

耐冷菌生物膜的形成和防控

汇报人：祁岩

光明乳业股份有限公司

2022.6.28



目录

一、耐冷菌

二、生物膜的形成及危害

三、生物膜的检测

四、生物膜的防控

五、总结

□ 耐冷菌的概念

- 影响乳及乳制品质量安全的**关键微生物**
- 耐冷菌分为两类：一类为专性嗜冷菌，最高生长温度不高于20 °C，最适生长温度低于15 °C。另一类为**兼性嗜冷菌**是指可在常温下（20 °C以上）生长繁殖也可以在低温下（0~5 °C）生长繁殖，最适生长温度通常在25-30 °C，如假单胞菌。



□ 耐冷菌的存在

- 存在于空气、土壤、牛乳房表面以及挤乳设备表面



□ 常见的耐冷菌及其分布

- 耐冷菌群的组成受地区和气候的影响，在许多国家和地区，假单胞菌是常见的耐冷菌群，荧光假单胞菌被认为是经常出现且对原料乳危害最大的一类菌
- 除此之外，乳与乳制品中还存在有产碱杆菌属、黄杆菌属、色杆菌属、梭菌属、芽孢杆菌属、棒状杆菌属、乳杆菌属、微球菌属和链球菌属等。



□ 耐热酶

- 巴氏杀菌或其它杀菌方式容易杀死耐冷菌
- 分泌耐热酶可导致高温灭菌乳沉淀、凝胶和变味，进而影响产品货架期

耐热酶	主要菌属	主要菌种
蛋白酶	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		<i>Pseudomonas putida</i>
		<i>Pseudomonas veronii</i>
		<i>Pseudomonas fragi</i>
		<i>Pseudomonas lundensis</i>
		<i>Pseudomonas proteolytica</i>
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
		<i>Serratia grimesii</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium piscium</i>
		<i>Chryseobacterium oncorhynchi</i>
脂肪酶	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		<i>Pseudomonas proteolytica</i>
		<i>Pseudomonas fragi</i>
		<i>Pseudomonas lundensis</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter guillouiae</i>
		<i>Acinetobacter johnsonii</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium joostei</i>
		<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>



(张树飞等，2020)

□ 耐热酶

乳源分泌蛋白酶的嗜冷菌	温度/℃	D 值/min
<i>Serratia liquefaciens</i> L53	65	596.5
	72	476.3
	140	3.9
<i>Serratia liquefaciens</i> L53	75	416.67
	85	250.00
	95	96.15
<i>Pseudomonas fluorescens</i> W2a	75	294.12
	85	188.68
	95	80.00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (d)	70	166.37
	80	106.67
	90	65.21
<i>Serratia grimesii</i>	70	220.51
	80	133.59
	90	77.13
<i>Pseudomonas</i> sp. W15a	120	10.7 ± 0.9
	130	4.9 ± 0.4
	140	1.8 ± 0.2
<i>Pseudomonas proteolytica</i> 691	120	6.3 ± 0.9
	130	4.0 ± 0.6
	140	1.3 ± 0.2
<i>Pseudomonas panais</i>	70	645
	80	422
	90	132

乳源分泌脂肪酶的嗜冷菌	耐热性
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (b)	70 °C ,D 值=69.92 min
	80 °C ,D 值=56.13 min
	90 °C ,D 值=39.55 min
<i>Acinetobacter pakistanensis</i>	70 °C ,D 值=72.74 min
	80 °C ,D 值=57.44 min
	90 °C ,D 值=40.69 min
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 041	65 °C ,30 min, 酶活残留率 13.2%
	72 °C ,20 s, 酶活残留率 25.4%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GU198117.1	65 °C ,30 min, 酶活残留率 51%
	80 °C ,20 s, 酶活残留率 35%
	110 °C ,5 min, 酶活残留率 23%
<i>Pseudomonas fragi</i> KT767703.1	65 °C ,30 min, 酶活残留率 37%
	80 °C ,20 s, 酶活残留率 29%
	110 °C ,5 min, 酶活残留率 6%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BJ-10	60 °C ,90 min, 酶活残留率 81%
	70 °C ,90 min, 酶活残留率 61%
	80 °C ,90 min, 酶活残留率 54%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AY538264.1	65 °C ,30 min, 酶活残留率 87%±5%
	80 °C ,20 s, 酶活残留率 76%±4%
	110 °C ,5 min, 酶活残留率 71%±17%

