

酵母菌促进单核细胞增生李斯特氏菌的生长

曹悦, 孙蕊, 李树垚, 吴燕涛, 王丹, 蔡雪凤, 宋丽萍

(北京市食品安全监控和风险评估中心, 北京 100092)

摘要: 为了缩短单核细胞增生李斯特氏菌(单增李斯特氏菌)的前增菌时间,提升检测效率,本研究将酵母菌(ATCC 9763)作为一种生长促进剂加入到单核细胞增生李斯特氏菌的前增菌培养基(LB1)中,结果表明添加适量的酵母菌可以使单增李斯特氏菌的生长速度提升近100%,并且这种促进作用与培养过程中酵母菌的接种量、培养基的溶氧量以及培养方式密切相关。根据酵母菌的生长特性分析,这种促进作用产生的原因很有可能是由于酵母菌在生长过程中发酵分解了培养基中的糖类等营养物质,改善了单增李斯特氏菌的营养条件,从而提高了单增李斯特氏菌的繁殖速度。本研究为缩短单增李斯特氏菌检测的富集培养时间,提高检测效率奠定了很好的基础,同时也侧面提示我们要关注发酵类食品遭受单增李斯特氏菌污染的食品安全风险。

关键词: 单核细胞增生李斯特氏菌; 酵母菌; 促进; 富集

文章编号: 1673-9078(2020)04-138-142

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.018

Yeast Promotes the Growth of *Listeria monocytogenes*

CAO Yue, SUN Rui, LI Shu-yao, WU Yan-tao, WANG Dan, CAI Xue-feng, SONG Li-ping

(Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Beijing 100092, China)

Abstract: In order to shorten the propagating time of *Listeria monocytogenes* and improve the detection efficiency, yeast (ATCC 9763) was added to LB1 medium of *Listeria monocytogenes* as a growth promoter. The results showed that the growth rate of *Listeria monocytogenes* could be increased about 100% by adding appropriate amount of yeast. Moreover, the promotion effect was related to the inoculation amount of yeast, dissolved oxygen in the medium and the culture mode. According to the analysis of the growth characteristics of yeast, maybe the degradation of saccharides and other nutrients by yeasts improved the growth environment, increasing the growth rate of *Listeria monocytogenes*. This result laid a good foundation for shortening the pre-enrichment time and improving the detection efficiency of *Listeria monocytogenes*. On the other hand, it also suggested that more attention to the food safety risk of fermented food contaminated by *Listeria monocytogenes* should be paid.

Key words: *Listeria monocytogenes*; yeast; promote; enrichment

引文格式:

曹悦,孙蕊,李树垚,等.酵母菌促进单核细胞增生李斯特氏菌的生长[J].现代食品科技,2020,36(4):138-142

CAO Yue, SUN Rui, LI Shu-yao, et al. Yeast promotes the growth of *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 138-142

随着人们生活水平的不断提升,食源性致病菌对人类健康的威胁越来越受到重视^[1]。人们对食源性致病菌检测速度和鉴定精准度的要求也越来越高^[2]。PCR技术的问世极大程度的缩短了食源性致病菌的检测时间,然而,由于食源性致病菌检测过程中前增菌时间过于漫长,仍无法真正实现食源性致病菌的快速检测^[3]。因此,有效缩短前增菌的培养时间是真正

收稿日期: 2019-10-30

基金项目: 北京市科技计划项目(D171100002217002; Z191100008619007);

国家市场监督管理总局科技计划项目(2019MK004)

作者简介: 曹悦(1989-),女,工程师,研究方向: 食品检测技术

通讯作者: 宋丽萍(1979-),女,博士,高级工程师,研究方向: 食品检测技术

实现食源性致病菌快速检测的关键。其中优化前增菌培养基成分和培养条件,筛选细菌生长促进剂都是有效缩短前增菌培养时间的技术手段。

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)属于革兰氏阳性菌,简称单增李斯特氏菌,是一种常见的食源性致病菌^[4]。世界贸易组织于20世纪90年代将其列为四大食源性致病菌之一^[5]。其广泛存在自然界中,人受感染后可导致脑膜炎、肠胃炎、败血症、孕妇流产等,新生儿及免疫力低下者更易感染^[6]。因此,本研究以单增李斯特菌为研究对象,通过筛选生长促进剂来缩短致病菌检测的前增菌培养时间。研究发现,在LB1培养基中添加适量的酵母菌,在合适的培养条件下,可以使单增李斯特菌的生长速度提高近

