啤酒腐败有害片球菌生物被膜形成活的不可培养状态研究

刘　丽[1,2]，　王增艳[1]，　王佳阳[1]，　邓　阳[*1,2,3]

（1. 青岛农业大学 食品科学与工程学院，山东 青岛 266109；2. 青岛特种食品研究院，山东 青岛 266109；3. 青岛米洛可供应链有限公司，山东 青岛 266108）

摘要：有害片球菌是啤酒酿造环境中较为常见且危害较大的腐败菌。作者比较了啤酒腐败有害片球菌生物被膜和浮游细胞进入活的不可培养（VBNC）状态的能力差异。将5种有害片球菌的浮游细胞和生物被膜细胞在啤酒中于26 ℃下进行培养，结果发现，生物被膜细胞和浮游细胞均可以被诱导进入VBNC状态，但形成VBNC状态的时间有所不同。生物被膜细胞进入VBNC状态至少需要70 d，而浮游细胞进入VBNC状态的时间为126~189 d。作者还用单叠氮丙啶与PCR相结合来扩增16S rDNA和*horA*基因，以证实生物被膜中VBNC细胞的存在。另外，与浮游细胞相比，生物被膜细胞对0.025 mol/L NaOH具有更强的抵抗力，而VBNC状态生物被膜又比同样状态下的浮游细胞具有更强的耐受力。综上所述，在啤酒酿造过程中，相比于浮游细胞，有害片球菌生物被膜在低pH、高浓度的啤酒花苦味物质、乙醇等压力条件下更易被诱导进入VBNC状态，而且还拥有更强的碱耐受力。

关键词：啤酒腐败菌；有害片球菌；生物被膜；活的不可培养状态；碱耐受力

中图分类号：TS 261.1　　**文章编号：**1673-1689(2023)02-0051-07　　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.02.008

Formation of Viable but Non-Culturable Cells of Harmful Beer-Spoilage *Pediococcus damnosus* in Biofilms

LIU Li[1,2]，　*WANG Zengyan*[1]，　*WANG Jiayang*[1]，　*DENG Yang*[*1,2,3]

（1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Qingdao Special Food Research Institute, Qingdao 266109, China; 3. Qingdao Miloco Import and Export Co., Ltd, Qingdao 266108, China）

Abstract: *Pediococcus damnosus* (*P. damnosus*) is one of the most commonly-found beer-spoilage bacteria in breweries. This study compared the ability of biofilm and planktonic cells of beer-spoilage *P. damnosus* to enter a viable but putatively non-culturable (VBNC) state. Planktonic and biofilm cells of five beer-spoilage *P. damnosus* were cultured at 26 ℃ in the lager beer. The results showed that both biofilm and planktonic cells could be induced to enter the VBNC state, however, the state-transition time was variable. It took a minimum of 70 days for the biofilm cells to enter the VBNC state, while 126~189 days for the planktonic cells. The presence of VBNC cells in biofilms

收稿日期：2022-05-15

基金项目：国家自然科学基金项目（32272279，31801517）；山东省自然科学基金项目（ZR2019BC010）。

*** 通信作者：**邓　阳（1986—），男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事食品微生物及生物技术方面的研究。

E-mail：dengyang719@hotmail.com

was further confirmed by PCR coupled with propidium monoazide pretreatment that amplified genes 16S rDNA and *horA*. In addition, the biofilm cells were more resistant to 0.025 mol/L NaOH comparing to the planktonic cells, while the biofilm cells in the VBNC state showed more endurance comparing to the planktonic cells under the same state. In conclusion, this study confirmed that in the brewing process, compared to the planktonic cells, the biofilm of *P. damnosus* could be more easily induced into VBNC state and had stronger tolerance to alkali under low pH, high concentration of bitter hops, ethanol and other pressure conditions.

