

# 牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌可形成活的非可培养状态

曹怡芳, 周爱莲, 白泓, 余以刚, 肖性龙\*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 该研究以保加利亚乳杆菌为牛奶发酵剂, 研究了牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌与保加利亚乳杆菌的相互作用以及阪崎克罗诺杆菌存活量的变化情况, 并结合 16S rDNA 高通量测序技术和 PMA-qPCR 方法分析阪崎克罗诺杆菌在牛奶发酵过程中是否形成“活的非可培养”状态。结果显示, 保加利亚乳杆菌在牛奶中发酵 48 h 后 pH 值可达到 3.40, 酸度值可达 212.00。在发酵前期接种阪崎克罗诺杆菌, 48 h 后 pH 值和酸度值分别为 3.50 和 193.30; 在发酵中期接种阪崎克罗诺杆菌, 48 h 后 pH 值和酸度值分别为 3.47 和 214.30。发酵前期阪崎克罗诺杆菌的污染对保加利亚乳杆菌发酵结果的影响更大。阪崎克罗诺杆菌在牛奶中生长 48 h 后菌浓度可稳定在 9.08 lg(CFU/mL); 不论在牛奶经发酵前期或中期接种阪崎克罗诺杆菌, 发酵后期平板计数法均检测不到阪崎克罗诺杆菌, 但 16s rDNA 和 PMA-qPCR 技术均可检测到阪崎克罗诺杆菌活菌的存在。该研究结果说明, 阪崎克罗诺杆菌在牛奶发酵后进入了“活的非可培养”状态, 该状态的存在会导致该菌检测时活菌数量的低估, 从而引发乳及乳制品的安全隐患。

**关键词:** 阪崎克罗诺杆菌; 活的非可培养状态; 保加利亚乳杆菌; 发酵

文章编号: 1673-9078(2022)03-56-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0714

## Formation of Viable but Non-culturable State of *Cronobacter sakazakii* during Milk Fermentation

CAO Yifang, ZHOU Ailian, BAI Hong, YU Yigang, XIAO Xinglong\*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, *Lactobacillus bulgaricus*, a commonly used milk starter, was selected for milk fermentation. The interactions between *C. sakazakii* and *Lactobacillus bulgaricus* and the survival of *C. sakazakii* were investigated during milk fermentation. Furthermore, 16s rDNA high-throughput sequencing technique and PMA-qPCR method were used to analyze whether *C. sakazakii* entered into the viable but non-culturable (VBNC) state during milk fermentation. The results showed that after 48 h-fermentation of *L. bulgaricus* in milk, the values of pH and acidity reached to 3.40 and 212.00, respectively. When *C. sakazakii* was inoculated in milk in the middle fermentation stage, the pH value and acidity value were 3.47 and 214.30 respectively. When *C. sakazakii* was inoculated in milk in the early fermentation stage, the values of pH and acidity were 3.50 and 193.30 respectively after 48 h fermentation; which had a greater adverse impact on the fermentation. The concentration of *C. sakazakii* stabilized at 9.08 lg(CFU/mL) after 48 hours of growth in milk, the growth of *C. sakazakii* could not be detected by plate counting in the later stage of fermentation whenever *C. sakazakii* was inoculated into the milk. However, the existence of viable *C. sakazakii* could be detected by 16s rDNA and PMA-qPCR technology, which indicated that *C. sakazakii* could be VBNC state during milk fermentation. The existence of VBNC state of *C. sakazakii* might lead to an underestimation of total viable pathogenic cells, thus causing

引文格式:

曹怡芳,周爱莲,白泓等.牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌可形成活的非可培养状态[J].现代食品科技,2022,38(3):56-62,+124

CAO Yifang, ZHOU Ailian, BAI Hong, et al. Formation of viable but non-culturable state of *Cronobacter sakazakii* during milk fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 56-62,+124

收稿日期: 2021-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172320); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602201); 广东省自然科学基金 (2021A1515011068); 广州市科技计划项目 (201904010077)

作者简介: 曹怡芳 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: yfcao1860@163.com

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: fexxl@scut.edu.cn

potential health hazards of milk and dairy products.

**Key words:** *Cronobacter sakazakii*; viable but non-culturable (VBNC); *Lactobacillus bulgaricus*; fermentation

阪崎克罗诺杆菌, 原名阪崎肠杆菌, 隶属于肠杆菌科克罗诺杆菌属, 是一种革兰氏阴性、无芽孢形成的兼性厌氧细菌<sup>[1,2]</sup>。感染阪崎克罗诺杆菌会导致新生儿脑膜炎、小肠结肠炎, 甚至会造成新生儿、老年人和免疫功能低下人群的死亡<sup>[3,4]</sup>。已经从牛奶、婴幼儿配方奶粉、奶酪以及奶牛场等环境中分离出阪崎克罗诺杆菌<sup>[5-7]</sup>。为了预防阪崎克罗诺杆菌引起的相关疾病, 需要更好地了解该菌在牛奶及奶制品生产加工或贮存过程中的生长状态, 以便采取合适的控制措施确保乳制品的安全问题。