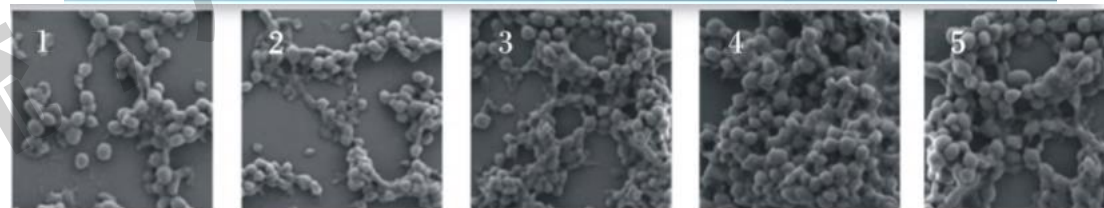
(张树飞等, 2020)

□ 生物膜

- 是细菌在生长过程中为了适应生存环境，分泌粘性胞外聚合物吸附于物质表面，并增殖而形成的具有一定结构的细胞群体。

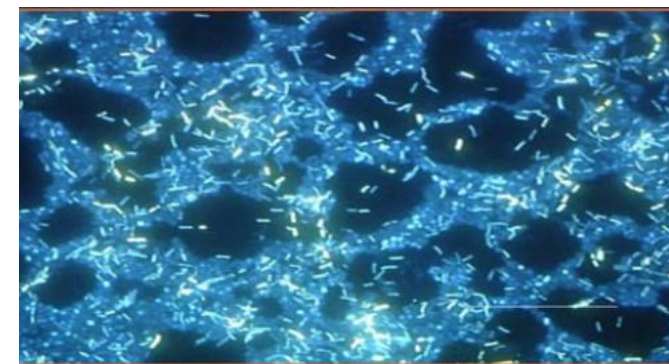
□ 生物膜形成的五个阶段

- 1) 可逆附着阶段
- 2) 不可逆附着阶段
- 3) 微菌落形成阶段
- 4) 生物膜成熟阶段
- 5) 细菌脱落扩散阶段



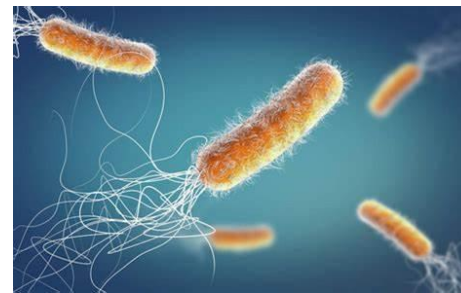
□生物膜

- 鞭毛、纤毛：与细菌生物膜最初形成状态相关
- 胞外聚合物（EPS）：由多糖、蛋白质、核酸等组成，胞外聚合物的生产量与细菌生物膜结构有着直接关系。
- 群体感应信号分子（Quorum sensing）：在细菌生物膜构建的过程中，从浮游状态菌体，到组织化清晰的动态化菌落，细菌群体感应机制在细菌生物膜当中起到了非常重要的作用