Keywords: beer-spoilage bacteria, *Pediococcus damnosus*, biofilm, viable but putatively non-culturable state, resistance to NaOH

啤酒是一种深受我国消费者喜爱的酒精饮料，目前啤酒工业已发展成为一个具有现代化规模的工业体系，在国民经济中占有重要的地位。长期以来啤酒一直被公认为安全性食品，原因在于其特定的理化性质，含有乙醇（体积分数 0.5%~10%）、氧（< 0.1 μg/g）、二氧化碳（体积分数 0.5%）、较低的 pH（3.8~4.7）以及存在具有抑菌特性的啤酒花苦味物质等[1]。因此，啤酒能够抵御一般微生物的侵袭，但在啤酒酿造环境中仍然存在一些耐酸、耐啤酒花苦味物质和专性厌氧的腐败微生物，它们可利用酵母的中间代谢产物和酵母自溶物生长繁殖，严重影响啤酒产品质量，如引起啤酒风味变化，影响啤酒的生物稳定性等，从而造成重大的经济损失[2]。一般而言，乳酸菌被认为是最主要且破坏力最大的一类啤酒腐败微生物。其中，有害片球菌（*Pediococcus damnosus*）能在啤酒中生长，并产生双乙酰，给啤酒带来强烈的饭馊味[3]。

啤酒生产通常在封闭的系统中进行，因此清洗时不拆卸设备，而采用原位清洗程序。然而，长时间的生产运行使得腐败乳杆菌多以生物被膜的形式在啤酒酿造环境中，如弯管、密封件和接头等清洗死角处生存下来[4]。生物被膜是微生物黏附于接触表面，通过分泌多糖基质及蛋白质等胞外多聚物，将自身包绕其中而形成的一种群体聚集的膜状结构。相比于浮游细胞，以生物被膜形式存在的细菌对不利环境条件具有更强的抵抗力，更难以被常规手段清除[5]。生物被膜的形成使得微生物残存风险显著增加，导致啤酒产品受到严重的交叉污染和加工后污染，所以对啤酒酿造工业危害极大[4-5]。

有文献指出，生物被膜内部深层细菌代谢率比较低，多处于休眠状态，往往体积较小[6]。多篇报道进一步证实，这些被膜深层细菌正是部分或者全部以 VBNC 状态存在的[7-8]。VBNC 状态是指可培养的非芽孢形成菌遇到环境压力后，在常规培养基上形成的菌落数不断下降直至完全消失，但这些细胞仍然是“活”的，保持有低水平的呼吸作用及代谢活性，在条件适宜后能够再复苏回可培养状态[9]。诱导 VBNC 状态形成的环境压力有很多，包括不适宜的温度和 pH、低氧、干燥、寡营养等[10]。迄今为止，已发现 80 余种细菌可进入 VBNC 状态[11]。2006 年，Suzuki 等首次报道啤酒腐败乳酸菌 *Lactobacillus lindneri* 和 *Lb. paracollinoides* 可形成 VBNC 状态存活于酿造环境中，并保留有污染啤酒的能力[12]。本课题组是国内外较早开展啤酒腐败菌 VBNC 状态研究的团队之一，前期研究发现，有害片球菌（*P. damnosus*）、耐酸乳杆菌（*Lb. acetotolerans*）和短乳杆菌（*Lb. brevis*）等啤酒腐败乳酸菌可经啤酒连续传代和低温等方式诱导形成 VBNC 状态，此时细胞形态会变小，增加了穿透滤膜的风险，且仍能导致啤酒出现浑浊和异杂味，但又无法被常规平板法检出[3,13-16]。因此，“隐身”后的腐败乳杆菌 VBNC 生物被膜可能是啤酒生产过程中主要的微生物安全隐患。

作者首先分析了啤酒腐败乳酸菌 *P. damnosus* 生物被膜的形成规律。采用啤酒连续传代的方法诱导 *P. damnosus* 进入 VBNC 状态，并比较了不同菌株浮游细胞和生物被膜细胞在形成 VBNC 状态过程中活性变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MRS 培养基：Thermo 公司；LIVE/DEAD® BacLight™ 试剂盒：美国 Invitrogen 公司；过氧化氢酶：美国 Sigma-Aldrich 公司；单叠氮化丙啶（PMA）：

