

研究报告

沙门氏菌选择性化学限定培养基的研制

周正¹,林汉发¹,冯军燕¹,王世飞¹,胡颖¹,周亮¹,崔生辉²

(1. 遵义医科大学公共卫生学院,贵州 遵义 563000; 2. 中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 拟用氨基酸、维生素、无机盐替代牛肉膏和蛋白胨,开发质量可控的化学限定沙门氏菌选择性培养基。方法 分别研究 20 种氨基酸、11 种维生素或 4 种无机盐对大肠杆菌 ATCC 25922 生长特性的影响,并确定生长最适浓度,替换亚硫酸铋(BS)琼脂或 Hektoen Enteric(HE)琼脂中的牛肉膏和蛋白胨,研制出化学限定 BS 琼脂或 HE 琼脂培养基。结果 在 36 ℃ 下培养 48 h,基础培养基中添加天冬酰胺、天冬氨酸、缬氨酸、盐酸硫胺或核黄素有利于大肠杆菌 ATCC 25922 生长,OD₅₉₅ 值均高于 0.1,而添加丝氨酸、赖氨酸盐酸盐、异亮氨酸、尼克酸、生物素或磷酸氢二钠对细菌增殖没有促进作用,OD₅₉₅ 值几乎为 0。将 35 种营养物质按照最佳浓度替代牛肉膏、蛋白胨制成化学限定 BS 琼脂或 HE 琼脂,经过质控菌株验证,化学限定 BS 琼脂或 HE 琼脂在菌体生长指数、菌落形态和特殊显色反应等方面均与商业培养基相似。结论 化学限定 BS 琼脂和 HE 琼脂均符合国标 GB 4789.28—2013 对参考培养基的质控要求。

关键词:化学限定培养基;沙门氏菌;氨基酸;维生素;无机盐

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)06-0703-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.06.011

Development of selective chemically defined medium for *Salmonella*ZHOU Zheng¹, LIN Hanfa¹, FENG Junyan¹, WANG Shifei¹, HU Ying¹,
ZHOU Liang¹, CUI Shenghui²

(1. College of Public Health, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective Amino acids, vitamins and inorganic salts were used to replace beef extract and peptone to develop a selective medium with controllable quality for *Salmonella*. **Methods** Effects of 20 kinds of amino acids, 11 kinds of vitamins or 4 kinds of inorganic salts on the growth characteristics of *Escherichia coli* ATCC 25922 were studied, and the optimal concentration was determined. The beef extract and peptone in bismuth sulfite (BS) agar or Hektoen Enteric (HE) agar were replaced, and the chemically defined BS agar or HE agar was developed. **Results** Adding asparagine, aspartic acid, valine, thiamine hydrochloride or riboflavin to the basic medium was the most favorable for the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922, and the OD₅₉₅ were all higher than 0.1. However, adding serine, lysine hydrochloride, isoleucine, nicotinic acid, biotin or disodium hydrogen phosphate to the basic medium did not promote the proliferation of *Escherichia coli*, and the OD₅₉₅ was almost 0. The chemically defined BS agar or HE agar was prepared by replacing beef extract, peptone with 35 kinds of nutrients according to the optimal concentration. After verification of quality control strains, chemically defined BS agar or HE agar was similar to commercial medium in cell growth index, colony morphology and special color reaction. **Conclusion** Chemically defined BS agar or HE agar meet the quality requirements of national standard.

Key words: Chemically defined medium; *Salmonella*; amino acid; vitamin; inorganic salt

部分培养基中的蛋白胨或牛肉膏质量参差不

齐^[1],严重影响着微生物检测结果的准确性和实验重复性。化学限定培养基是以磷酸缓冲盐为基础,利用氨基酸、维生素和无机盐等物质替代天然成分^[2],形成所有组成成分确定的广泛用于微生物和细胞生长与代谢研究^[3-4]的一类培养基,它不仅为微生物生长提供必要的物质,并且化学成分明确,能有效提升微生物检验结果的准确性和重复性^[5]。

沙门氏菌是一种人畜共患致病菌,每年由沙门

收稿日期:2021-05-16

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1601400)