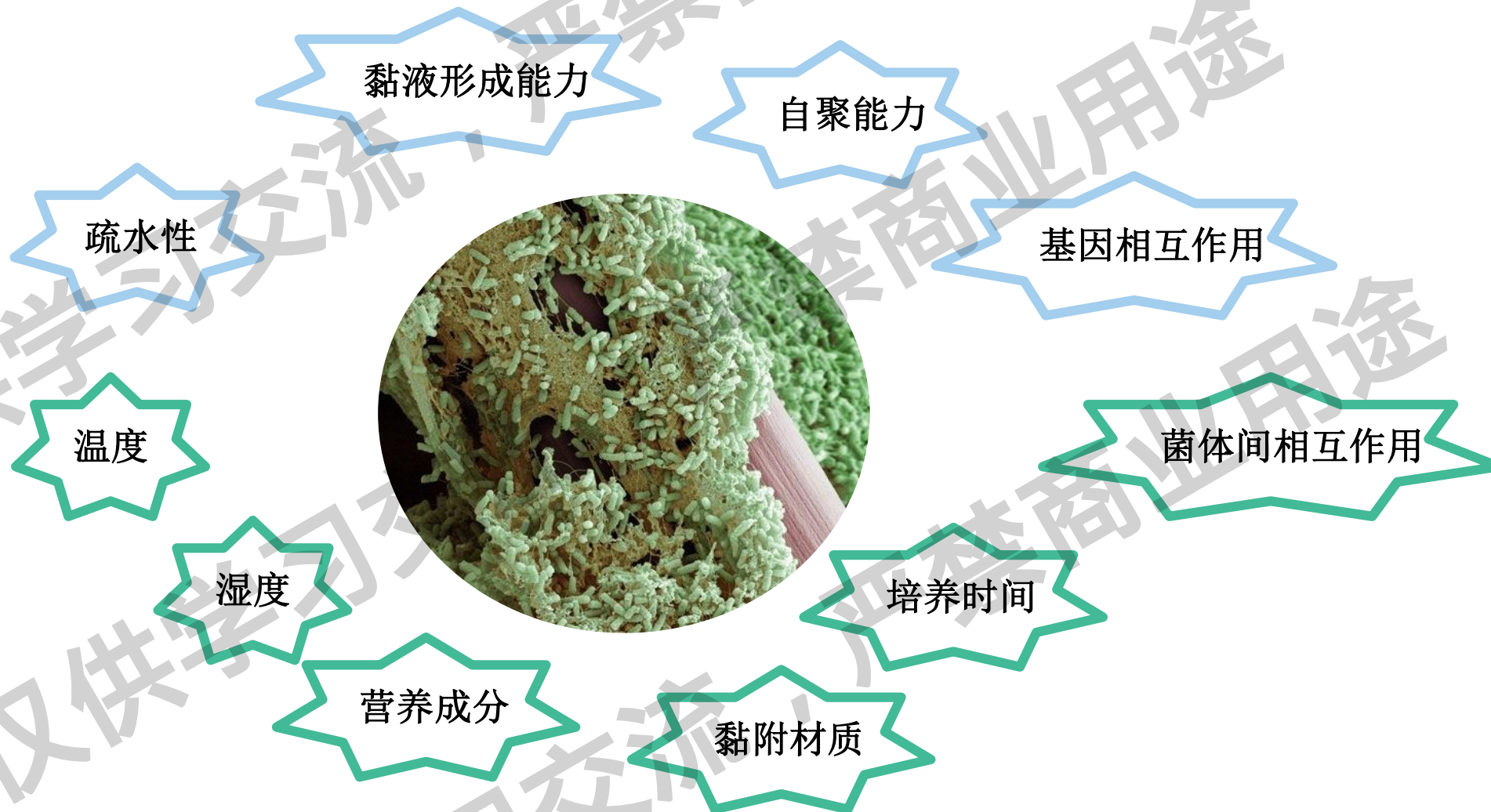


□ 生物膜形成机制

- 生物膜的形成机制较为复杂，不同细菌的形成机制也不同。以假单胞菌为例，目前生物被膜形成机制的研究主要集中在细胞开始在固体表面附着阶段的影响因素上。
- AdnA 蛋白是荧光假单胞菌调控生物被膜形成重要转录因子
- LapA 蛋白作为荧光假单胞菌附着于固体表面的黏附剂，对于形成生物被膜也起着重要的作用。
- 二级信号分子-环状二鸟苷-5'-单磷酸可以调控胞外多糖和表面蛋白的产生



□影响生物膜形成的因素



□ 生物膜对乳品工业造成的危害

- CIP广泛用于乳品生产线的清洗，但CIP有局限性，不能彻底清洗
- 乳品工业上的生物膜形成速度很快
- 生物膜一旦形成，可造成细菌例如耐冷菌难以清除，热交换效率下降和管路腐蚀，由于代谢能力和生理状态的差异，产腐败酶的能力较浮游细菌增加，造成乳品的腐败变质的几率提高