美国 Biotium 公司；细菌 DNA 提取试剂盒：中国天根生物科技有限公司。

1.2　仪器与设备

AnaeroPack 罐：日本三菱瓦斯化学株式会社；0.2 g 玻璃纤维过滤器(GF/F，孔径 0.7 μm，直径 25 mm)：英国 Whatman 公司；BH-2 荧光显微镜：日本 Olympus 公司；流式细胞仪：美国 Beckman Coulter 公司；PTC-100 热循环仪：美国 MJ 公司；ABI Prism 377 DNA 测序仪：美国 PE 应用生物系统公司。

1.3　实验方法

1.3.1　实验菌株　本研究中使用的 5 株 *P. damnosus* 均分离自啤酒污染样品，并通过 PCR 扩增后的 16S rDNA 测序进行鉴定[17]，见表 1。这些菌株保存在含有体积分数 25%甘油的 MRS 液体培养基中，于-80 ℃保藏。将每个菌株划线到 MRS 平板上进行活化，然后在 26 ℃的无氧条件下培养 2~3 d。将单菌落接种到 MRS 肉汤中，在 26 ℃下厌氧培养至少 24 h。将培养物转移至按 1:10 的比例稀释的 MRS 肉汤中并生长至指数期(OD_{600}=0.8)。取 10 mL 培养物于离心管中，在 0 ℃条件下，9 500 *g* 离心 20 min，得到的沉淀用 0.85 g/dL 无菌生理盐水(pH 7.2)冲洗 3 次。将培养物重悬于 20 mL 成品啤酒（乙醇体积分数 4.0%、pH 4.7、苦味值 10 BU），起始菌体浓度约 10^7 CFU/mL。

表 1　本研究使用的各种有害片球菌菌株

Table 1　Various *Pediococcus damnosus* strains used in this study

菌株	来源
Pediococcus damnosus ATCC 29358	过滤前的啤酒
Pediococcus damnosus ATCC 8043	过滤后的啤酒
Pediococcus damnosus CN719	啤酒发酵罐
Pediococcus damnosus CN004	上架前的新啤酒
Pediococcus damnosus SAT	成品商业啤酒

1.3.2　生物被膜的形成　采用文献[18]的方法对 5 株 *P. damnosus* 菌株在 96 微孔板中形成生物被膜的能力进行检测。简而言之，将每株菌接种于 MRS 肉汤中在 26 ℃过夜培养，直到细胞密度达到 1×10^7 CFU/mL。再将培养物按每孔 200 μL 转移至灭菌的 96 微孔板上。在 26 ℃下静置培养 96 h 后，用无菌水将微孔板洗涤 3 次，以去除浮游细胞。每孔中剩余的附着细胞用 200 μL 的 0.1 g/dL 结晶紫溶液染色 30 min，随后用 300 μL 无菌水冲洗 2 次，并使其风干。最后，向每个孔添加 200 μL 的体积分数 95%的乙醇，并通过 FLx800 酶标仪(美国 Biotech 公司)测定 $OD_{600\ nm}$ 以确定生物被膜形成。本研究采用含有不同质量浓度葡萄糖(0、0.5、1、2.5、5、10、15、20 g/L)的 MRS 来培养 *P. damnosus* 生物被膜的形成。

1.3.3　浮游细胞和生物被膜细胞的制备　为了促进生物被膜的形成，将 0.2 g 玻璃纤维过滤器置于 250 mL 烧瓶中，然后在 121 ℃高压灭菌 20 min。过滤器可以为细胞附着提供足够的表面积，并促进细胞的去除。将瓶子冷却至室温，向瓶子中加入 20 mL 无菌改良的 MRS 培养基(不含葡萄糖)。每瓶接种 1.0 mL 培养物，在 26 ℃下振荡(30 r/min)培养 36 h。除了添加玻璃纤维过滤器外，同时按照相同的流程来培养 *P. damnosus* 浮游细胞。