作者简介:周正 男 副教授 研究方向为食源性致病菌检验及溯源 E-mail:37691912@qq.com

通信作者:周亮 男 讲师 研究方向为食品微生物防治与利用 E-mail:zhouliang@yeah.net

氏菌导致的食物中毒事件占细菌性食物中毒事件的42.6%~60%^[6]。根据国标GB 4789.4—2016^[7]的规定,沙门氏菌选择性分离培养基是亚硫酸铋(Bismuth sulfite, BS)琼脂和HE琼脂,其分离原理主要是以蛋白胨、牛肉膏和葡萄糖作为基础物质保证微生物正常生长,再利用煌绿、胆盐等物质抑制革兰氏阳性菌生长,沙门氏菌与特殊物质反应产生特异性菌落,从而达到分离的目的。

在本研究中,由于质控菌株大肠杆菌ATCC 25922受到BS琼脂中煌绿和亚硫酸钠的抑制作用而无法生长,培养基表面无特异性反应,因此首先以大肠杆菌ATCC 25922为研究对象,开展合成营养素(氨基酸、维生素和无机盐)促细菌生长的优化实验,确保细菌在无牛肉膏和蛋白胨的合成营养素的培养基上仍能正常生长,并确定营养物质的最适生长浓度。再将上述物质替换BS琼脂或HE琼脂的蛋白胨和牛肉膏,接种质控菌株以验证化学限定BS琼脂或HE琼脂的有效性,为食品微生物化学限定参考培养基提供基础数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

质控菌株大肠杆菌ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌ATCC 14028和伤寒沙门氏菌CMCC 50071购于中国医学细菌菌种保藏管理中心。

1.2 主要仪器与试剂

YXQ-LS-50G压力蒸汽灭菌器(上海云泰仪器仪表有限公司)、BSC-1304IIA2生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司)、Multiskan GO全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

胰酪大豆胨琼脂培养基(Tryptic Soy Agar, TSA)(广东环凯生物科技有限公司)、M9低盐培养基(广东环凯生物科技有限公司)、市售BS琼脂和HE琼脂(广东环凯生物科技有限公司和杭州滨和微生物试剂有限公司)、氨基酸和维生素(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司);未特别指明的氨基酸均为L型氨基酸。

1.3 方法

1.3.1 细菌菌株和悬浮液制备

分别取1支质控菌株的冻存管倒入灭菌的营养肉汤中,36℃培养1d后接种在营养琼脂平板上再培养1d得到二代菌株,棉签刮取平板上培养物至无菌生理盐水中,调整菌悬液浓度,使其最终浓度介于 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL,4℃贮藏,1个月内用完。对照菌悬液为100 μL菌悬液和100 μL M9低盐培养基的混合液。

1.3.2 合成营养素优化实验

1.3.2.1 合成营养素的制备

以M9低盐培养基作为基础培养物质,此时各物质浓度设为1×。根据美国BD公司公布的牛肉膏和蛋白胨组成成分表,并结合1640细胞培养基的组分浓度,确定了35种营养物质的初始浓度(表1),此浓度设为1×,其他浓度倍数在此浓度基础上进行扩大或缩小。取等体积的单一营养物和基础培养物质混匀,即为合成营养素,经滤膜(0.2 μm)过滤除菌,现用现配。

表1 合成营养素每种物质的最佳生长浓度

Table 1 Optimum growth concentration of each substance in synthetic nutrients

营养物质	初始浓度 (mg/L)	生长最佳时 浓度倍数	最佳浓度 (mg/L)
甘氨酸(Gly)	10	1×	10
精氨酸(Arg)	200	1×	200
天冬酰胺(Asn)	50	1×	50
天冬氨酸(Asp)	20	1×	20
半胱氨酸(Cys)	65	2×	130
谷氨酸(Glu)	20	2×	40
谷氨酰胺(Gln)	300	4×	1 200
组氨酸(His)	15	0.5×	7.5
羟脯氨酸(Hyp)	20	0.25×	5
异亮氨酸(Ile)	50	0.5×	25
亮氨酸(Leu)	50	0.25×	12.5
赖氨酸盐酸盐(Lys)	40	0.5×	20
蛋氨酸(Met)	15	0.5×	7.5
苯丙氨酸(Phe)	15	0.5×	7.5
脯氨酸(Pro)	20	0.5×	10
丝氨酸(Ser)	30	0.5×	15
苏氨酸(Thr)	20	0.5×	10
色氨酸(Trp)	5	0.5×	2.5
脱水酪氨酸二钠盐(Tyr)	23.2	0.5×	11.6
缬氨酸(Val)	20	1×	20
生物素(V _{B7})	0.2	0.5×	0.1
氯化胆碱(CC)	3	0.5×	1.5
D-泛酸钙(V _{B3})	1	0.5×	0.5
烟酸(V _{B5})	35	0.5×	17.5
叶酸(V _{B11})	1	0.25×	0.25
i-肌醇(II)	1	0.5×	0.5
烟酰胺(NA)	1	0.5×	0.5
对氨基苯酸(PABA)	0.2	0.5×	0.1
盐酸吡哆醇(V _{B6})	1	1×	1
核黄素(V _{B2})	0.005	1×	0.005
盐酸硫胺(V _{B1})	100	0.5×	50
钴胺素(V _{B12})	48.84	2×	97.68
Ca(NO ₃) ₂ (CN)	400	0.5×	200
MgSO ₄ (MS)	800	0.5×	400
KCl(PC)	0.2	0.5×	0.1
Na ₂ HPO ₄ (DSP)	0.2	0.5×	0.1