一倍。并且,这种促进作用是广谱性的,而不是针对某一株固定单增李斯特菌所产生的。这一研究发现可以有效的缩短单增李斯特菌的前增菌时间,提高检测效率。同时,这一研究也提示我们要关注对于应用酵母菌生产的食物被单增李斯特菌污染的食品安全风险。

目前,针对酵母菌促进单增李斯特菌的生长的具体原理仍在进一步的研究中,根据资料检索信息分析,酵母菌很有可能是通过降解培养基成分,改善单增李斯特氏菌的营养条件,从而促进单增李斯特菌的生长^[7-9]。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

实验所用的酵母菌(ATCC9763)和单增李斯特氏菌(ATCC19115)分别购于美国模式菌种收集中心(ATCC);其他单增李斯特氏菌均分离自真实食品样本,由本实验室保藏。

单增李斯特氏菌显色培养基产自法国科玛嘉;其他实验所需培养基均购自于北京陆桥技术股份有限公司。

1.2 仪器与设备

1300 系列 A2 型二级生物安全柜, Thermo Scientific; 试管旋转混匀器, Thermo Scientific; BCD-228F 型电冰箱, 海尔; 恒温培养箱, 松下。

1.3 方法

1.3.1 菌种的复苏与活化

将菌种从-80℃冰箱取出,37℃水浴快速震荡融化后,在适宜的培养基平板上划线并37℃培养,24h后,划线转接适宜的培养基斜面,继续37℃培养,24h后,活化好的菌株直接用于实验或4℃保存;4℃保存的细菌在用于实验之前,仍需在适宜的培养基上划线活化,37℃培养24h后使用。

酵母菌复苏的培养基配方:酵母膏3.0g,麦芽浸膏3.0g,蛋白胨5.0g,葡萄糖10.0g,琼脂20.0g,蒸馏水1.0L,pH7.4;单增李斯特氏菌复苏的培养基配方:心提取物5.0g,脑提取物12.5g,月示胨10.0g,葡萄糖2.0g,NaCl5.0g,Na₂HPO₄2.5g,琼脂15.0g,蒸馏水1.0L,pH7.4。

1.3.2 接种

用PBS将活化好的菌种从斜面上冲下来,反复吹吸,使菌体均匀的悬浮在生理盐水中,7500×g,离心

3 min,弃上清,用新鲜的PBS重新悬浮菌体,吹吸后,7500×g,离心3 min,弃上清,再次用PBS悬浮菌体并反复吹吸。将菌体悬浊液的麦氏浊度调整至1.0。其中酵母菌悬液不需要稀释可直接作为接种液接种,单增李斯特氏菌悬液需要进行10倍稀释,稀释5次后作为接种液接种。

1.3.3 平板计数

取1 mL单增李斯特氏菌的细菌培养液,按照10倍梯度进行倍比稀释,选取三个连续梯度的稀释液样本100 μL,均匀的涂布在李斯特显色培养基平板上,37℃培养20 h后计数。菌落总数在30~300之间的平板为有效计数平板。每个梯度涂做3个平行,取平均数计数。

1.3.4 加标食品样本的处理

根据GB 4789.30-2016,取预包装食品25 g,加入225 mL LB1 培养基,均质。对照样品中仅加入单增李斯特氏菌种子液600 μL,而检测样品中除了添加相同数量的单增李斯特氏菌外,还添加了酵母菌种子液1 mL。均质后,取20 mL的对照组培养基和样品组培养基分别置于50 mL的离心管中,拧紧管盖,10 r/min,37℃培养20 h后计数。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌对单增李斯特氏菌的促进作用