1.3.4　VBNC 状态的诱导　啤酒传代培养的诱导方法参照本团队以往研究报道[13]。将上述制备得到的生物被膜和浮游细胞(各约 10^7 CFU/mL)作为 0 代种(0#)，取 1 mL 的 0# 培养物分别接种于成品啤酒(乙醇体积分数 4.0%、pH 4.7、苦味值 10 BU)，并在 26 ℃厌氧静置培养 7 d，即作为第 1 代(1#)。再取 1 mL 的 1# 培养物接种于 10 mL 经脱气的无菌啤酒中，26 ℃培养 7 d，得到第 1 代(2#)。另外，吸取 100 μL 的 1# 培养物涂布于 MRS 固体平板上进行细菌计数，重复上述操作，直至计数平板在 26 ℃厌氧培养 14 d，无单菌落出现或可培养菌数<1 CFU/mL，可认为此时细胞完全进入 VBNC 状态，诱导结束[13]。

本研究通过常规 MRS 琼脂平板计数对可培养细胞进行测定。根据本课题组之前的报道[3]，采用 AODC 方法和荧光显微镜法来评估细胞总数。将细胞样品在 pH 7.0 的 0.5 mol/L 磷酸钠缓冲液中连续稀释，用终体积分数 2%的福尔马林固定，并用终质量浓度为 0.01 g/dL 的吖啶橙染色。培养 2 min 后将悬浮液过滤到 0.22 μm 微孔膜过滤器上，然后再用荧光显微镜进行计数。使用 LIVE/DEAD® BacLight™ 试剂盒与流式细胞仪结合对细胞活力进行测定，试剂盒中的 2 种荧光染料碘化丙啶(PI)和 SYTO 9 分别用于检测死细胞和活细胞。荧光染料以 2:1 的比例混合，将洗涤后的样品在黑暗中用染料混合物染色 20 min，最后通过流式细胞仪测定活细胞和死细胞的数量。活细胞和可培养细胞数之间的差值可被确定为 VBNC 细胞数。

1.3.5　VBNC 状态的复苏　待进入 VBNC 状态后，

将 50 μL 细胞样品接种到有过氧化氢酶的 MRS 平板上(1 500 U/皿),以不含过氧化氢酶和含有经热变性过氧化氢酶(65 ℃、20 min)的 MRS 培养基作为对照组。在 26 ℃厌氧培养 14 d 后对菌落进行计数,进行了啤酒污染试验,以检测细胞在不同状态下的啤酒腐败能力。

1.3.6 单叠氮化丙啶预处理 PCR 扩增 根据本课题组之前的研究报道[15],将单叠氮化丙啶(PMA)溶解于体积分数 20%二甲基亚砜中,随后添加至上述 5 株 *P. damnosus* 菌株的 VBNC 生物被膜中,使得终质量浓度为 20 mg/L,先前已有报道该质量浓度适用于活的乳酸菌细胞定量[3]。在利用 PMA 对样品基因组进行前处理时,PMA 可与死细胞 DNA 分子共价交联,并抑制死细胞 DNA 分子的 PCR 扩增[3]。将处理过的样品于室温下黑暗中培养 10 min,然后在 20 cm 的距离下暴露于 500 W 卤素光源 10 min,随后按照 TIANamp Bacteria DNA 试剂盒说明书从以上细胞样本中提取基因组 DNA。表 2 列出了 16S rDNA 和 horA 引物对。PCR 扩增在 PTC-100 热循环仪中进行,PCR 扩增条件:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 1 min,52 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 1.5 min,共计 35 个循环;72 ℃延伸 10 min。扩增后,用 ABI Prism 377 DNA 测序仪对 PCR 产物进行测序,并与 NCBI 上的 GenBank 序列数据库中的已有序列进行 BLAST 分析。

表 2 本研究中使用的特定引物列表

Table 2 List of specific primers used in this study

目标基因	特定引物	核苷酸序列
16S rDNA	Forward	5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′
	Reverse	5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′
horA	Forward	5′-ATCCGGCGGTGGCAAATCA-3′
	Reverse	5′-AATCGCCAATCGTTGGCG-3′

1.3.7 碱耐受度 在啤酒生产中,常用 0.025 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)溶液对发酵罐等设备进行清洗和消毒[16]。取 5 mL 活菌浓度为 10^5 CFU/mL 的 *P. damnosus* CN004 的正常和 VBNC 状态生物被膜和浮游细胞菌悬液,室温下 5 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,沉淀中分别加入浓度为 0.025 mol/L 的 NaOH,室温反应 3 min。随后,样品离心去除上清液,并加入无菌水清洗残余的碱,再接种于含 1 500 U/皿过氧化氢酶的 MRS 培养基,26 ℃厌氧培养 14 d 观察生长情况。