1.3.2.2 单因素实验

单因素实验实行初筛和复筛。初筛实验设定单一营养物浓度梯度分别为:0.5×、1×、2×,基础培养物质浓度为1×。

初筛实验后,将呈正相关的营养物质在原来基础上提高两个浓度梯度 $4\times$ 、 $8\times$,将呈负相关的营养物质降低两个浓度梯度 $0.125\times$ 、 $0.25\times$,再进行复筛实验,确定每种营养物质最适生长浓度,应用于化学限定BS琼脂和HE琼脂。

1.3.2.3 细菌浓度测定

取 $100\ \mu\text{L}$ 菌悬液(1.3.1中贮藏备用悬浮液)和 $100\ \mu\text{L}$ 合成营养素加入96孔酶标板中,混匀,在 $36\ ^\circ\text{C}$ 下加盖培养48 h,测定其 OD_{595} 值。对照菌悬液为 $100\ \mu\text{L}$ 菌悬液和 $100\ \mu\text{L}$ M9低盐培养基的混合液。

1.3.3 化学限定培养基与商业培养基的比较

1.3.3.1 化学限定BS琼脂和HE琼脂的制备

先按照最适浓度的10倍单独配制氨基酸混合液、维生素混合液和无机盐混合液。取氨基酸混合液、维生素混合液、无机盐混合液各 $100\ \text{mL}$ 与其他物质混合,最终培养基体积为 $1\ 000\ \text{mL}$ 。

1.3.3.2 生长指数(G值)测定

参照国标GB 4789.28—2013^[8]。目标菌和非目标菌半定量方法分别采用16分法和6分法。使用 $1\ \mu\text{L}$ 接种环分别取大肠杆菌ATCC 25922、鼠伤寒沙门菌ATCC 14028和伤寒沙门氏菌CMCC 50071菌悬液1环,在待测的培养基表面划十六条或六条直线。 $36\ ^\circ\text{C}$ 下培养24 h后按以下方法计算细菌的生长指数G。每条有比较稠密菌落生长的划线则G为1。如果仅一半的线有稠密菌落生长,则G为0.5。如果划线上没有菌落生长、生长量少于划线的一半或菌落生长微弱,则G为0。记录每个平板的得分总和即为G。以TSA为三种质控菌株的参考培养基。

