

选择性增菌液对单核增生性李斯特氏菌 检出效果的比较

胡杨峰 韩 军 贾英民*

(河北农业大学食品科技学院 保定 071001)

摘 要: 为了了解食品中单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的污染状况, 比较不同选择性增菌方法对单核增生李斯特氏菌的检出效果, 并进一步比较不同增菌方法在不同类食品中检出单核增生李斯特氏菌的差异性, 进而确定特定食品最合适的增菌方法, 随机采集本市生鲜肉、水产品、果蔬及冷冻食品 4 类 135 份食品。采用国标 LB 二次增菌法、EB 法、最新改良 FDA 法及 Fraser 肉汤增菌法进行增菌, 采用 PALCAM 选择性平板进行分离, 先用行标多重 PCR 法进行初步验证后再进行国标生化鉴定。4 种方法共检出单核增生李斯特氏菌 23 株, 其中 LB 二次增菌法检出 5 株、Fraser 肉汤增菌法检出 6 株、EB 法检出 5 株、最新改良 FDA 法检出 7 株。结论是 4 种方法总的检出率没有较大的差异性, 但对于不同类食品的检出率有所不同。

关键词: 食品, 单核增生李斯特氏菌, 选择性增菌液

Compare of Selectivity Enrichment Broth for Detectable Effect of *Listeria monocytogenes*

HU Yang-Feng HAN Jun JIA Ying-Min*

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: This paper investigated contamination situation of *Listeria monocytogenes*(*Lm*). To compare different selectivity enrichment broth for detectable effect of *Lm* and compare detectable effect in different samples by using different methods, furthermore, choose the best enrichment broth for specific food. One hundred and thirty five random samples from raw meat, aquatic product, fruit and vegetable, quick-frozen food in Baoding. Applied LB enrichment broth, EB enrichment broth, new modification FDA enrichment broth and Fraser enrichment broth before separated by PALCAM selective agar, then identified by international standard method after PCR. Results: Four methods showed that there were 23 *Lm* positive, detected 5 *Lm* by LB method, 6 *Lm* by Fraser method, 5 *Lm* by EB method and 7 *Lm* by new modification FDA method. The total detectable rate of four methods had no large specificity, but to specific kind of food was different.

Keywords: Food, *Listeria monocytogenes*, Selectivity enrichment broth

单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)是人畜共患病李斯特菌病的病原菌,它引起的李斯特菌病临床表现为脑膜炎、败血症和孕妇流产等,死亡率达 30%左右^[1,2],在新生幼儿和免疫力低下的人群中更高达 70%^[3]。20 世纪 90 年代WTO将其列为食源性四大致病菌之一,是食品微生物的常检项目之一^[4]。

该菌广泛存在于动植物性食品中,生鲜肉、水产品、果蔬和速冻食品经常带有该菌^[5],并且该菌在食品中繁殖温度范围较大(1℃~45℃),在冷藏温度下仍能生长繁殖,危险性极大,美国FDA和USDA规定了许多食品中单核增生李斯特氏菌不允许检出。食品中污染的单核增生李斯特氏菌数量一般较少,而且可能受到一些非致死性损伤以及食品成分的干扰抑制作用,因此,经典的*Lm*分离培养和鉴定技术不能采用直接涂平板的方法进行分离;快速的检测方法,在鉴定之前,对待测样品进行增菌也是必要的^[6]。选择性增菌的效果会直接影响到后续的检出结果,所以针对特定的食品有必要选择一种较好的增菌方法。

本试验在相同的分离、检验条件下,首先应用中华人民共和国出入境检验检疫行业标准PCR方法进行初步鉴定,再进行国标生化鉴定确定阳性菌株。研究比较了 4 种选择性增菌液对单核增生李斯特氏菌在不同类食品中的检出效果,为不同类食品选择恰当的增菌液提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品来源