1.3.8 统计分析 实验均设 3 次重复、3 个平行,结果以平均值以±标准偏差表示。图表由 Origin 8.0 软件制作,并采用 SPSS 17.0 软件 Duncan 法进行显著性分析(P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 生物被膜的形成

细菌形成生物被膜的能力多取决于培养基中的营养物质[18],因此分析了 5 株 *P. damnosus* 菌株在不同葡萄糖质量浓度的 MRS 培养基中形成生物被膜的能力。

如图 1 所示,葡萄糖质量浓度对生物被膜形成的影响较大,当葡萄糖质量浓度较低时(0~1 g/L),对 5 株 *P. damnosus* 菌株形成生物被膜更为有利。然而,当质量浓度达到 5.0 g/L 以上时,生物被膜形成能力显著下降(P<0.05)。在含有 20 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基中生长 96 h 后,几乎没有观察到生物被膜的形成。Lebeer 等证实,鼠李糖乳杆菌 GG 菌株在含 20 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基中失去了形成生物被膜的能力[19]。Ju 等也发现,MRS 培养基中高质量浓度的葡萄糖会强烈抑制沙门氏菌生物被膜的形成[18]。

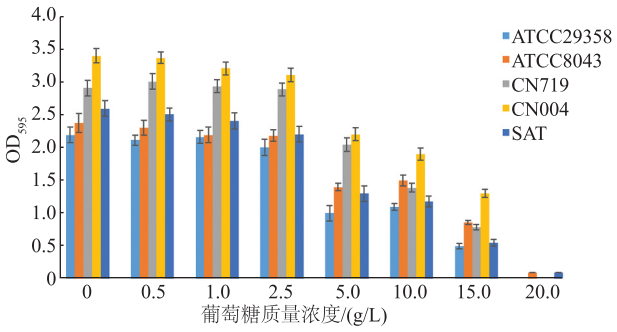


图 1 葡萄糖质量浓度对 5 株有害片球菌菌株形成生物被膜的影响

Fig. 1 Effect of glucose concentration on biofilm formation of five *Pediococcus damnosus* strains

此外,我们还发现,不同 *P. damnosus* 菌株在形成生物被膜的能力方面差异很大,595 nm 处吸光度值反映出 *P. damnosus* 菌株之间生物被膜形成能力的高低。结果表明,在没有葡萄糖存在的情况下,*P. damnosus* CN004 在 MRS 培养基中表现出最强的生物被膜形成能力,其次是 CN719 菌株(P<0.05),

其余 *P. damnosus* 菌株的生物被膜形成能力无显著差异（$P>0.05$）。Somers 等发现，非发酵剂乳酸菌可以在奶酪制造设备上形成生物被膜[20]。Kubota 等指出，从洋葱中分离出的乳酸菌可以形成生物被膜[21]。Olszewska 等研究了啤酒麦汁和酒醋中 6 种乳酸菌形成生物被膜的情况[22]，结果表明，植物乳杆菌菌株比短乳杆菌和干酪乳杆菌更易形成生物被膜，而且生物被膜形成量也更多。

2.2　生物被膜中 VBNC 细胞的形成

如图 2 所示，啤酒连续传代培养处理可以诱导这 5 株 *P. damnosus* 菌株的生物被膜细胞和浮游细胞逐渐进入 VBNC 状态。在整个诱导过程中，菌株 ATCC29358、ATCC8043、SAT、CN719 和 CN004 生物被膜细胞的平板计数分别在第 10、11、13、17、18 次啤酒内传代培养后下降至无法检测的水平（<0.1 CFU/mL）。另外，使用 LIVE/DEAD ® BacLight™ 试剂盒进行染色和流式细胞仪观察发现，在诱导过程中，所有 5 株菌株的活细胞数均逐渐下降至约 10^6 CFU/mL 后趋于稳定，而且在啤酒连续传代培养处理后，生物被膜细胞较浮游细胞失去可培养能力更快，CN004 和 ATCC8043 这两株菌在不同形式下进入 VBNC 状态的速度差异最大，达到了 63 d。