1.4 数据分析

单因素方差分析采用SPSS 17.0软件中的邓肯多重比较法,使用Sigmaplot 12.5绘图。

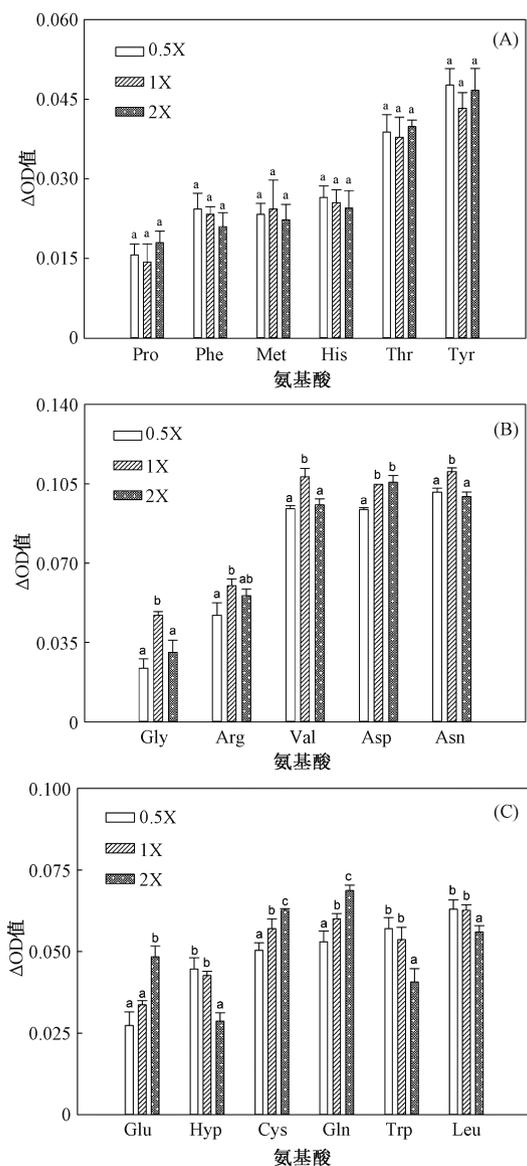
2 结果

2.1 合成营养素的优化

2.1.1 初筛

本实验以M9低盐培养基为对照,分别探讨了添加单一氨基酸、维生素或无机盐对大肠杆菌ATCC 25922生长特性的影响。在0 h时,对照菌悬液和合成营养素菌悬液的 OD_{595} 值均为 $0.04\sim 0.05$ (结果未显示),在48 h时,对照菌悬液的 OD_{595} 值仍为 $0.04\sim 0.05$,而不同合成营养素的菌悬液 OD_{595} 值发生明显变化,图1和2中 ΔOD 值为合成营养素菌悬液OD值与对照菌悬液OD值的差值。除了丝氨酸(Ser)、赖氨酸盐酸盐(Lys)和异亮氨酸(Ile)

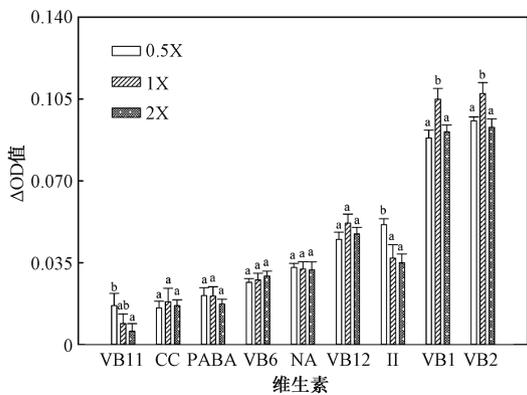
外,其他氨基酸都能促进大肠杆菌生长;但是每种氨基酸的作用效果不同,其中天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)和缬氨酸(Val)的作用最为明显(图1B),48 h时菌液 ΔOD_{595} 值均高于0.1。随着氨基酸浓度的逐渐增大,添加甘氨酸(Gly)、精氨酸(Arg)、缬氨酸、天冬氨酸或天冬酰胺的培养基菌浓度先增大后减小。添加谷氨酸(Glu)、半胱氨酸(Cys)或谷氨酰胺(Gln)的培养基,菌浓度和营养物质浓度呈正相关,但羟脯氨酸(Hyp)、色氨酸(Trp)或亮氨酸(Leu)却呈负相关。



注:同种氨基酸的不同字母代表存在显著性差异($P < 0.05$); Pro-脯氨酸, Phe-苯丙氨酸, Met-蛋氨酸, His-组氨酸, Thr-苏氨酸, Tyr-酪氨酸, Gly-甘氨酸, Arg-精氨酸, Val-缬氨酸, Asn-天冬酰胺, Asp-天冬氨酸, Gln-谷氨酰胺, Hyp-羟脯氨酸, Cys-半胱氨酸, Glu-谷氨酸, Trp-色氨酸, Leu-亮氨酸

图1 不同浓度氨基酸对大肠杆菌ATCC 25922生长的影响(48 h)

Figure 1 Effects of different concentrations of amino acids on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 h)