从 2007 年 10 月份到 2008 年 1 月份共采集样品 135 份,主要采自保定市各大超市和农贸市场,如表 1 所示。

表 1 样品来源与数量 Table 1 Sample sources and quantity	
样品 Samples	数量(份)
生鲜肉 Raw meat	36
水产品 Aquatic product	34
果蔬 Vegetable	35
速冻食品 Quick-frozen food	30
总计 Total	135

1.2 标准菌株

单核细胞增生性李斯特氏菌菌株 10403s 由浙江大学方维焕教授惠赠;蜡样芽胞杆菌标准菌株 63301 购于中国兽医药品监察所;英诺克李斯特氏菌菌株 10028 由本实验室筛选。

1.3 培养基

LB 增菌肉汤、EB 增菌肉汤、FDA 最新改良增菌液、MR-VP 肉汤、硝酸盐肉汤和血琼脂均为本实验室自制;Feaser 增菌液及添加剂、PALCAM 选择培养基、胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)和胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)均购于山东青岛海博科技有限公司;三糖铁琼脂(TSI)、半固体动力培养基、尿素琼脂、放线菌酮、甘露醇、鼠李糖、木糖和七叶苷微量鉴定管均购于北京陆桥技术有限责任公司;巯基乙酸钠和丙酮酸钠购于北京化学试剂有限公司;丙酮酸钠配制成 10%溶液过滤除菌备用、吡啶黄和蔡啶酮酸配制成 1%溶液过滤除菌备用。不同增菌液组分见表 2。

1.4 主要仪器设备

高速冷冻离心机,FA1004 电子天平,电子恒温水浴锅,seientz-04 均质机, TGradient Thermocycler 96 型 PCR 仪, DYCp-32 型电泳槽, DYY-8B 型稳压稳流电泳仪, BTS-20M 型凝胶成像系统。

1.5 分离方法

1.5.1 增菌: 1) LB二次增菌法(国标): 用无菌均质器将样品均质, 分别取 25 g (mL)加入 225 mL LB₁增菌液, 充分混匀, 置 30℃培养 24 h后取出 1 mL加入 10 mL LB₂增菌液中, 30℃继续培养 24 h。2) Feaser 肉汤培养法: 一次增菌同国标, 一次增菌后取 1 mL 菌液转入 10 mL Feaser肉汤中, 30℃培养 24 h, 增菌液变黑者划线PALCAM平板, 不变黑者再观察 24 h, 如仍不变色则做阴性处理。3) EB增菌: 用无菌均质器将样品均质, 分别取 25 g (mL)加入 225 mL EB增菌液, 充分混匀, 置 30℃培养 48 h。4) FDA最新改良方法: 用无菌均质器将样品均质, 分别取 25 g (mL)加入 225 mL增菌液中添加了丙酮酸钠后置于 30℃预增菌 4 h, 再加入选择性试剂 30℃培养至 48 h。

1.5.2 选择性分离: 用无菌棉签沾取LB₂增菌液涂布于 PALCAM 平皿 1/2, 余下 1/2 用接种环涂开, 37℃培养 48 h, 挑取灰绿色的, 菌落周围有棕黑色环的可疑菌落划线到李斯特菌显色培养基上, 在

表 2 各增菌液组分
Table 2 Components of enrichment broth

增菌液 Enrichment broth	LB ₁	LB ₂	Fraser	EB	Modification FDA
胰蛋白胨(g) Tryptone	5	5	10	17	17
多价胨(g) Polypeptone	5	5		3	3
酵母浸出物(g) Yeast extract	5	5	5	6	6
葡萄糖(g) Glucose				2.5	2.5
七叶苷(g) Esculin sesquihydrate	1	1	1		
食盐(g) Salt	5	5	20	5	5
磷酸氢二钠(g) Di-sodium hydrogen phosphate	12	12	9.6		
磷酸二氢钾(g) Potassium phosphate monobasic	1.35	1.35	1.35		
牛肉浸出物(g) Beef extract			5		
磷酸氢二钾(g) Potassium phosphate dibasic				2.5	2.5
丙酮酸钠(g) Sodium pyruvate					2.5
巯基乙酸钠(g) Sodium thioglycolate					0.1
萘啶酮酸(g) Nalidixic acid	0.02	0.02	0.02	0.04	0.04
盐酸吡啶黄(g) Acriflavine hydrochloride	0.012	0.025	0.024	0.015	0.010
氯化锂(g) Lithium chloride			3		
柠檬酸铁铵(g) Ammonium ferric citrate			0.5		
放线菌酮(g) Actidione					0.051
蒸馏水(L) ddH ₂ O	1	1	1	1	1