已经有一些研究报道了阪崎克罗诺杆菌在乳制品生产加工或贮存过程中的生存情况。Kim 等<sup>[8]</sup>研究了含有乳酸菌、醋酸菌和酵母的开菲尔酸奶上清对婴幼儿配方奶粉中阪崎克罗诺杆菌的抑制情况。结果发现, 用含 30%开菲尔上清的水冲泡已被污染的奶粉, 在室温下孵育 1 h 后平板上未检测到阪崎克罗诺杆菌的生长。研究发现可能是发酵过程中的有机酸发挥了作用<sup>[9]</sup>。Chang 等<sup>[10]</sup>在四种不同品牌的酸奶中接种阪崎克罗诺杆菌和沙门氏菌, 并在冷藏条件下保存 5 d, 结果表明开菲尔酸奶可以在冷藏过程中完全抑制致病菌的生长。Hayes 等<sup>[11]</sup>将阪崎克罗诺杆菌 NCTC 8155 接种于复配婴幼儿配方奶粉中, 然后加入不同浓度的嗜酸乳杆菌 DPC 6026 发酵液, 实验结果显示较高浓度的发酵液可以在 1 h 内完全灭活阪崎克罗诺杆菌。Hsiao 等<sup>[5]</sup>将阪崎克罗诺杆菌与嗜热链球菌或保加利亚乳杆菌在脱脂牛奶中混合培养, 培养 24 h 后阪崎克罗诺杆菌活菌数量显著减少。研究还发现原味酸奶加工和贮存过程中 pH 值和贮存温度是影响阪崎克罗诺杆菌存活的主要因素<sup>[12]</sup>。以上研究报道中对阪崎克罗诺杆菌的检测结果都基于平板计数法, 但平板计数法可能会低估活菌数量。

活的非可培养状态 (viable but non-culturable, VBNC) 是微生物尤其是没有芽孢的细菌为了抵御不良环境时形成的一种休眠状态, 当外界胁迫消除后即可恢复生长繁殖能力<sup>[13,14]</sup>。VBNC 状态的细菌无法通过常规的平板培养进行检测。张竞丰等<sup>[15]</sup>总结了阪崎克罗诺杆菌进入 VBNC 状态的主要诱导因素: 巴氏杀菌、寡营养、低温或干燥, 但发酵产酸条件下该菌是否会进入 VBNC 状态尚不清楚。但 Solomon H. Mariam 等<sup>[16]</sup>的研究已经发现与乳酸菌进行共培养后, 李斯特菌或沙门氏菌会进入 VBNC 状态, Liu 等<sup>[17]</sup>和 Deng 等<sup>[18]</sup>也发现在啤酒发酵过程中植物乳杆菌会进入

VBNC 状态。

本研究选取了酸奶发酵中常用的菌株保加利亚乳杆菌, 研究牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌和保加利亚乳杆菌在牛奶中的相互作用, 并采用 16S rDNA 和 PMA-qPCR 技术鉴定阪崎克罗诺杆菌是否进入 VBNC 状态。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株

阪崎克罗诺杆菌 CICC 21544 和保加利亚乳杆菌 CICC 6045 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

#### 1.1.2 培养基与试剂

乳酸细菌培养基 (DeMan-Rogosa-Sharpe, MRS)、细菌基础培养基 (Lysogeny Broth, LB)、胰蛋白胍大豆琼脂 (TSA), 购于广州环凯微生物有限公司; 阪崎肠杆菌显色培养基 (Druggan-Forsythe-Iversen, DFI)、酚酞指示剂, 购于青岛海博生物技术有限公司; 叠氮溴化丙锭 (Propidium monoazide, PMA), 购于北京海德创业生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 购于北京天根生化科技有限公司; HiPure Soil DNA 试剂盒, 购于广州美基生物科技有限公司; 无菌脱脂牛奶, 购于当地卜蜂莲花超市。

### 1.2 仪器与设备

精密 pH 计, 上海雷磁仪器有限公司; 立式高压蒸汽灭菌器, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 超净工作台, 苏州尚田洁净技术有限公司; 台式高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海棱光技术有限公司; 卤钨灯 (650 W), 德国 Osram 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 美国伯乐公司; PCR 仪, 北京东胜兴业科学仪器有限公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, 北京六一仪器厂; 微量分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 小型高速离心机, 德国艾本德股份有限公司; -80 °C 低温冰箱, 山东青岛海尔股份有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌株活化

将保存于 -80 °C 低温冰箱的阪崎克罗诺杆菌和保加利亚乳杆菌的甘油保存管取出解冻, 用接种环蘸取

后分别在 TSA 和 MRS 琼脂平板上划线,置于 37 °C 恒温培养箱中孵育。分别挑取两种平板上的单菌落接种于 LB 和 MRS 培养基中,待其生长至稳定期后离心,用无菌生理盐水清洗菌体沉淀三次,并用生理盐水重悬浮得到菌悬液。