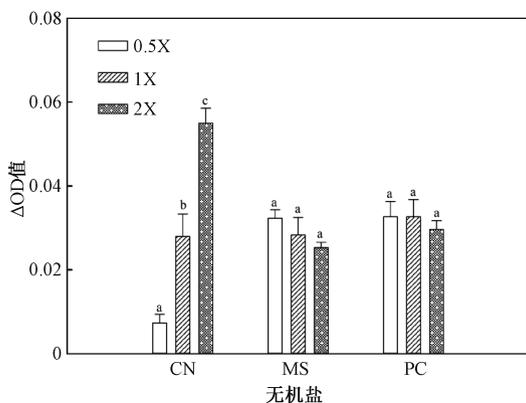
注:同种维生素的不同字母代表存在显著性差异($P < 0.05$); V_{B11} -叶酸,CC-氯化胆碱,PABA-对氨基苯酸, V_{B6} -盐酸吡哆醇,NA-烟酰胺, V_{B12} -钴胺素,II-i-肌醇, V_{B1} -盐酸硫酸胺, V_{B2} -核黄素

图2 不同浓度维生素对大肠杆菌 ATCC 25922 生长的影响(48 h)

Figure 2 Effect of different concentrations of vitamins on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 h)

除了尼克酸(V_{B5})和生物素(V_{B7})外,其他维生素都能促进大肠杆菌生长,其中盐酸硫酸胺(V_{B1})和核黄素(V_{B2})的作用效果最强(图2),48 h时菌液 ΔOD_{595} 值均大于0.1。随着盐酸硫酸胺或核黄素浓度的逐渐增大,菌浓度先增加后减少。随着叶酸(V_{B11})或肌醇(II)浓度的逐渐增大,菌浓度逐渐下降。

硝酸钙(CN)、硫酸镁(MS)和氯化钾(PC)都能促进大肠杆菌生长(图3)。随着硝酸钙浓度的逐渐增大,菌浓度逐渐增大。



注:同种无机盐的不同字母代表存在显著性差异($P < 0.05$);CN- $Ca(NO_3)_2$,MS- $MgSO_4$,PC-KCl

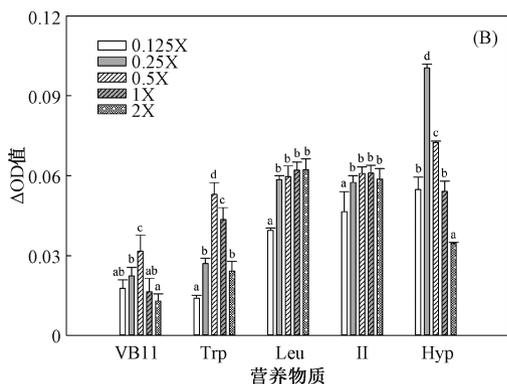
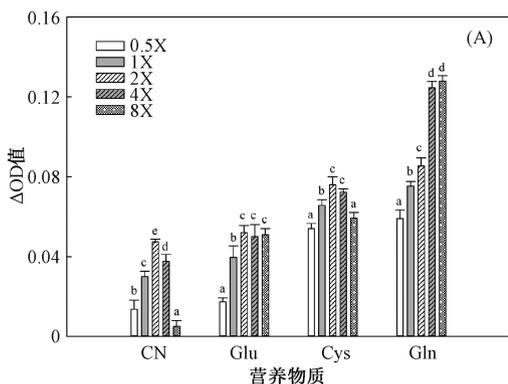
图3 不同浓度无机盐对大肠杆菌 ATCC 25922 生长的影响(48 h)

Figure 3 Effect of different concentrations of inorganic salts on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 h)

综合以上单因素初筛的实验结果,谷氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、硝酸钙、亮氨酸、色氨酸、羟脯氨酸、叶酸或肌醇需开展复筛实验。

2.1.2 复筛

为探寻初筛实验中9种营养物质的最适生长浓度,开展了复筛实验,结果如图4所示,当亮氨酸、羟脯氨酸和肌醇浓度在0.25 \times 时,色氨酸和叶酸浓度在0.5 \times 时,谷氨酸、胱氨酸和硝酸钙浓度在2 \times 时,谷氨酰胺浓度在4 \times 时,菌液 OD_{595} 值分别达到最大值。因此,经过两次单因素优化实验,确定了35种营养物质的最适浓度,其结果如表1所示。



注:同种物质的不同字母代表存在显著性差异($P < 0.05$);CN- $Ca(NO_3)_2$,Glu-谷氨酸,Cys-半胱氨酸,Gln-谷氨酰胺, V_{B11} -叶酸,Trp-色氨酸,Leu-亮氨酸,II-i-肌醇,Hyp-羟脯氨酸