37℃ 培养箱中培养 18 h~24 h。

1.5.3 分离纯化：挑取李斯特显色培养基上周围有不透明环的菌落到 TSA-YE 斜面进行纯化，将纯培养物做革兰氏染色，无芽孢的革兰氏阳性杆菌或类球形菌接种到斜面培养基中，4℃ 冰箱暂时保存。

1.6 鉴定方法

为快速排除大量阴性菌株准确鉴定阳性菌株，本试验首先采用中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 PCR 方法进行初步鉴定，再进行国标生化鉴定确定阳性菌株。

1.6.1 PCR方法初步鉴定^[7]：1) 细菌DNA的提取：挑取可疑单增李斯特菌菌落接种于 6 mL TSB-YE 肉汤，37℃ 过夜培养，离心培养液收集细菌（4000 r/min, 10 min），用 1 mL 灭菌水洗 1 次后离心（8000 r/min, 5 min），加入等体积的灭菌水和TZ缓冲液重悬，使细菌浓度约为 10⁴ CFU/mL~10⁸ CFU/mL（肉眼可见明显浑浊），沸水浴处理 8 min，冰水中冷浴 10 min，8000 r/min离心 5 min，收集上清液即可用于PCR扩增。2) PCR扩增条件：95℃ 3 min；95℃ 45 s，62℃ 30 s，72℃ 45 s，30 个循环；72℃ 3 min。引物由上海生工生物科技有限公司合成，见表 3。3) 行标 PCR 鉴定：对本实验室暂时保存的疑似菌株进行 PCR 初步鉴定，若样品 PCR 扩增产物电泳出现 715 bp P60 蛋白的编码基因(P60 gene, *iap*)和 450 bp 溶血素基因(listeriolysin, *hly*)的任一扩增条带或两者均出现，同时阳性对照扩增

表 3 引物序列与目的扩增产物大小
Table 3 Primer sequence and expected size of the PCR product

扩增片段 Fragment	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	PCR 产物大小 Product size
<i>iap</i> 基因片段 Fragment of <i>iap</i> gene	CAAACTGCTAACACAGCT TTATACGCGACCGAAGCCAA	715 bp
<i>hly</i> 基因片段 Fragment of <i>hly</i> gene	GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	450 bp

产物电泳后出现目的条带(715 bp 和 450 bp 同时出现), 阴性对照和空白对照扩增产物后没有出现目的片段, 判定为可疑阳性, 进一步做国标生理生化鉴定。PCR 扩增产物电泳无目的扩增条带, 且阳性对照扩增产物电泳后出现目的片段, 阴性对照和空白对照扩增产物电泳后没有出现目的片段, 判定结果阴性。

1.6.2 国标生理生化鉴定: 依据 GB4789.30-94《食品卫生微生物学检验》规定的方法对 PCR 初步鉴定的可疑阳性菌株进行鉴定, 保留符合国标生理生化

鉴定结果的阳性菌株。

2 结果与分析

通过对 135 份样品进行分离鉴定后, 共得到 23 株单核细胞增生性李斯特氏菌。行业标准初步鉴定的 24 株可疑阳性菌株, 符合国标生理生化鉴定的为 23 株, 可见, 两种方法的鉴定结果差异不大。(PCR 初步鉴定菌株结果见图 1), 4 种不同选择性增菌方法对不同样品单核增生李斯特氏菌的检出率结果见表 4。