### 1.3.2 阪崎克罗诺杆菌与保加利亚乳杆菌在牛奶中的相互作用

按照 1.3.1 中的方法制备菌悬液,参照刘文文等<sup>[19]</sup>的方法,将 100 mL 牛奶 95 °C 热处理 15 min 杀菌,冷却后接种 10% 的保加利亚乳杆菌进行发酵。在发酵过程中接种阪崎克罗诺杆菌,使其终浓度为 10<sup>3</sup> CFU/mL。同时接种组样品,即在接种保加利亚乳杆菌的同时也接种阪崎克罗诺杆菌,发酵 48 h; 分开接种组样品,即在接种保加利亚乳杆菌 12 h 后再接种阪崎克罗诺杆菌,继续发酵 48 h。以牛奶中只接种保加利亚乳杆菌或阪崎克罗诺杆菌为对照组。样品在 37 °C 条件下进行发酵,每隔 8 h 取样测定发酵过程中牛奶 pH 值和酸度值的变化,酸度值的测定依照 GB 5009.239-2016《食品安全国家标准 乳和乳制品酸度的测定》<sup>[20]</sup>中的方法进行,同时取 100 μL 适当稀释后的发酵牛奶涂布于 DFI 用于阪崎克罗诺杆菌活菌计数。

### 1.3.3 16S rDNA 测序技术分析阪崎克罗诺杆菌和保加利亚乳杆菌在牛奶发酵过程中的分布变化情况

按照 1.3.2 中的方法制备测序样品,在牛奶中同时接种保加利亚乳杆菌和阪崎克罗诺杆菌,每 8 h 制一次样,共培养 48 h。每次取样时将培养物充分振荡混匀后取适量样品,立即用液氮速冻 5 min 后置于 -80 °C 低温冰箱保存备用。

利用细菌 16S rDNA 序列测序对样品中的细菌进行种属鉴定。从样品中提取基因组 DNA 后,用特异引物对细菌 16S rDNA 序列的 V3-V4 区进行 PCR 扩增,引物序列<sup>[21]</sup>为 341F(CCTACGGGNGGCWGCAG) 和 806R (GGACTACHVGGGTATCTAAT)。然后将 PCR 扩增产物切胶回收,用 QuantiFluor™ 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,构建测序文库,之后利用 Hiseq2500 PE250 上机测序。

测序得到原始数据之后,对低质量 reads 进行过滤,然后进行组装和再过滤。为了研究样品的物种组成多样性信息,利用软件 Uparse 对所有样品的有效 tags 序列进行运算分类单位 (Operational taxonomic unit, OTU) 聚类<sup>[22]</sup>,默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs。之后根据其丰度和序列信息,开展物

种注释、群落多样性等分析。

### 1.3.4 PMA-qPCR 法检测牛奶发酵过程中的阪崎克罗诺杆菌存活状态

为了进一步验证在牛奶中与保加利亚乳杆菌共培养后,阪崎克罗诺杆菌的实际存活状态,采用 PMA 与 qPCR 结合的方法进行检测。按照 1.3.2 的方法制备样品,以阪崎克罗诺杆菌在牛奶中单独培养作为对照,样品的 PMA 前处理参照 Zhou 等<sup>[23]</sup>优化后的方法,选取 *cgcA* 作为 PCR 扩增的目的基因,引物设计参照 Hu 等<sup>[24]</sup>的方法。PCR 操作步骤参考 Richard J. Kibbee 等<sup>[25]</sup>的方法,用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取处理后的样品 DNA,将提取的 DNA 模板与室温下溶解好的 2X Robust SYBR Green qPCR ProMix、引物和 ddH<sub>2</sub>O 按照 2:10:0.5:7 的比例配制 PCR 反应液,总体积为 20 μL。以不加 DNA 模板的反应液作为阴性对照 (等量的 ddH<sub>2</sub>O 代替)。配制 PCR 反应体系的全过程均在冰上进行。按照如下条件设定 Real-Time PCR 的反应程序: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 5 s 然后退火至 60 °C 保持 20 s (收集荧光信号),该过程进行 40 个循环。