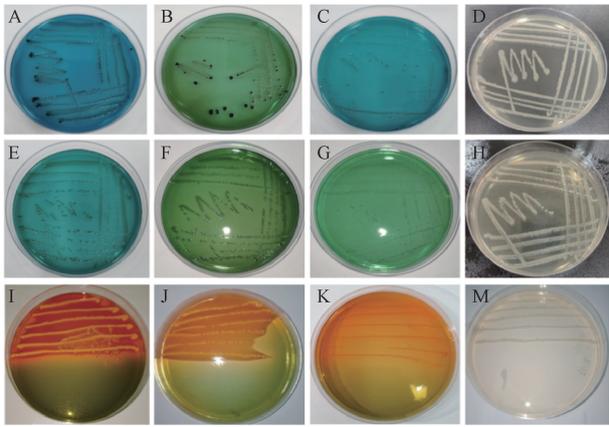
图4 不同浓度营养物质对大肠杆菌 ATCC 25922 生长的影响(48 h)

Figure 4 Effects of different concentrations of nutrients on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 h)

2.2 化学限定 HE 和市售 HE 琼脂的比较

经过24 h培养,3种质控菌株在TSA培养基上长势良好,G值均为16或6,说明菌种生长正常。菌株ATCC 14028在化学限定HE琼脂上的G值为 7.33 ± 0.57 (表2),菌落呈绿蓝色,有明显

黑心,表现出典型的沙门氏菌特征(图5A-D)。与市售HE琼脂相比,菌株CMCC 50071在化学限定HE琼脂生长状况稍弱,但是G显著高于6。菌株ATCC 25922在化学限定HE琼脂上的G值为5.33,菌落呈橙红色,有胆酸盐沉淀,与市售HE琼



注:A-D 分别是 ATCC 14028、E-H 分别是 CMCC 50071、I-M 分别是 ATCC 25922 生长在杭州滨和、广东环凯、化学限定和广东环凯 TSA

图 5 化学限定 HE 和市售 HE 琼脂上的菌株生长情况

Figure 5 Growth of strains on chemically defined HE and commercial HE agar

表 2 市售 HE 和化学限定 HE 琼脂的菌株 G 值

Table 2 Growth index of strains in chemically defined HE and commercial HE agar

培养基	ATCC 14028	CMCC 50071	ATCC 25922
杭州滨和 HE 琼脂	15.33±0.57 ^a	12.83±0.28 ^a	6.00±0.00 ^a
广东环凯 HE 琼脂	8.50±0.50 ^b	13.66±0.57 ^a	5.50±0.50 ^{ab}
化学限定 HE 琼脂	7.33±0.57 ^c	9.66±0.57 ^b	5.33±0.29 ^b

注:同样菌株的不同字母代表存在显著性差异($P<0.05$)

脂无明显差异(图 5E-H),均表现出典型的大肠杆菌特征。

2.3 化学限定 BS 琼脂和市售 BS 琼脂的比较

经过 24 h 培养,3 种质控菌株在 TSA 培养基上长势良好,G 值均为 16 或 6,说明菌种生长正常。菌株 ATCC 14028 在化学限定 BS 琼脂上的 G 值为 15.33±0.57(表 3),菌落呈黑色,有金属光泽(图 6A-D),表现出典型的沙门氏菌特征。菌株 CMCC 50071 在化学限定 BS 琼脂上的 G 值为 12.66±0.57,生长情况良好。菌株 ATCC 25922 在化学限定 BS 琼脂上不生长,符合大肠杆菌在 BS 琼脂上的典型特征。

表 3 化学限定 BS 和市售 BS 琼脂的菌株 G 值

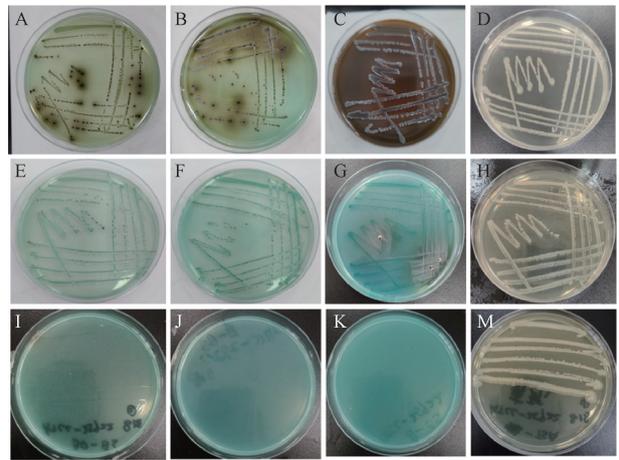
Table 3 Growth index of strains in chemically defined BS and commercial BS agar