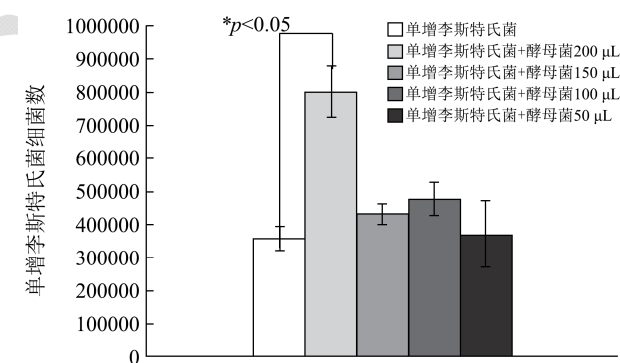


图1 适量酵母菌可以有效促进单增李斯特氏菌的生长

Fig.1 The growth of *Listeria monocytogenes* can be effectively promoted by appropriate amount of yeast

为了检验酵母菌对单增李斯特菌生长速度的影响, LB1 培养基被分装于50 mL灭菌离心管中,每管20 mL,共5管。在每管培养基中均接种50 μL单增李斯特氏菌种子液,而酵母菌的接种量依次为0 μL、50 μL、100 μL、150 μL以及200 μL种子液。拧紧离心管盖,将离心管置于试管旋转架上,10 r/min,37℃培养20 h后计数。结果如图1所示,当酵母菌的添加量为50 μL时,生长促进效率最低,仅为2%左右;当

酵母的添加量为 100 μL 时, 生长促进效率略有提高, 为 27%; 当酵母的添加量为 150 μL 时, 酵母菌对单增李斯特氏菌的生长促进效率为 11%。综上所述, 当酵母的添加量为 50~150 μL 的时候, 与对照组相比, 单增李斯特氏菌的生长速度未见明显变化 ($p>0.05$)。但是当酵母菌的添加量上升至 200 μL 时, 单增李斯特氏菌的生长速度有了显著的提升, 与对照组相比, 生长速度增加了近乎 100% ($p<0.05$)。为了进一步验证实验结果, 本实验重复了 3 次。实验结果表明, 在适当的添加浓度下, 酵母菌可以显著促进单增李斯特氏菌的生长, 这种促进作用与酵母菌和单增李斯特氏菌的接种比例密切相关。

2.2 装液量影响酵母对单增李斯特氏菌生长的促进作用

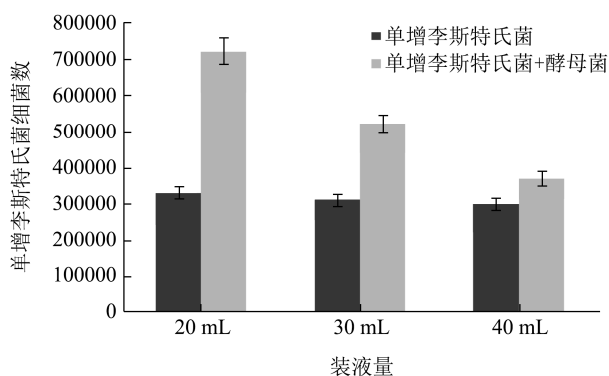


图2 酵母菌对单增李斯特氏菌的促进作用与培养基的溶氧量相关

Fig.2 The promoting effect of yeast on *Listeria monocytogenes* is related to dissolved oxygen in medium

在细菌发酵过程中, 培养基装液量的高低与发酵过程中培养基中的氧气含量呈负相关性。因此, 在细菌的生长过程中, 装液量的多少与细菌的生长状态密切相关。本研究详细探讨了装液量是否影响酵母菌对单增李斯特氏菌生长的促进作用。将 LB1 培养基分别分装在 50 mL 无菌离心管中。实验分为三组, 每组两管。三组的装液量分别为 40 mL、30 mL 和 20 mL。每组中均有一管仅接种 50 μL 单增李斯特氏菌种子液, 作为对照管。另一管则同时接种 50 μL 单增李斯特氏菌种子液和 200 μL 酵母菌种子液。接种后, 拧紧离心管盖, 将离心管置于试管旋转架上, 10 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h 后计数。结果如图 2 所示, 装液量的高低可以显著影响酵母菌对于单增李斯特氏菌生长的促进作用。在装液量不同的培养条件下, 酵母菌对单增李斯特氏菌的生长均表现出一定的促进作用。随着装液量的下降, 酵母菌对单增李斯特氏菌生长的促进作