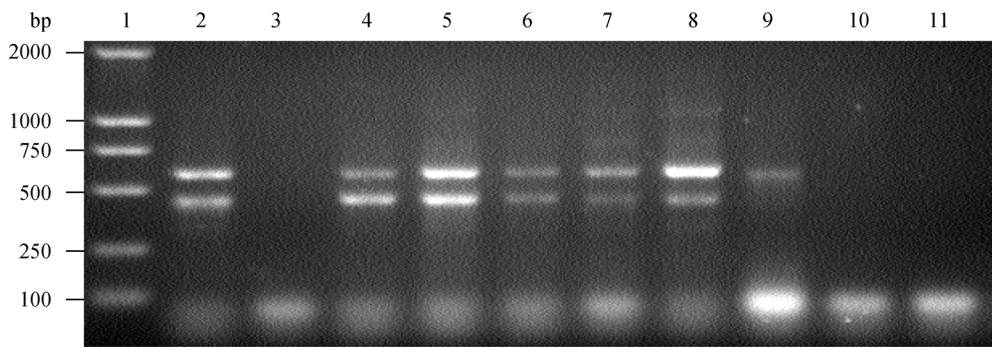


图 1 单增李斯特菌的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 The identigicting results of *L. monocytogenes* by PCR

Note: 1: DL2000 DNA marker; 2: Strain 10403s; 3: Blank control (H₂O); 4-9: *L. monocytogenes* isolated; 10: Negative control (*L. innocua*); 11: Negative control (*Bacillus cereus*)

表 4 不同样品用不同增菌方法的单核增生李斯特氏菌检出率比较					
Table 4 The comparison of detectable rate in different samples by using different methods					
样品 Samples	数量总计 Total	LB 二次增菌 Standard LB enrichment broth	Fraser 肉汤 Fraser enrichment broth	EB EB enrichment broth	改良 FDA Modification FDA enrichment broth
生鲜肉 Raw meat	10/36	2(5.56%)	2(5.56%)	3(8.33%)	3(8.33%)
水产品 Aquatic product	4/34	1(2.94%)	1(2.94%)	2(5.89%)	0(0%)
果蔬 Vegetable	4/35	1(2.86%)	2(5.71%)	0(0%)	1(2.86%)
速冻食品 Quick-frozen food	5/30	1(3.33%)	1(3.33%)	0(0%)	3(10%)
总计 Total	23/135	5(3.70%)	6(4.44%)	5(3.70%)	7(5.19%)

由表 4 结果分析可知: 国标 LB 二次增菌法、Fraser 肉汤法、EB 法、改良 FDA 法对 4 大类样品中单核细胞增生性李斯特氏菌的总的检出率分别为 3.70%、4.44%、3.70%、5.19%, 它们的检出率比较接近没有大的差异性。但样品不同、增菌方法不同, 单核细胞增生性李斯特氏菌的阳性检出率有所不同, 国标 LB 二次增菌法、Fraser 肉汤法、EB 法、改良 FDA 法对冷鲜肉的检出率分别为 5.56%、5.56%、

8.33%、8.33%, 各种方法都有检出, 其中 EB 法和改良 FDA 法效果较好; 这 4 种增菌方法对水产品的检出率分别为 2.94%、2.94%、5.89%、0%, EB 法效果最好, 改良 FDA 法没有检出, 效果不佳; 对果蔬的检出率分别为 2.86%、5.71%、0%、2.86%, Fraser 肉汤法效果最好, EB 法没有检出, 效果不理想; 对速冻食品的检出率分别为 3.33%、3.33%、0%、10%, 改良 FDA 法效果最好, EB 法没有检出。

3 讨论

1) 目前, 国内有些报道比较了不同增菌液的检出效果, 结果有所不同。陈道利等报道LB法优于EB法^[8], 但封幼玲等用EB法和LB法增菌检验单增李斯特氏菌检出率相同。程洁等报道改良FDA法是食品中单增李斯特氏菌的最佳增菌和分离方法^[9]。本试验结果显示要获得最理想的结果不能简单的比较不同增菌方法对多类食品的检出率, 而应针对特定的食品去比较不同的增菌方法。张晓峰等也报道了不同样品要选用不同选择性增菌方法, 必要时可将 2 种以上方法结合, 以提高李斯特氏菌的检出率^[10]。