培养基	ATCC 14028	CMCC 50071	ATCC 25922
杭州滨和 BS 琼脂	11.16±0.28 ^b	13.33±0.57 ^a	—
广东环凯 BS 琼脂	8.66±0.57 ^c	11.66±0.57 ^b	—
化学限定 BS 琼脂	15.33±0.57 ^a	12.66±0.57 ^{ab}	—

注:“—”表示 无菌落生长;同样菌株的不同字母代表存在显著性差异($P<0.05$)

3 讨论

培养基的组成成分及其浓度影响细胞生长、发酵特性和生物膜形成^[9-10],其中的碳源和氮源对细



注:A-D 分别是 ATCC 14028、E-H 分别是 CMCC 50071、I-M 分别是 ATCC 25922 生长在杭州滨和、广东环凯、化学限定和广东环凯 TSA

图 6 化学限定 BS 和市售 BS 琼脂上的菌株生长情况

Figure 6 Growth of strains on chemically defined BS and commercial BS agar

菌生长尤为重要,SELVARASU 等^[11]发现大肠杆菌 DH5 α 在指数生长期(发酵 8 h 以内)存在严格的丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸消耗顺序,而在指数生长末期和稳定期时,其他氨基酸才被消耗,但不能耗尽。在酸水解酪蛋白或蛋白胨肉汤培养基也出现了类似的氨基酸消耗顺序^[12-13]。而在本实验中,丝氨酸却对大肠杆菌的生长没有促进作用,分析可能的原因:(1)使用的化学限定培养基与天然培养基完全不同;(2)菌种间存在代谢差异。

氨基酸能通过分解代谢形成丙酮酸、草酰乙酸、 α -酮戊二酸等物质进入三羧酸循环形成能量或其他氨基酸^[14],不同氨基酸的转化途径不同,如苏氨酸和甘氨酸可形成丝氨酸,后者转化成丙酮酸;天冬氨酸或天冬酰胺可以转化为草酰乙酸;脯氨酸、精氨酸和组氨酸可转化成谷氨酸,后者可转化成 α -酮戊二酸。可能某些氨基酸如天冬氨酸可直接进入三羧酸循环,更加有利于菌群生长,导致 48 h 时在含有天冬氨酸培养液的菌浓度明显地高于其他氨基酸。YANG 等^[15]发现细菌生长过程对大多数氨基酸表现出偏好响应,但是对异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸和缬氨酸却表现出明显的排斥响应,这些物质在高浓度下能够影响其他氨基酸的合成从而抑制细菌的生长。本实验中发现异亮氨酸不能促进大肠杆菌 ATCC 25922 生长,而缬氨酸能显著地促进大肠杆菌 ATCC 25922 生长,说明不同菌株在氨基酸偏好上存在着差异。

盐酸硫酸胺或核黄素能最大限度地促进大肠杆菌的生长,这可能与能参与微生物糖代谢密切相关,因为盐酸硫酸胺是葡萄糖代谢中关键酶的辅助因子,而核黄素参与糖、蛋白质和脂肪酸代谢^[16]。

在同一菌株下,培养基成分对其生长有显著的影响;而在同一化学限定培养基下,不同属受试菌株甚至同属不同种受试菌株的生长情况也存在差异。COCAIGN-BOUSQUET等^[17]研究发现尽管大多数乳酸乳杆菌的营养需求非常相似,但是乳源乳酸乳杆菌比植物源乳酸乳杆菌营养要求更高。CHEN等^[18]比较了5种凝结芽孢杆菌在最低化学限定培养基上的生长情况,发现凝结芽孢杆菌 HL5、102B 和 ATCC7050 生长良好,但凝结芽孢杆菌 36D1 和 P4-102B 几乎不生长,说明最低化学限定培养基中缺少后两种菌株生长所必需的营养物质。为了确保质构菌株大肠杆菌 ATCC 25922 在化学限定 BS 琼脂上无法生长的原因是煌绿和亚硫酸钠的抑制作用而非缺乏营养物质,本研究首先针对 ATCC 25922 开展了氨基酸、维生素和无机盐的促生长优化实验,由此得出的最佳营养物质浓度不一定是促进沙门氏菌 ATCC 14028 和 CMCC 50071 生长的最适浓度,从后续的化学限定 HE 和 BS 琼脂实验结果也印证了这一点。虽然两种沙门氏菌在化学限定 HE 和 BS 琼脂上的生长指数均达到了国标 GB 4789.28—2013 的要求,但是 ATCC 14028 在化学限定 HE 琼脂上的生长指数仅为 7.33,其生长能力还有很高的提升空间,后续实验可以进一步优化化学限定培养基组分及其浓度。