用明显增强, 当装液量为每管 20 mL 时, 酵母菌对于单增李斯特氏菌生长的促进作用是最强的, 可以使单增李斯特氏菌的生长速度提升 100%左右。随着装液量的增加, 单增李斯特氏菌的增长速度逐步下降为 83%和 33%。由于发酵过程中装液量的多少与培养基的溶氧量高低呈负相关性, 因此根据图 2 的研究结果可以推测, 酵母菌对于单增李斯特氏菌的生长促进作用与培养基的溶氧量具有一定的相关性, 适当的增加发酵过程中培养基中的氧气含量可以有效提升酵母菌对于单增李斯特氏菌生长的促进作用。

2.3 静置培养会抑制酵母对单增李斯特氏菌的促进作用

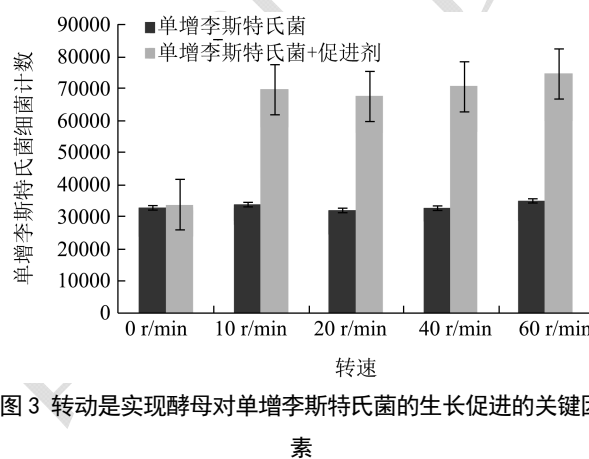


图3 转动是实现酵母对单增李斯特氏菌的生长促进的关键因素

Fig.3 Rotation is the key factor to promote the growth of *Listeria monocytogenes* by yeast

在细菌的发酵过程中, 转速的大小与细菌的生长状态密切相关。为了进一步探讨转动速度对于酵母促进单增李斯特氏菌生长过程的影响, 本研究检测了不同的培养转动速度下, 酵母菌对于单增李斯特氏菌生长的促进作用。将 LB1 培养基分装在 50 mL 无菌离心管中, 每管分装 20 mL。实验分成五组进行转速筛选实验, 每个组包含 2 个离心管, 分别为对照管和实验管。五组转速分别为: 0 r/min、10 r/min、20 r/min、40 r/min、60 r/min。对照管仅接种 50 μL 单增李斯特氏菌种子液, 实验管同时接种 50 μL 单增李斯特氏菌种子液和 200 μL 酵母菌种子液。将离心管置于试管旋转架上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h 后计数。结果如图 3 所示, 是否采用旋转的培养方式对于酵母菌是否可以促进单增李斯特氏菌的生长具有决定性的作用, 然而转动速度的大小对于酵母菌促进单增李斯特氏菌生长的影响不大。静置培养时, 酵母菌对单增李斯特氏菌的促进作用非常微弱, 不足 3% ($p>0.05$), 当转速为 10 r/min 时, 酵母菌开始表现出对单增李斯特氏菌较大的生长

促进作用,单增李斯特氏菌的生长速度提升接近100%左右;继续加大转速,这种促进作用未见明显改变,依然保持在100%左右。图3的研究结果表明,转动培养是实现酵母菌对单增李斯特氏菌生长促进作用的关键因素。由于离心管是密封不透气的,改变转速,并不能增加培养基中的氧气含量,因此推测转动培养可以有助于培养过程中培养基的均质,而这种均质作用对于实现酵母促进单增李斯特氏菌生长的至关重要。