□生物膜

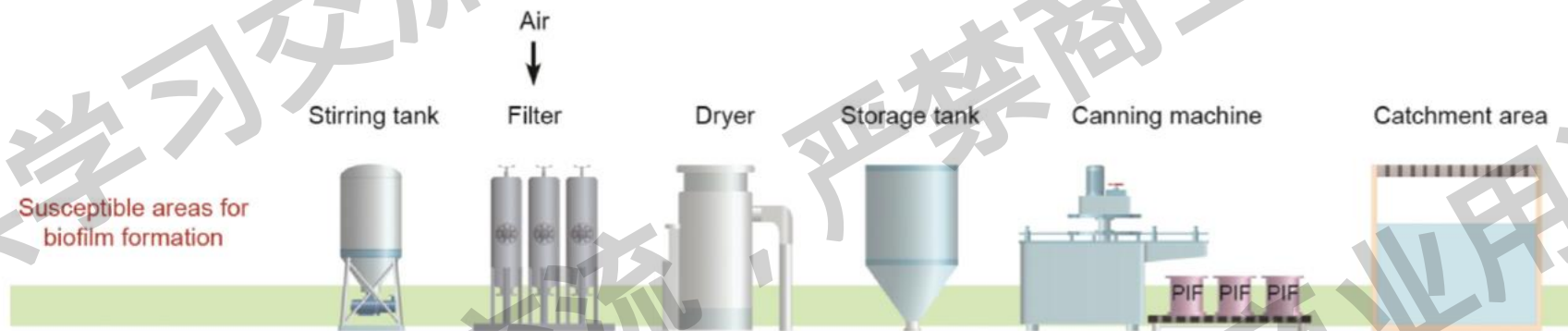
- 在乳品生产的管路和工具表面可形成生物膜。

Sampling points	Materials	Type of bacteria						
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus</i>	LAB	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Listeria</i>
Balance tank	Steel	—	—	—	+	—	+	—
Aging tank	Steel	—	—	+	—	—	—	—
Feeding unit	*	—	—	—	+	+	+	—
Conveyer belt of packaging machine	Rubber	+	—	—	—	+	+	—
Floor drain	*	—	—	—	—	—	+	+
Doormat	*	—	+	—	—	+	+	+
Ultrafiltration membranes	Steel	—	—	—	—	+	—	—
Silo, welded joints	Steel	+	—	+	+	—	—	*
Valves	Steel	—	—	—	—	+	—	*
Air separators, inside	Steel	+	—	+	+	+	—	*
Tank truck, valve, gasket	Rubber	+	—	+	+	—	—	*
Tank truck, air separator	Steel	+	—	—	—	—	+	*
Tank truck, air separator, gasket	Rubber	—	—	+	+	—	+	*
Bulk tank outlet on farm	Steel	*	—	*	*	*	*	+
Rubber liners	Rubber	*	—	*	*	*	*	+
Short milking tube	Rubber	+	—	+	—	+	+	—

(Marchand et al, 2012)

□ 生物膜

- 在乳品生产线的管路和工具表面可形成生物膜。



在婴幼儿配方奶粉加工中，生物膜可能附着的部位

(Ling N et al, 2020)