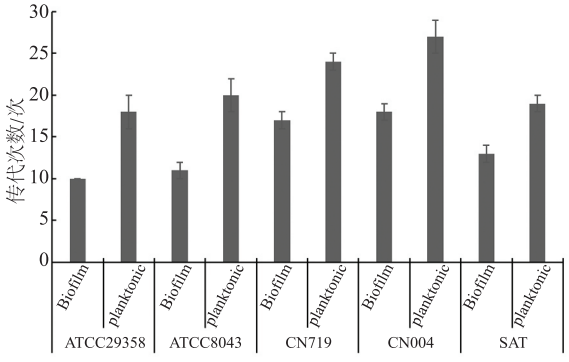
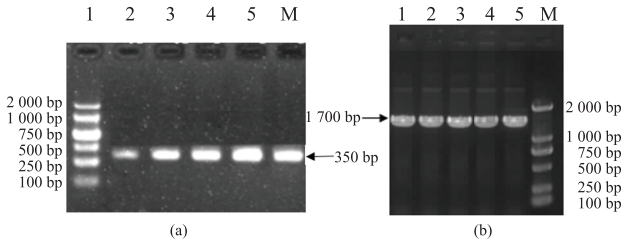


图 2　生物被膜细胞和浮游细胞进入 VBNC 状态的时间

Fig. 2　Time of entry into VBNC state for both biofilm and planktonic cells

Magajna 和 Schraft 发现，空肠弯曲杆菌生物被膜细胞在 4 ℃时进入 VBNC 状态的速度比浮游细胞更快[23]。随后，作者从用 PMA 预处理的 VBNC 细胞中提取 DNA，再利用 PCR 扩增 16S rDNA 和 *horA* 基因，并对所得产物进行测序。通过 PCR 结合 PMA 预处理扩增 16S rDNA 和 *horA* 基因，进一步证实了不可培养的各菌株生物被膜中存在 VBNC 状态细胞，并仍能污染啤酒，见图 3。*horA* 基因是评判细菌是否能导致啤酒腐败变质的重要且有效指标之一。本团队前期的研究也发现，该基因与多种啤酒腐败乳酸菌分离株的啤酒污染能力存在相关性[3]。Haakensen 等人指出，利用 *horA* 作为靶基因的多重 PCR 在预测细菌分离物的啤酒污染能力方面有更高的准确性[24]。



M：DS 2 000 DNA Marker；1~5 分别为 ATCC29358、ATCC8043、CN719、CN004 和 SAT。

图 3　5 株有害片球菌生物被膜中 *horA*（a）16S rDNA（b）基因的检测结果

Fig. 3　Determination of the presence of *horA* (a) and 16S rDNA (b) genes in biofilms of five *Pediococcus damnosus* strains

2.3　生物被膜中 VBNC 细胞的复苏

VBNC 细胞在含有 1 500 U/皿过氧化氢酶的培养基上可逐渐恢复可培养性，见表 3。同时，热失活过氧化氢酶无法使 VBNC 细胞复苏。本研究的结果证实，添加过氧化氢酶对 VBNC *P. damnosus* 细胞的复苏是有效的，这也与之前文献报道的结论一致。因此，*P. damnosus* 细胞形成 VBNC 状态可能与胞内 ROS 含量变化有关。以往的研究多集中在乳酸菌浮游细胞中 VBNC 状态的形成及复苏[25]，而本研究首次报道了啤酒腐败乳酸菌生物被膜中 VBNC 细胞的形成。生物被膜细胞进入 VBNC 状态的速率要快于浮游细胞，这可能是由于浮游细胞和生物被膜细胞在基因表达上的差异所致。因此，需要进一步的研究来分析相关基因表达在乳酸菌 VBNC 状态转变中的作用。

2.4　碱耐受度

如图 4 所示，与浮游细胞相比，*P. damnosus* CN004 的生物被膜细胞对 0.025 mol/L NaOH 具有更强的耐受力，而且 VBNC 状态生物被膜细胞又比同样处于此状态下的浮游细胞具有更强的碱耐受力。已有多篇文献报道称，处于 VBNC 状态的细菌对不良环境具有一定的适应性和抵抗力[26-27]。Berlin