2.4 酵母菌对于野生食源性单增李斯特氏菌生长的促进作用

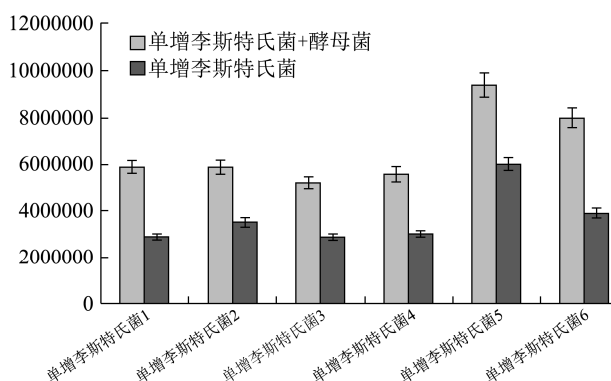


图4 酵母菌对单增李斯特氏菌的促进是广谱性的

Fig.4 The promotion of *Listeria monocytogenes* by yeast is broad-spectrum

前面的研究结果显示,酵母菌(ATCC9763)在适当的条件下可以有效促进单增李斯特氏菌(ATCC19115)的生长,为了进一步探讨这种促进作用的适用范围,本研究测试了酵母菌(ATCC9763)对于6株来源于不同食品基质的野生型单增李斯特氏菌的促进作用。分别将选定的6株野生型单增李斯特氏菌活化后,制备成种子液。对照组仅接种50 μL单增李斯特氏菌种子液,实验组同时接种50 μL单增李斯特氏菌种子液与200 μL酵母菌种子液。37 °C, 10 r/min, 培养20 h后计数。测试结果如图4所示,酵母菌对于6株野生型的单增李斯特氏菌的生长均具有显著的促进作用,生长促进率为61.7%~100% (p<0.05),其中对于1#和6#单增李斯特氏菌的生长促进作用最

强,促进率分别为93.3%和100%,对于5#单增李斯特氏菌的促进作用最弱生长促进率为61.7%。图4的测试结果表明,酵母菌对于单增李斯特氏菌的促进作用是广谱性的。酵母菌对于不同的单增李斯特氏菌株的促进作用不同很可能是由于没有优化好酵母菌和单增李斯特氏菌的接种比例所导致的。因此,要想将酵母菌研发成一种有效增菌促进剂,还需进一步详细优化单增李斯特氏菌检测的前增菌过程中酵母菌的接种量。

2.5 不同的食品基质中酵母菌对单增李斯特氏菌生长的促进作用

酵母菌对于单增李斯特氏菌的促进作用使得酵母菌很有可能被开发成为一种生长促进剂,来缩短食源性致病菌检测过程中单增李斯特氏菌的前增菌培养时间,最终实现致病菌的快速检测。为了进一步探讨将酵母菌开发成食源性致病菌单增李斯特氏菌前增菌促进剂的可行性,本研究测试了在存在食品基质的条件下,酵母菌对单增李斯特氏菌生长的促进作用。选择的食品基质包括:预包装酱牛肉、牛奶、面包、香肠。结果如表1所示,在测试的四种食品基质中,酵母菌对单增李斯特氏菌的生长均有不同程度的促进作用,其中在以酱牛肉为食品基质的检测样本中促进作用最强,生长促进率为65%,在以香肠为食品基质的样本中促进作用最弱,生长促进率仅为28%。与未添加食品基质时的测试结果相比,存在食品基质的条件下,酵母菌对于单增李斯特氏菌的生长促进作用明显减弱,促进率仅为28%~65%。这很有可能是因为食品基质的存在改变了培养基中营养成分的配比,从而抑制了酵母菌或单增李斯特氏菌的生长。在选取的四种食品基质中,香肠的淀粉含量较多,对增菌培养基的营养成分构成影响较大,因此,酵母菌对单增李斯特氏菌的促进作用在以香肠为基质的检测样品中表现最弱。本实验的结果表明,酵母菌极具被开发成食源性致病菌单增李斯特氏菌前增菌促进剂的潜质,但是还需采用其他技术手段,如固定化技术等,来增加酵母菌的生长稳定性。