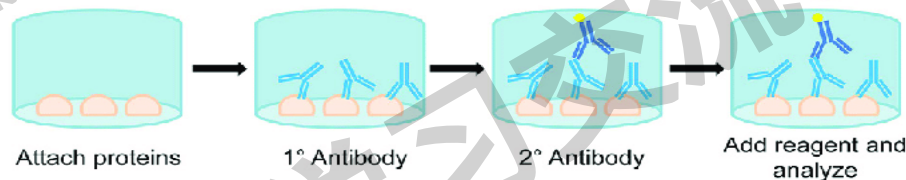
□ 检测具有生物膜形成能力的耐冷菌

- 传统的生化检测方法：耗时长、灵敏度不够
- 酶联免疫法：高成本、抗体获得困难
- 分子技术：16S rRNA, 鉴别菌种分辨率较低

rpoB, 无法鉴别是否具有生物膜形成能力

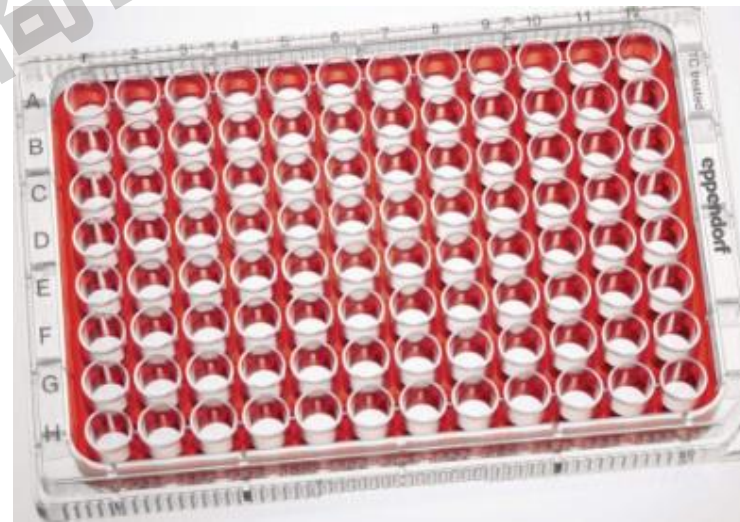
adnA 和 *fliC* 多重PCR检测方法, 可以快速、特异性检测具有生物膜

形成能力的荧光假单胞菌 (Xu Yu et al, 2017)



□ 测定方法

- **微孔板结晶紫染色法：** 培养的生物膜通过结晶紫染色，从而测定菌膜的OD值并与对照组OD值比较来判断菌膜形成能力的强弱（不适用于菌膜中细菌生长和转移）
- **菌膜菌量计数法：** 通过将生物膜通过机械拍打或涡旋的方式使其脱落，之后测定生物膜的含菌量。