表 3　添加过氧化氢酶对有害片球菌生物被膜 VBNC 细胞的复苏作用

Table 3　Resuscitation of VBNC *Pediococcus damnosus* cells by the addition of catalase

菌株	对照菌落数（未添加过氧化氢酶）	添加热失活过氧化氢酶的菌落数	添加过氧化氢酶(1 500 U/皿)的菌落数/(CFU/mL)*
Pediococcus damnosus ATCC 29358	0	0	90±4^{c}
Pediococcus damnosus ATCC 8043	0	0	86±2^{c}
Pediococcus damnosus CN719	0	0	82±6^{c}
Pediococcus damnosus CN004	0	0	177±7^{a}
Pediococcus damnosus SAT	0	0	101±10^{b}

等发现，副溶血性弧菌在进入 VBNC 状态后，与正常可培养细胞相比，对热、低盐和酸性条件有着更强的抵抗力[28]。

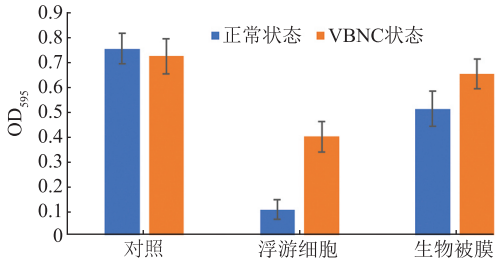


图 4　VBNC 状态的有害片球菌生物被膜细胞和浮游细胞对 0.025 mol/L NaOH 的耐受力

Fig. 4　Resistance of VBNC *Pediococcus damnosus* CN004 for both biofilm and planktonic cells to 0.025 mol/L NaOH

3 结　语

啤酒生产通常在封闭系统中进行，在该系统中应用就地清洁程序，无须拆卸设备。然而，长时间的生产运行可以使啤酒腐败细菌在难以清洁和消毒的设备区域存活，例如弯曲处、边缘、管道中的死角、密封处和接头。这些微生物细胞可能逐渐形成生物被膜，甚至进入 VBNC 状态。这项研究证实，啤酒变质的乳酸杆菌可以形成生物被膜。生物被膜细胞和浮游细胞都可以被诱导进入 VBNC 状态，但进入的时间各不相同。生物被膜细胞在 70 d 就能够进入 VBNC 状态，而浮游细胞需要更长的诱导时间(126~189 d)。因此，我们的研究结果证实，5 株有害片球菌菌株都可以在生物被膜中进入 VBNC 状态。重要的是，在胁迫条件下，这些生物被膜细胞比浮游细胞更快地进入 VBNC 状态。这项工作证实了使啤酒腐败的有害片球菌可能隐藏在啤酒酿造环境中而不被检测到，并且具有更强的碱耐受力，因此应高度重视啤酒行业的微生物质量控制，尤其是关于 VBNC 状态生物被膜的产生。本研究也为啤酒行业的风险评估提供了理论基础。

参考文献：

[1] DENG Y,LIM J,LEE G H,et al. Brewing rutin-enriched lager beer with buckwheat malt as adjuncts[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**,2019,29(6):877-886.

[2] SUZUKI K,IIJIMA K,SAKAMOTO K,et al. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria[J]. **Journal of the Institute of Brewing**,2006,112(2):173-191.

[3] DENG Y,ZHAO J,LI H,et al. Detection of culturable and viable but non-culturable cells of beer spoilage lactic acid bacteria by combined use of propidium monoazide and horA-specific polymerase chain reaction[J]. **Journal of the Institute of Brewing**,2016,122(1):29-33.

[4] RIEDL R,FÜTTERER J,GODERBAUER P,et al. Combined yeast biofilm screening: Characterization and validation of yeast related biofilms in a brewing environment with combined cultivation and specific real-time PCR screening of selected indicator species[J]. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**,2019,77(2):99-112.

[5] SREY S,JAHID I K,HA S D. Biofilm formation in food industries:A food safety concern[J]. **Food Control**,2013,31:572-585.