### 1.3.5 牛奶发酵过程中阪崎克罗诺杆菌对保加利亚乳杆菌产酸能力的影响

原料奶被阪崎克罗诺杆菌污染后再进行酸奶发酵,发酵菌剂的性能可能会受到影响。本实验将从保加利亚乳杆菌的产酸能力变化探究阪崎克罗诺杆菌对保加利亚乳杆菌的主要影响。产酸能力的鉴定参照罗强等<sup>[26]</sup>的方法,向 100 mL 无菌脱脂牛奶中,分别按 5% 和 2% 的接种量接入保加利亚乳杆菌和阪崎克罗诺杆菌,置于 42 °C 的电热恒温培养箱中发酵,直至凝乳后转移至 4 °C 冰箱中存放 24 h。取出后按 5% 的接种量转接于 100 mL 新鲜的无菌脱脂牛奶中,同样 42 °C 下发酵至凝乳后转移至 4 °C 冰箱中储存。重复上述操作,每重复 1 次算为 1 代,重复 3 次。将 1、2、3 代混合培养物与原保加利亚乳杆菌作对比,分别按 5% 的接种量接种到 10 mL 新鲜的无菌脱脂牛奶中,37 °C 下静置培养。用 pH 计每 2 h 测一次样品的 pH 值。保加利亚乳杆菌的产酸能力以单位时间内 pH 值的变化为评价指标。

## 1.4 数据处理

使用 Microsoft Excel (2016) 软件绘图,使用 SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析,当  $p < 0.05$  时,表明具有显著性差异。

## 2 结果与讨论

## 2.1 阪崎克罗诺杆菌与保加利亚乳杆菌在牛

奶中的相互作用

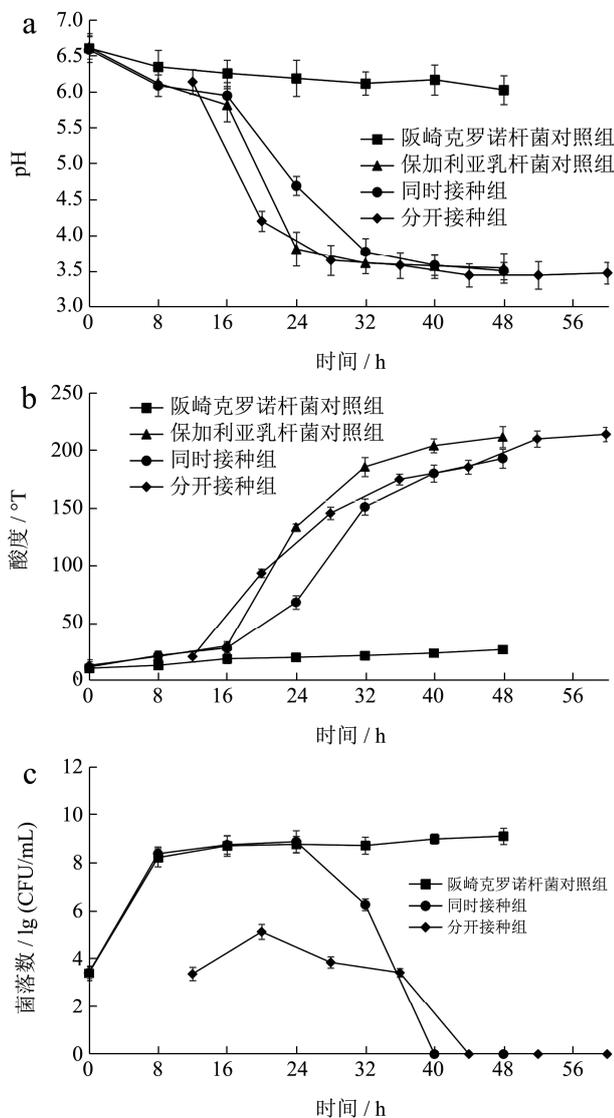


图1 阪崎克罗诺杆菌与保加利亚乳杆菌在牛奶中的相互作用

Fig.1 Interaction of *C. sakazakii* and *L. bulgaricus* in milk

注：a、b、c 分别为阪崎克罗诺杆菌和保加利亚乳杆菌在牛奶中相互作用时的 pH 值、酸度值和阪崎克罗诺杆菌存活量的变化情况图。

图1是阪崎克罗诺杆菌和保加利亚乳杆菌在牛奶中共同生长时的 pH 值、酸度值和阪崎克罗诺杆菌存活量的变化情况图。由图 1a 和 1b 可以看出，阪崎克罗诺杆菌在牛奶中单独生长时对牛奶的 pH 和酸度值无明显影响，pH 值维持在 6.02 以上，酸度值维持在 27.20 以下。而保加利亚乳杆菌在牛奶中单独生长时，24 h 后 pH 可达到 3.81，酸度值可达到 133.80，发酵 48 h 后 pH 值可达到 3.40，酸度值可达 212.00。分开接种组样品中保加利亚乳杆菌在 12~20 h 的产酸速度

明显快于同时接种组，pH 和酸度值分别由 6.13 和 21.10 变为 4.20 和 93.80。发酵 48 h 后，同时接种组样品 pH 值和酸度值分别为 3.50 和 193.30；分开接种组样品 pH 值和酸度值分别为 3.47 和 214.30；分开接种组样品的 pH 和酸度值更接近保加利亚杆菌对照组。