表1 在不同食品基质中,酵母菌对于单增李斯特氏菌的促进作用

Table1 Promoting effect of yeast on *Listeria monocytogenes* in different food substrates

	酱牛肉	牛奶	面包	香肠
单增李斯特氏菌/(×10 ⁵ cfu/mL)	2.42	2.50	3.50	3.50
单增李斯特氏菌&酵母/(×10 ⁵ cfu/mL)	4.00	3.60	5.20	4.50

3 结论

酵母菌(ATCC9763)在合适的接种浓度下,36 °C, 10 r/min 旋转培养,可以显著促进食源性致病菌单增

李斯特氏菌的生长。这种促进作用不仅限于针对从 ATCC 购买的单增李斯特氏菌的标准菌株(ATCC19115), 对于其他从不同食品基质分离获得的野生型单增李斯特氏菌以及含有食品基质的阳性样本均有较强的生长促进作用。目前, 在开展食源性致病菌的检测工作时, 前增菌过程已经成为了开展快速致病菌检测的限速步骤, 酵母菌可以显著促进单增李斯特氏菌生长这一发现有利于开发出一种可以提升单增李斯特氏菌的前增菌速度的生长促进剂, 有效缩短前增菌过程的时间, 提升检测速度, 为实现单增李斯特氏菌的快速检测奠定基础。

参考文献

- [1] 蔡军,李慧,欧静堃,等.3 种食源性致病菌多重 PCR 检测体系的建立[J].食品科技,2015,40(3):324-329
CAI Jun, LI Hui, OU Jing-kun, et al. Establishment of multiplex PCR for the detection of three foodborne bacterial pathogens [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(3): 324-329
- [2] 章沙沙.实时荧光定量 PCR 检测食品中常见食源性致病菌[J].食品与发酵科技, 2016,52(04):87-89
ZHANG Sha-sha. Real-time fluorescent quantitative PCR for the detection of common food-borne pathogenic bacteria [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2016, 52(4): 87-89
- [3] 钱红玫,胡文忠,冯可,等.食源性致病菌快速检测的前增菌培养的研究进展[J].食品工业科技,2016,37(13):360-364
QIAN Hong-mei, HU Wen-zhong, FENG Ke, et al. Research progress in the pre-enrichment of rapid detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(13): 360-364
- [4] 李森,贾丽娜,王鑫,等.实时荧光环介导等温扩增技术检测熏肉中单增李斯特氏菌的研究[J].食品科技,2018,43(8): 319-324
LI Sen, JIA Li-na, WANG Xin, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* by real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(8): 319-324
- [5] 韩笑,张西萌,张琳,等.单核细胞增生李斯特氏菌 Rapid'L.mono 快速筛选方法的评价[J].食品安全质量检测学报,2018,9(4):733-740
HAN Xiao, ZHANG Xi-meng, ZHANG Lin, et al. Evaluation of rapid method for determination of *Listeria monocytogenes* by Rapid'L.mono rapid screening method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(4): 733-740
- [6] 亢春雨,于宏伟,郭润芳,等.食源性单核增生性李斯特氏菌毒力基因的分布[J].中国食品学报,2017,17(3):241-249
KANG Chun-yu, YU Hong-wei, GUO Run-fang et al. Distribution of virulence genes in foodborne *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(3): 241-249
- [7] Vassilios Ganatsios, Antonia Terpou, Angilelik-ioannaa Gialleli, et al. A ready-to-use freeze-dried juice and immobilized yeast mixture for low temperature sour cherry (*Prunus cerasus*) wine making [J]. Food and Bioproducts Processing, 2019, 9(117): 373-379
- [8] Takahiro Bamba, Takahiro Yukawa, Gregory Guirimand, et al. Production of 1,2,4-butanetriol from xylose by *Saccharomyces cerevisiae* through Fe metabolic engineering [J]. Metabolic Engineering, 2019, 12(56): 17-27
- [9] Rogney Sebastian Hart, Neil Paul Jolly, Bongani Kaiser Ndimba. Characterisation of hybrid yeasts for the production of varietal Sauvignon Blanc wine - A review [J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 8(22): 87-94