[6] ALVAREZ-ORDÓNEZ A,COUGHLAN L M,BRIANDET R,et al. Biofilm in food processing environments:Challenges and

opportunities[J]. **Annual Review of Food Science and Technology**，2019，10：173-195.
[7] TREVORS J T. Viable but non-culturable（VBNC）bacteria：Gene expression in planktonic and biofilm cells[J]. **Journal of Microbiological Methods**，2011，86：266-273.
[8] MAGAJNA B A，SCHRAFT H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable （VBNC）in low nutrient conditions at 4 ℃ more quickly than their planktonic counterparts[J]. **Food Control**，2015，50：45-50.
[9] AYRAPETYAN M，OLIVER J D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety[J]. **Current Opinion in Food Science**，2016，8：127-133.
[10] ZHAO X，ZHONG J，WEI C，et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens[J]. **Frontiers in Microbiology**，2017，8：580.
[11] DONG K，PAN H，YANG D，et al. Induction，detection，formation，and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**，2020，19：149-183.
[12] SUZUKI K，IIJIMA K，ASANO S，et al. Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria[J]. **Journal of the Institute of Brewing**，2006，112：295-301.
[13] DENG Y，LIU J，LI L，et al. Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strain 2011-8[J]. **International Journal of Food Microbiology**，2015，206：96-101.
[14] LIU J，LI L，PETERS B M，et al. Draft genome sequence and annotation of *Lactobacillus acetotolerans* BM-LA14527，a beer-spoilage bacteria[J]. **FEMS Microbiology Letters**，2016，363：fnw201.
[15] PIAO M，LI Y，WANG Y，et al. Induction of viable but putatively non-culturable *Lactobacillus acetotolerans* by thermosonication and its characteristics[J]. **LWT–Food Science and Technology**，2019，109：313-318.
[16] WANG Z，CHAO Y，DENG Y，et al. Formation of viable，but putatively non-culturable（VPNC）cells of beer-spoilage lactobacilli growing in biofilms[J]. **LWT–Food Science and Technology**，2020，133：109964.
[17] DENG Y，LIU J，LI H，et al. An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria[J]. **Journal of the Institute of Brewing**，2014，120（2）：127-132.
[18] JU X，LI J，ZHU M，et al. Effect of the luxS gene on biofilm formation and antibiotic resistance by *Salmonella serovar* Dublin[J]. **Food Research International**，2018，107：385-393.
[19] LEBEER S，VERHOEVEN T L A，PEREA VÉLEZ M，et al. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2007，73（21）：6768-6775.
[20] SOMERS E B，JOHNSON M E，WONG A C L. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment[J]. **Journal of Dairy Science**，2001，84（9）：1926-1936.
[21] KUBOTA H，SENDA S，TOKUDA H，et al. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149[J]. **Food Microbiology**，2009，26：592-597.
[22] OLSZEWSKA M A，NYNCA A，BIALOBRZEWSKI I. Biofilm formation by lactobacilli and resistance to stress treatments[J]. **International Journal of Food Science and Technology**，2019，54：3058-3065.
[23] MAGAJNA B A，SCHRAFT H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable （VBNC）in low nutrient conditions at 4 ℃ more quickly than their planktonic counterparts[J]. **Food Control**，2015，50：45-50.
[24] HAAKENSEN M，SCHUBERT A，ZIOLA B. Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer[J]. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**，2008，66（2）：63-70.
[25] LIU J，DENG Y，PETERS B M，et al. Transcriptomic analysis on the formation of the viable putative non-culturable state of beer-spoilage *Lactobacillus acetotolerans*[J]. **Scientific Reports**，2016，6（1）：1-11.
[26] WONG H C，WANG P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses[J]. **Journal of Applied Microbiology**，2004，96（2）：359-366.
[27] YIN H，HAO J，ZHU Y，et al. Thermosonication and inactivation of viable putative non-culturable *Lactobacillus acetotolerans* in beer[J]. **Journal of the Institute of Brewing**，2019，125（1）：75-82.
[28] BERLIN D L，HERSON D S，HICKS D T，et al. Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure[J]. **Applied & Environmental Microbiology**，1999，65（6）：2776.