阪崎克罗诺杆菌在牛奶中单独生长 48 h 后菌浓度可稳定在 9.08 lg(CFU/mL)；与阪崎克罗诺杆菌对照组相比，同时接种组样品中阪崎克罗诺杆菌的数量在接种 24 h 后达到最大值[8.85 lg(CFU/mL)]，32 h 后明显降低[6.24 lg(CFU/mL)]，40 h 后便检测不到阪崎克罗诺杆菌活菌存在；而分开接种组在接种后 8 h 达到最大菌落数量[5.11 lg(CFU/mL)]，接种 24 h 后便检测不到阪崎克罗诺杆菌生长(图 1c)。结果说明，在牛奶发酵过程中，不论在早期还是中期被阪崎克罗诺杆菌污染，其生长均能完全被抑制；但在发酵中期感染阪崎克罗诺杆菌，该菌的增殖能被更好、更快地抑制。已经有研究报道了乳杆菌或其上清液的抑菌活性，Kim 等<sup>[9]</sup>的研究推测可能是发酵过程中产生的有机酸营造的酸性环境发挥了抑菌作用。Lin 等<sup>[27]</sup>发现蛋白酶会降低植物乳杆菌上清液的抑菌作用，推测上清液中含有肽类抑菌物质。本研究中同时接种组样品中，阪崎克罗诺杆菌数量在发酵 24 h 后迅速降低，可能与发酵液中有有机酸和肽类抑菌物质的积累有关。

## 2.2 16S rDNA 高通量测序技术分析阪崎克罗

诺杆菌和保加利亚乳杆菌在牛奶发酵过程中的分布变化情况

样品的测序数据量和过滤分析效果如图 2 所示。去除由于 PCR 错误、测序错误等会产生的低质量数据或者无生物学意义数据(嵌合体)后，剩下的 Clean tags 用于后续分析，所占比例均超过 93%，满足后续分析要求。

微生物物种分类一般分为界、门、纲、目、科、属、种 7 个等级，每个 OTU 代表某类型分类水平集合。Uparse 在构建 OTUs 的过程中选取代表性序列组成集合，然后用算法与 Green gene 数据库进行物种注释，将置信度的阈值设定为 0.80~1。根据 OTU 的物种注释信息，统计每个样品在各个分类水平上的 tags 序列数目，绘制柱状图如图 3 所示。

由图 3 可知，8 h 内阪崎克罗诺杆菌在牛奶中可以大量生长，占据优势菌群位置 (32.61%)；发酵 16 h 后，阪崎克罗诺杆菌生长受到限制 (13.62%)，保加利亚乳杆菌成为优势菌群 (29.39%)，随着保加利亚

乳杆菌发酵时间的延长, 发酵液中保加利亚乳杆菌比例越来越高, 阪崎克罗诺杆菌比例越来越低。但与 2.1 中 DFI 平板检测结果不同的是, 阪崎克罗诺杆菌在牛奶中与保加利亚乳杆菌共生 48 h 后仍能被检测到, 占比为 7.17%。因此, 此时的阪崎克罗诺杆菌可能处于 VBNC 状态, 虽然不能在平板上生长, 但利用分子层面的技术可以检测出来。16S rDNA 高通量测序技术可以克服传统培养技术的缺陷, 可以对不可培养的细菌进行序列检测, 有报道了使用传统培养法, 流式细胞术和 16S rDNA 高通量测序技术监测奶粉生产环境中不同清洁区域的致病菌污染情况, 结果发现中等程度清洁区域可检测到 VBNC 状态的细菌, 其中肠杆菌属占比 7.02%<sup>[28]</sup>。陈燕<sup>[29]</sup>的研究发现 16S rDNA 高通量测序技术对沙门氏菌显色培养基上的蓝绿色菌落, 即阪崎克罗诺杆菌的鉴定尤为重要, 可为乳品企业中阪崎克罗诺杆菌的防治、排查及溯源提供依据。