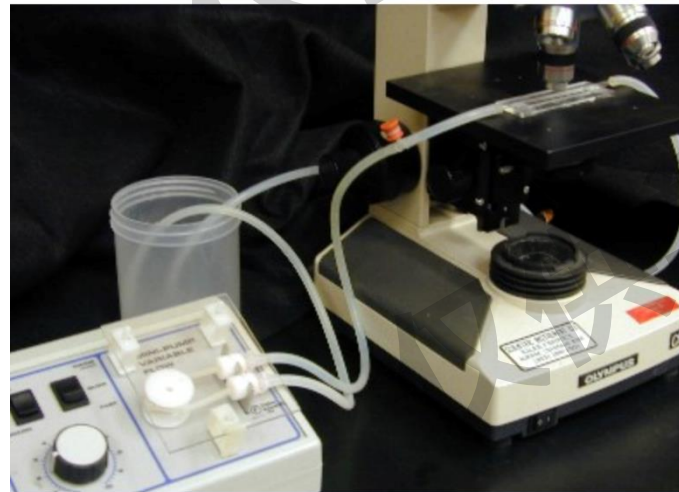


□ 测定方法

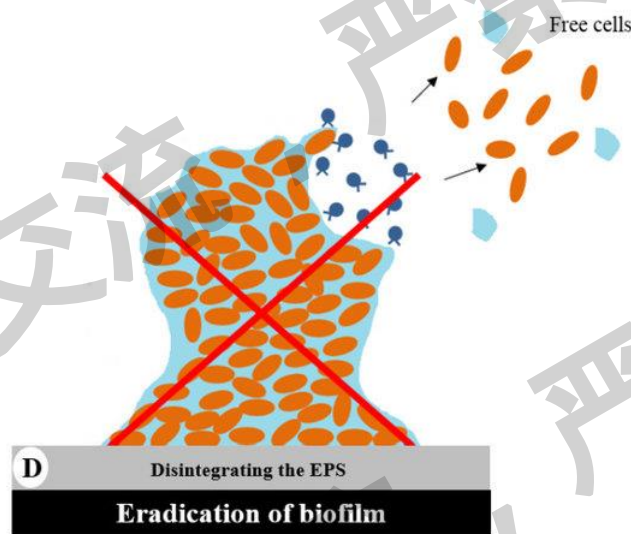
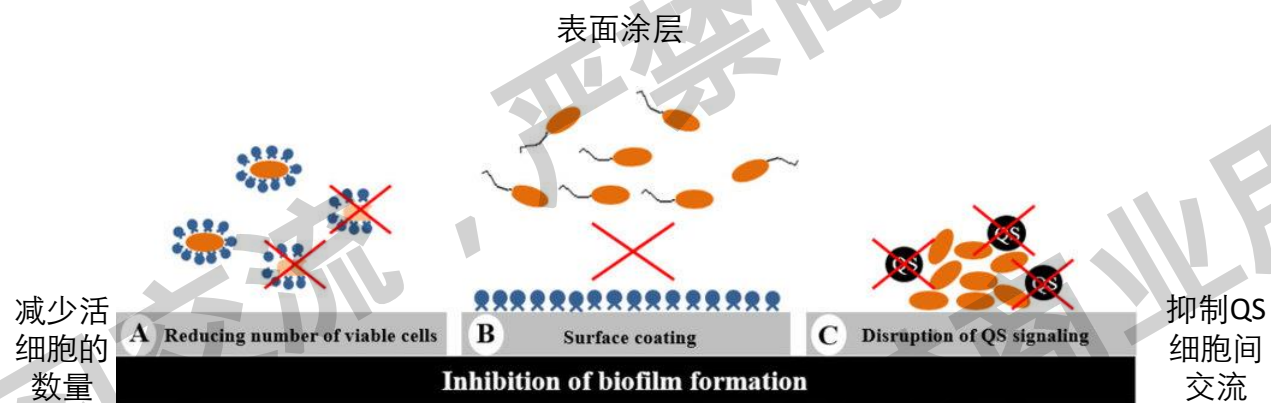
- **荧光染色法**：通过荧光染料染色可以有选择的检测生物膜
- **扫描电镜**：可对细菌生物膜微观立体成像进行观察，分析生物膜和其胞外多糖形成的致密结构，准确直观
- **激光共聚焦显微镜**：可以得到精确的三维图谱，通过图像软件分析生物膜的各项参数



□ 生长模拟装置



Device	Primary Use	Limitations
Microtiter plate*	Useful in genetic studies because of high throughput screening of "static biofilms."	Only for early stages of biofilm formation.
BioFlux	Useful in genetic studies because of high throughput screening of "flow biofilms."	Limited to GFP-expressing bacteria.
Polycarbonate membranes*	Simple methodology and easy to use. Suitable for antimicrobial penetration tests.	Since bacterial cultures are manually deposited on the membrane, biofilms do not naturally develop.
Capillary reactor	Biofilm structure is formed on glass capillary. Direct microscopic observation is feasible.	Biofilm growth is limited to a single surface.
Flow cell reactor*	Biofilms can be studied under either laminar or turbulent flow in order to simulate the changes in fluid velocity that occur during the operation of industrial reactors.	None for the purpose the method was designed for.
Robbin's device*	Using a brass pipe, removable sections of the wall can be removed to test biofilm growth. Used in industrial biofouling.	Just one type of material can be tested at a time.
Modified Robbin's device	Allows several materials to be tested. Used in industrial biofouling.	Used for traditional biofilm cultures and not for genetic investigations.
Calgary biofilm device	High throughput. Rapid and reproducible assays in biofilm susceptibility to antibiotics.	None for the purpose the method was designed for.
Rotating disk reactor	Different biomaterials can be used for colonization and shear forces can be controlled.	High variability seen in biofilm formation between samples.
CDC biofilm reactor	Used to follow biofilm formation (under moderate to high shear), characterize biofilm structure, and assess the effect of antimicrobial agents.	The baffle rotation speed has to be carefully controlled.
Rotating annular reactor*	Application of a well defined shear field	None for the purpose the method was designed for
Batch and batch-fed growth system*	Suitable for a wide variety of biofilm experiments	High variability seen in biofilm formation between samples
Constant-depth film fermentor	Biofilm growth and resistance to antimicrobials in multispecies biofilms	In order to reach a steady-state biofilm, the biofilm has to be grown in a chemostat.
Animal models	Biofilm formation and distribution in tissues can be monitored. Used in a biofilm model of chronic cystitis	Time-consuming and regulatory issues



破坏EPS

(Moura et al, 2017)



