage bacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 133 (4): 2096–2106.
- [11] ZHANG W D, MI X Y, ZHANG C, et al. Meat-derived *Escherichia coli* and *Pseudomonas fragi* manage to co-exist in dual-species biofilms by adjusting gene-regulated competitive strength[J]. *Food Microbiology*, 2023, 109: 104122.
- [12] ZHU J L, LIU J C, HONG X L, et al. Synergism with ϵ -polylysine hydrochloride and cinnamon essential oil against dual-species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas lundensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 885502.
- [13] 顾春涛, 毕伟伟, 朱军莉. 冷鲜牛肉贮藏中菌群结构及优势菌致腐性的分析[J]. *食品科学*, 2019, 40 (18): 76–82.
- GU C T, BI W W, ZHU J L. Bacterial community structure and spoilage potential of dominant bacteria in chilled beef[J]. *Food Science*, 2019, 40 (18): 76–82.
- [14] LIU J C, WU S Y, FENG L F, et al. Extracellular matrix affects mature biofilm and stress resistance of psychrotrophic spoilage *Pseudomonas* at cold temperature[J]. *Food Microbiology*, 2023, 112: 104214.
- [15] NGUYEN H D N, YANG Y S, YUK H G. Biofilm formation of *Salmonella typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2014, 55(1): 383–388.
- [16] LIU L, YAN Y P, FENG L F, et al. Quorum sensing *asaI* mutants affect spoilage phenotypes, motility, and biofilm formation in a marine fish isolate of *Aeromonas salmonicida*[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 41–50.
- [17] LIU Y J, XIE J, ZHAO L J, et al. Biofilm formation characteristics of *Pseudomonas lundensis* isolated from meat[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80 (12): M2904–M2910.
- [18] RØDER H L, RAGHUPATHI P K, HERSCHEID J, et al. Interspecies interactions result in enhanced

- biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment [J]. *Food Microbiology*, 2015, 51: 18–24.
- [19] WANG Y Y, HONG X L, LIU J C, et al. Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol [J]. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103506.
- [20] WICKRAMASINGHE N N, HLAING M M, RAVENSDALE J T, et al. Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage *Pseudomonads* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 16457.
- [21] WANG J, LIU X, YU K W, et al. Psl-dependent cooperation contributes to drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in dual-species biofilms with *Acinetobacter baumannii* [J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 8(1): 129–136.
- [22] WANG X Y, XIE J. Growth kinetics and spoilage potential of co-culturing *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during refrigerated storage [J]. *Current Microbiology*, 2020, 77: 1637–1646.

Characterizations of Dual-biofilms Forming by *Pseudomonas lundensis* and Spoilage Bacteria from Meat

Wu Shiyuan, Zhang Jun, Lu Zhong, Lu Haixia, Zhu Junli*

(College of Food Science & Biotechnology, Engineering of Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract The aim of the study is to explore the mixed biofilm interaction among dominant spoilage bacteria isolated from meat. The dual-biofilm characteristics of *Pseudomonas lundensis* and three spoilers were evaluated using by crystal violet staining, phenol sulfuric acid assay, bicinchoninic acid assay and confocal laser scanning microscope (CLSM) observation at 15 °C and 25 °C, as well as protease activity and disinfectant tolerance. The results showed that *Pseudomonas* spp. accounted for 43.5%, followed by *Brochothrix thermosphacta*, *Acinetobacter* spp. and *Myriodes* spp. among 23 spoilers isolated from beef. The amount of biofilm formation of PL, AJ and BT at 15 °C was significantly higher than that at 25 °C, and levels of dual-biofilms at 15 °C was significantly more than single culture, indicating that low temperature significantly promoted the formation of mixed biofilm. The number of cells in biofilm co-cultured with PL and AJ was 0.75–0.78 lg (CFU/cm²), which were higher than that of single culture. Compared to PL single biofilm, the secretion of extracellular polysaccharides increased by 15.67–22.01 μg/mL, and the production of extracellular protein co-cultured with AJ or BT rose by 7.35 μg/mL and 6.70 μg/mL respectively. CLSM observation also revealed that the dual-biofilms of PL and AJ or MP formed clusters with heterogeneous structures, and their thickness of these biofilm increased to 48.99–49.22 μm. In addition, the co-culture of PL and three strains significantly enhanced its protease activity and chemical tolerance. After treatment with 0.06% sodium hypochlorite, the residual rate of dual-biofilms of PL, AJ or BT was 95.61% and 96.16% at 15 °C, which was significantly higher than that of PL single biofilm. Thus, it was revealed that meat-derived spoilage bacteria PL and three strains formed a complex dual-biofilm with strains-dependence, and the PL cells as dual-biofilm formed at low temperature enhanced its resistance to sodium hypochlorite. This study provided a good foundation for exploring the contamination and control of mixed biofilms from meat-derived spoilage microorganisms.

Keywords *Pseudomonas lundensis*; dual-species biofilm; stress resistance; spoilage; protease