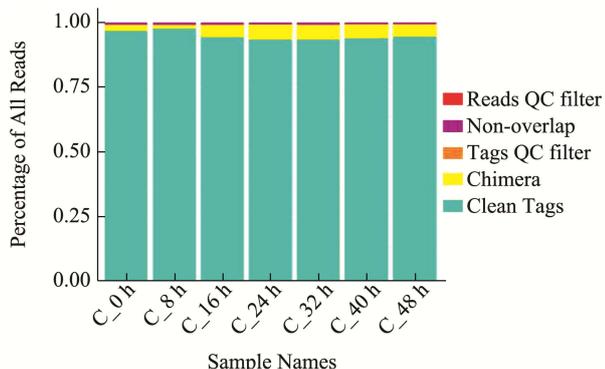


图2 数据预处理分布图

Fig.2 Data pre-processing distribution map

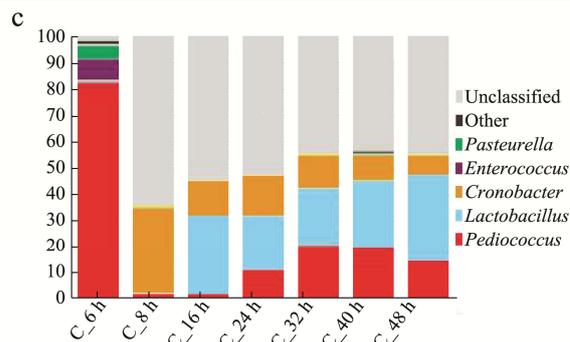
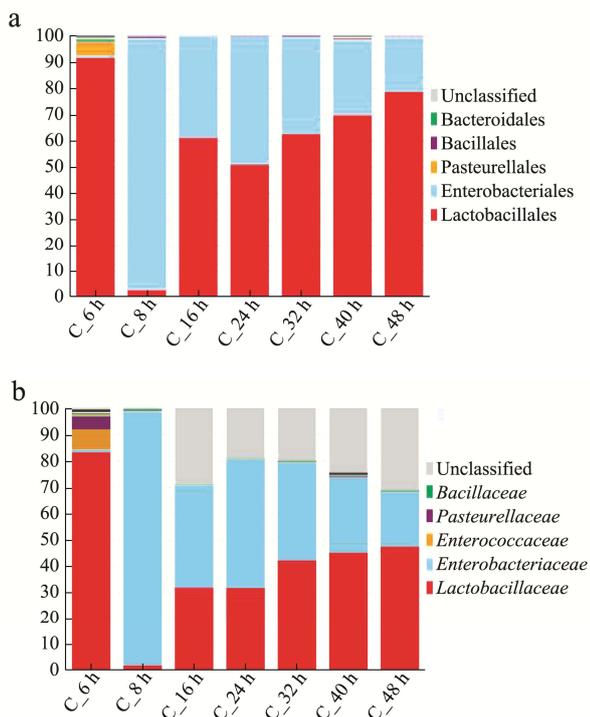


图3 各水平物种分布堆叠图

Fig.3 Species distribution stacked map

注: a: 目水平物种分布堆叠图; b: 科水平物种分布堆叠图; c: 属水平物种分布堆叠图。

### 2.3 PMA-qPCR 法检测阪崎克罗诺杆菌在牛奶发酵过程中的实际状态

表 1 PMA-qPCR 法检测牛奶发酵过程中的阪崎克罗诺杆菌

Table 1 Detection of *C. sakazakii* during milk fermentation by

| 发酵时间/h | PMA-qPCR          |                   |
|--------|-------------------|-------------------|
|        | 阪崎对照组 /lg(CFU/mL) | 同时接种组 /lg(CFU/mL) |
| 0      | 3.00±0.00         | 3.00±0.00         |
| 8      | 8.40±0.35         | 8.35±0.17         |
| 16     | 8.62±0.21         | 8.59±0.30         |
| 24     | 8.70±0.50         | 8.62±0.11         |
| 32     | 8.60±0.24         | 6.25±0.32         |
| 40     | 8.83±0.42         | 4.86±0.43         |
| 48     | 9.02±0.15         | 4.30±0.36         |

与保加利亚乳杆菌在牛奶中共培养后, PMA-qPCR 法检测阪崎克罗诺杆菌的结果如表 1 所示。从表中可以看出, 阪崎克罗诺杆菌在牛奶中单独培养时得到的结果与图 1c 中的结果一致, 在 16 h 后菌落数量逐渐趋于稳定[9.02 lg(CFU/mL)]; 而二者同时接种组, 共培养 40 h 后, 图 1c 中结果显示 DFI 平板上无阪崎克罗诺杆菌生长, 而 PMA-qPCR 仍检测到活的阪崎克罗诺杆菌的存在, 活菌数大约为 4.30 lg(CFU/mL)。与图 3 中 16S rDNA 得到的结果一致, 证实阪崎克罗诺杆菌确实进入了 VBNC 状态。刘艳艳等<sup>[30]</sup>的研究建立了 PMA-PCR 检测灭菌乳中阪崎肠杆菌的方法, 确定了 PMA-PCR 法检测活阪崎克罗诺杆菌的可行性。本研究证明牛奶发酵过程可诱导阪崎克罗诺杆菌进入 VBNC 状态, 除此之外, 寡营养、低温或干燥等外界胁迫条件也可以诱导阪崎克罗诺杆菌 VBNC 状态的形成<sup>[15]</sup>。另外, 有研究报道已经指出,

VBNC 状态下的阪崎克罗诺杆菌仍会表达相关毒力基因 (*hfp*, *ompA*)<sup>[31]</sup>, 可对食品安全造成潜在隐患。

## 2.4 阪崎克罗诺杆菌对保加利亚乳杆菌产酸能力的影响

原保加利亚乳杆菌与 1、2、3 代样品的产酸能力如表 2 所示。从表 2 中可以看出, 0 h 时各样品的起始酸度相同, 经过 2 h 发酵后, 第 3 代保加利亚乳杆菌发酵样品 pH 为 5.92, 产酸能力显著低于原乳杆菌 (5.65) ( $p<0.05$ ); 经过 4 h 和 6 h 发酵后, 第 2 代和