2) 本研究结果显示 4 种方法总的检出率没有大的差异性, 但对于不同类食品的检出率有所不同。这就说明针对不同类食品有必要选择不同的选择性增菌液来达到最好的检出效果, 由结果发现国标 LB 二次增菌法和 Fraser 肉汤法都为二次增菌法, 它们对不同类食品都有检出, 增菌范围比较广, 说明二次增菌法相对于一次增菌法确实有一定的优点。

3) 由表 2 可知国标 LB 二次增菌法和 Fraser 肉汤法增菌液组分差别不大且使用的直接碳源为七叶苷, 这与它们对各类食品检出率相近是相吻合的。李斯特氏菌属能利用七叶苷为碳源, 在这两种增菌液中都以七叶苷为唯一碳源, 这样可以抑制许多不能利用七叶苷为碳源的杂菌生长, 有所不同的是 Fraser 肉汤法添加了氯化锂和柠檬酸铁铵, 李斯特氏菌利用七叶苷时产生的 6、7-二羟香豆素可与柠檬酸铁铵中的铁离子生成时溶液变黑的物质, 因此通过增菌液的颜色变化就可鉴定李斯特氏菌存在与否。即 Fraser 肉汤法更便于观察, 且可以减少工作量^[6]。

4) EB 法对冷鲜肉和水产品的检出效果较好, 但对果蔬和速冻食品没有检出, 说明有一定的局限性。EB 法为一次增菌, 操作简便, 增菌液组分简单、经济。对于肉类、水产品等基础营养丰富的食品, 所携带的菌活力可能相对高点, 可以采用此种方法, 但对于果蔬等基础营养不丰富的食品 and 受过加工的速冻食品等, 对菌造成的非致死性伤害比较严重,

不建议采用此种方法。

5) 改良 FDA 法也为一次增菌, 操作简便, 前增菌液中加入巯基乙酸钠和丙酮酸钠, 丙酮酸钠来抑制活性氧类, 巯基乙酸钠降低培养基内的氧化还原电位, 使细胞修复在活性氧类浓度低的情况下。因此, 对于受过加工的速冻食品检出效果最好。建议对加工食品、速冻食品等对单核细胞增生性李斯特氏菌造成非致死性损伤较大的采用最新改良 FDA 法, 检出效果会更好。

参考文献

- [1] Birte FV, Hans HH, Bente O, *et al.* Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(6): 2586–2595.
- [2] Laemynck GV, Lafarge V, scotter S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA adiaagnostic chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**: 430–441.
- [3] Klinger G, Beyene I, Shah P, *et al.* Do hyperoxaemia and hypocapnia add to the risk of brain injury after intrapartum asphyxia. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, 2005, **90**(1): 49–52.
- [4] 张淑红, 吴清平, 张菊梅. 显色培养基在单核细胞增生李斯特氏菌快速检测中的应用研究. *中国卫生检验杂志*, 2007, **17**(1): 43–45.
- [5] 何 浩, 吴永生, 于 霞. 产单核细胞增生性李斯特氏菌研究现状. *肉品卫生*, 2003, **7**: 9–16.
- [6] 卢红梅, 张义明. 选择性增菌液对单核细胞增生李斯特氏菌的影响. *食品科学*, 2003, **24**(10): 131–135.
- [7] 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. SN/T 0184.2–2006.
- [8] 陈道利, 陶 勇, 霍开兰. 直接入口食品中单核细胞增生李斯特氏菌的污染调查及其检验方法的比较. *中国卫生检验杂志*, 2003, **13** (4): 492–493.
- [9] 程 洁, 张晓峰. 单增李斯特氏菌选择性增菌培养和分离方法的比较研究. *检验检疫科学*, 2003, **13**(6): 36–38.
- [10] 张晓峰, 方维焕, 程 洁, 等. 李斯特氏菌选择性增菌培养分离比较研究. *中国公共卫生*, 2004, **20**(6): 718–719.