物理防控

- 超声波、电磁场、等离子体和电离等
- 难以实施，目前没有被普遍应用



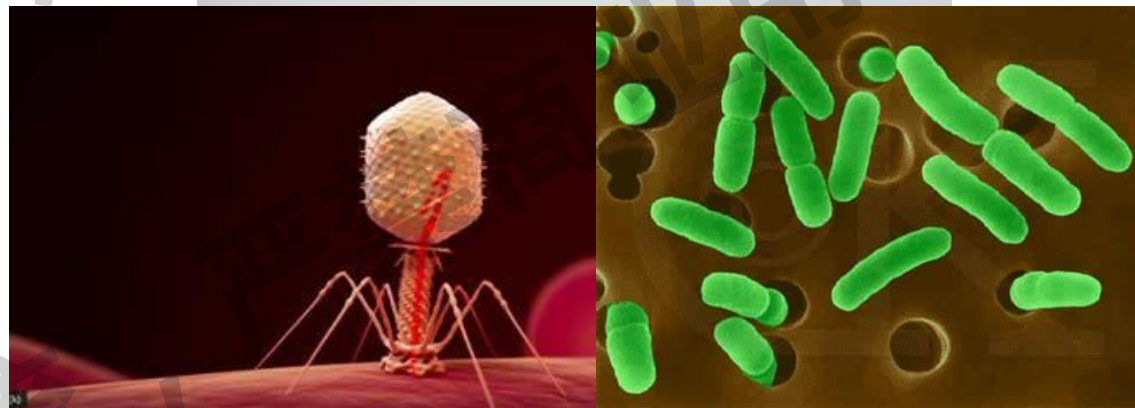
□化学防控

- **常用杀菌剂：**含氯消毒剂、季铵盐消毒剂、醇类等
- **其它杀菌剂：**高锰酸钾、乳酸等
- 可以去除比较多的生物膜，但是很多常用化学试剂本身具有毒性，对消费者有一定的安全风险



□生物防控

- **植物精油**：肉桂醛、百里香酚、香芹酚、白藜芦醇等
- **产细菌素菌株**：乳酸乳球菌、肠球菌、乳杆菌等
- **噬菌体**
- **抑菌肽**
- 较为环保，易有精油挥发气味，目前没有被普遍应用



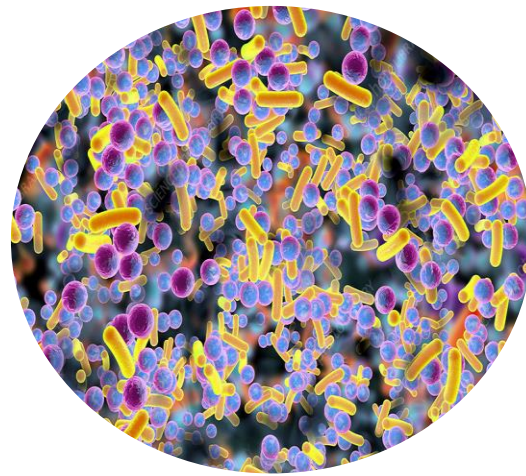
□ 联合防控

- 将物理、化学和生物防控进行组合以达到去除生物膜的效果
- 目前该类防控措施大部分仍在实验室模拟阶段，还未广泛应用

□ 其它方法

- 确保牛体健康、保证奶厂环境及挤奶设备的清洁
- CO₂和N₂ 处理
- 对管道加入涂层，减少细菌的黏附

- 在面对不利环境条件例如当生物被膜接触抗菌药物时，生物膜中的细菌具有保护它们的内在机制
 - 生物膜和细胞形态和结构的改变
 - 生物大分子物质的分布和丰度
 - 多物种生物膜比单物种生物膜具有更大的稳定性和复原力



- ❑ 耐冷菌及其热稳定酶可影响乳制品质量，造成巨大的经济损失
- ❑ 多数耐冷菌可在牛奶储存和加工设备上形成生物膜
- ❑ 耐冷菌生物膜产腐败酶的能力较浮游细菌偏高
- ❑ 生物膜可抵抗恶劣的环境条件和常规的抗菌剂
- ❑ 需要对具有生物膜形成能力的细菌进行快速检测
- ❑ 可从物理、化学、生物等多方面开发多种耐冷菌生物膜的防控措施



Thanks !!
感谢大家聆听