第 3 代乳杆菌产酸能力均显著低于原乳杆菌 ( $p<0.05$ ); 经过 8 h 发酵后, 第 3 代乳杆菌产酸能力 (4.93) 也显著低于原乳杆菌 (4.63) ( $p<0.05$ )。杨一冲等<sup>[32]</sup>对保加利亚乳杆菌的发酵特性进行研究, 发现在发酵的 2~6 h 酸度上升的较快, pH 值降低较快, 与表 2 和图 1a、1b 中的结果是一致的。本研究中, 经过相同的发酵时间, 阪崎克罗诺杆菌在样品中存在的时间越长, 保加利亚乳杆菌的产酸能力越弱。因此, 待发酵的牛奶被阪崎克罗诺杆菌污染后不仅会对酸奶的安全造成威胁, 也会对乳杆菌的产酸能力产生不良影响。

表 2 不同样品的产酸能力

Table 2 Acid production capacity of different samples

| 发酵时间  | 0 h       | 2 h                     | 4 h                     | 6 h                    | 8 h                     |
|-------|-----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 原乳杆菌  | 6.59±0.11 | 5.65±0.12 <sup>a</sup>  | 5.14±0.11 <sup>a</sup>  | 4.98±0.11 <sup>a</sup> | 4.63±0.11 <sup>a</sup>  |
| 1 代样品 | 6.59±0.11 | 5.70±0.10 <sup>a</sup>  | 5.28±0.13 <sup>ab</sup> | 5.09±0.11 <sup>a</sup> | 4.72±0.12 <sup>ab</sup> |
| 2 代样品 | 6.59±0.11 | 5.83±0.11 <sup>ab</sup> | 5.48±0.10 <sup>b</sup>  | 5.35±0.13 <sup>b</sup> | 4.84±0.12 <sup>ab</sup> |
| 3 代样品 | 6.59±0.11 | 5.92±0.12 <sup>b</sup>  | 5.71±0.11 <sup>c</sup>  | 5.58±0.12 <sup>c</sup> | 4.93±0.10 <sup>b</sup>  |

注: a、b、c 表示相同发酵时间后第 1、2、3 代样品产酸能力与原乳杆菌产酸能力的差异性。

## 3 结论

本文利用保加利亚乳杆菌在牛奶中发酵对阪崎克罗诺杆菌施加胁迫。平板计数结果显示, 不管在牛奶发酵过程中的前期或中期接种阪崎克罗诺杆菌, 其生长都会被抑制。本文还利用 16S rDNA 高通量测序技术分析了这两种菌在牛奶发酵过程中的分布变化情况。结果表明, 经过牛奶发酵后, 虽然平板检测法检测不到阪崎克罗诺杆菌, 但 16S rDNA 可以检测出该菌活菌的存在, 故推测经发酵后阪崎克罗诺杆菌可能处于 VBNC 状态。结合 PMA-qPCR 法进一步证实了与保加利亚乳杆菌在牛奶中共培养后, 阪崎克罗诺杆菌确实进入 VBNC 状态。本文结果还显示, 阪崎克罗诺杆菌的存在会削弱保加利亚乳杆菌的产酸能力。酸奶是老少皆宜的乳制品, 酸奶生产中使用的有益菌是致病菌的理想抑制剂, 特别是乳酸菌对于致病菌的抑制效果已有很多研究报道, 但在乳酸菌对致病菌达到良好抑制效果的同时, 应始终考虑致病菌是否处于具有复苏能力的 VBNC 状态。所以, 后续需要更详细的研究来阐明不同环境条件下致病菌与乳酸菌相互作用时的生长情况, VBNC 状态的进入与复苏情况, VBNC 状态下致病菌的潜在毒力以及食品加工过程中阪崎克罗诺杆菌 VBNC 状态细胞的防控措施。

## 参考文献

[1] Zhang S, Xiong J, Lou W, et al. Inhibition of *Cronobacter*

- sakazakii* in reconstituted infant formula using triglycerol monolaurate and its effect on the sensory properties of infant formula [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 320(2). DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108518
- [2] Henry M, Fouladkhah A. Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(3): 7030077
- [3] Du X J, Wang X Y, Dong X, et al. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains [J]. *Front Microbiol*, 2018, 27(9): 2867
- [4] Yong W, Guo B F, Shi X C, et al. An investigation of an acute gastroenteritis outbreak: *Cronobacter sakazakii*, a potential cause of food-borne illness [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2549
- [5] Hsiao W L, Chang C H, Chou C C. Heat shock effects on the viability of *Cronobacter sakazakii* during the dehydration, fermentation, and storage of lactic cultured milk products [J]. *Food Microbiol*, 2010, 27(2): 280-285
- [6] Yu S, Yan L N, Wu X, et al. Multiplex PCR coupled with propidium monoazide for the detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* spp. in milk and milk products [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(10): 7874-7882
- [7] Li Z, Ge W P, Li K T, et al. Prevalence and characterization of *Cronobacter sakazakii* in retail milk-based infant and babyfoods in Shaanxi, China [J]. *Foodborne Pathog Dis*,