除了丝氨酸、赖氨酸盐、异亮氨酸、尼克酸和生物素外,其他 29 种营养物质均都能促进大肠杆菌 ATCC 25922 生长,但是每种物质作用效果不同,其中天冬氨酸、天冬酰胺、缬氨酸、盐酸硫胺和核黄素的作用最好。通过对 20 种氨基酸、11 种维生素和 4 种无机盐的单因素优化,并取代牛肉膏和蛋白胨,制作化学限定 HE 琼脂和 BS 琼脂培养基,经过大肠杆菌 ATCC 25922、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 和伤寒沙门氏菌 CMCC 50071 的实验验证,证明化学限定 HE 琼脂和 BS 琼脂培养基均符合国标 GB 4789.28—2013 的质量要求,能为我国食品致病微生物纯化学参考培养基的开发提供一定的参考数据。

参考文献

[1] ORAK T, CAGLAR O, ORTUCU S, et al. Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 271: 56-62.

[2] SAVIZI I S P, SOUDI T, SHOOJAOSADATI S A. Systems biology approach in the formulation of chemically defined media for recombinant protein overproduction [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(20): 8315-8326.

[3] NAHIDIAN B, GHANATI F, SHAHBAZI M, et al. Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1 [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 255: 229-237.

[4] BRÜHLMANN D, JORDAN M, HEMBERGER J, et al. Tailoring recombinant protein quality by rational media design [J]. *Biotechnology Progress*, 2015, 31(3): 615-629.

[5] 张国勇, 曲萍, 邓自新, 等. 纯化学合成缓冲蛋白胨水培养基的研制 [J]. *食品工程*, 2020(2): 44-50, 65.

[6] 何国庆, 贾英民, 丁立孝. 食品微生物学 2 版 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 320-321.

[7] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[8] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求: GB 4789.28—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[9] SON K, MENOLASCINA F, STOCKER R. Speed-dependent chemotactic precision in marine bacteria [J]. *PNAS*, 2016, 113(31): 8624-8629.

[10] BAEZ A, KUMAR A, SHARMA A K, et al. Effect of amino acids on transcription and translation of key genes in *E. coli* K and B grown at a steady state in minimal medium [J]. *New Biotechnology*, 2019, 49: 120-128.

[11] SELVARASU S, OW D S W, LEE S Y, et al. Characterizing *Escherichia coli* DH5alpha growth and metabolism in a complex medium using genome-scale flux analysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(3): 923-934.

[12] MASER A, PEEBO K, NAHKU R. Avoiding amino acid depletion in a complex medium results in improved *Escherichia coli* BW25113 growth [J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2019, 165(1): 37-46.

[13] CHANG D E, SHIN S, RHEE J S, et al. Acetate metabolism in a pta mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme a flux for growth and survival [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(21): 6656-6663.

[14] HALSEY C R, LEI S, WAX J K, et al. Amino acid catabolism in *Staphylococcus aureus* and the function of carbon catabolite repression [J]. *mBio*, 2017, 8(1): e01434-16.

[15] YANG Y L, POLLARD A M, HÖFLER C, et al. Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria [J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(6): 1272-1282.

[16] 娄秀平, 沈健增, 蔡宇杰, 等. 维生素对大肠杆菌 *Escherichia coli*. JN8 产 L-色氨酸的影响 [J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(9): 921-926.

[17] COCAIGN-BOUSQUET M, GARRIGUES C, NOVAK L, et al. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1995, 79(1): 108-116.

[18] CHEN Y, DONG F, WANG Y. Systematic development and optimization of chemically defined medium supporting high cell density growth of *Bacillus coagulans* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(18): 8121-8134.