- 2016, 13(4): 221-227
- [8] Kim D H, Chon J W, Kang I B, et al. Growth inhibition of *Cronobacter sakazakii* in experimentally contaminated powdered infant formula by kefir supernatant [J]. J Food Protect, 2015, 78(9): 1651-1655
- [9] Kim D H, Jeong D, Song K Y, et al. Culture supernatant produced by *Lactobacillus kefir* from kefir inhibits the growth of *Cronobacter sakazakii* [J]. J Dairy Res, 2018, 85(1): 98-103
- [10] Chang H S, Kim D H, Jeong D, et al. Fates of *Salmonella enteritidis* and *Cronobacter sakazakii* in various multiple-strain yogurts and kefir during cold storage [J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(2): e12429
- [11] Hayes M, Barrett E, Ross R P, et al. Evaluation of an antimicrobial ingredient prepared from a *Lactobacillus acidophilus* casein fermentate against *Enterobacter sakazakii* [J]. J Food Protect, 2009, 72(2): 340-346
- [12] Shaker R R, Osaili T M, Ayyash M. Effect of thermophilic lactic acid bacteria on the fate of *Enterobacter sakazakii* during processing and storage of plain yogurt [J]. Journal of Food Safety, 2008, 28(2): 170-182
- [13] Pinto D, Santos M A, Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms [J]. Crit Rev Microbiol, 2015, 41(1): 61-76
- [14] Schottroff F, Frohling A, Zunabovic-pichler M, et al. Sublethal injury and viable but non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes [J]. Front Microbiol, 2018, 1(9): 2773
- [15] 张竟丰,王丽,陈洵,等.乳及乳制品中常见“活的非可培养态”食源致病菌研究进展[J].食品科学,2019,40(3):300-306  
ZHANG Jingfeng, WANG Li, CHEN Xun, et al. A review of viable but nonculturable pathogens in milk and dairy products [J]. Food Science, 2019, 40(3): 300-306
- [16] Mariam S H, Zegeye N, Aseffa A, et al. Diffusible substances from lactic acid bacterial cultures exert strong inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in a co-culture model [J]. Bmc Microbiol, 2017, 17(1): 35
- [17] Liu J Y, Li L, Li B, et al. Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum* [J]. Microb Pathogenesis, 2017, 110: 257-261
- [18] 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
- [19] 刘文文,张靖晞,李键,等.不同菌株对酸奶品质与感官特性的影响[J].中国酿造,2019,38(5):95-100  
LIU Wenwen, ZHANG Jingxi, LI Jian, et al. Effect of different strains on quality and sensory characteristic of yoghurt [J]. China Brewing, 2019, 38(5): 95-100
- [20] GB 5009.239-2016,食品安全国家标准 食品酸度的测定[S]
- [21] Guo M J, Wu F H, Hao G G, et al. *Bacillus subtilis* improves immunity and disease resistance in rabbits [J]. Front Immunol, 2017, 8: 354
- [22] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OUT sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [23] Zhou B, Chen B, Wu X, et al. A new application of a sodium deoxycholate-propidium monoazide- quantitative PCR assay for rapid and sensitive detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula [J]. J Dairy Sci, 2016, 99(12): 9550-9559
- [24] Hu S, Yu Y, Li R, et al. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* by real-time PCR based on the *cgcA* gene and TaqMan probe with internal amplification control [J]. Can J Microbiol, 2016, 62(3): 191-200
- [25] Kibbee R J, Ormeci B. Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent [J]. J Microbiol Meth, 2017, 132: 139-147
- [26] 罗强,李幸洋,陈炼红,等.传统发酵泡菜中乳酸菌种群组成及优良菌株产酸耐酸特性分析[J].食品科学,2021,42(2): 158-163  
LUO Qiang, LI Xingyang, CHEN Lianhong, et al. Composition of lactic acid bacteria in traditional Chinese pickles and analysis of acid production and acid tolerance characteristics of excellent strains [J]. Food Science, 2021, 42(2): 158-163
- [27] Lin T H, Pan T M. Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102 [J]. Journal of Microbiology, Immunology, and Infection, 2017, 52(3): 409-417
- [28] Anvarian A H P, Cao Y, Srikumar S, et al. Flow cytometric and 16S sequencing methodologies for monitoring the physiological status of the microbiome in powdered infant formula production [J]. Front Microbiol, 2016, 7(103): 968

