

# 单增李斯特菌国标检验培养基质量的比较

余文, 安琳, 崔生辉\*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要:** 通过考察市售单增李斯特菌国标检验培养基对单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM, 以下简称单增李斯特菌) 和非单增李斯特菌的增菌检测效果, 比较不同品牌培养基的质量。该研究采用螺旋涂布计数法, 定量测定 30 株单增李斯特菌和 9 株非单增李斯特菌在 4 个品牌的李氏增菌肉汤 (LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>) 和 6 个品牌的 PALCAM 琼脂培养基、李斯特氏菌显色培养基中的生长情况。实验结果表明: 30 株单增李斯特菌在 4 个品牌的 LB<sub>1</sub> 增菌肉汤中的浓度均值为  $2.04 \times 10^8$  CFU/mL~ $4.59 \times 10^8$  CFU/mL; 在 LB<sub>2</sub> 增菌肉汤中的浓度为  $2.36 \times 10^7$  CFU/mL~ $2.69 \times 10^7$  CFU/mL; 在 D 品牌的 PALCAM 琼脂培养基中的生长率均值为 0.55, 在其余 5 个品牌的 PALCAM 琼脂培养基和 6 个品牌的李斯特氏菌显色培养基中的生长率均值均超过 0.85。30 株单增李斯特菌在李氏增菌肉汤 (LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>)、PALCAM 琼脂培养基、李斯特氏菌显色培养基中的增菌检测效果存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )。4 个品牌的李氏增菌肉汤的增菌效果和 6 个品牌 PALCAM 琼脂培养基、李斯特氏菌显色培养基的检测效果存在显著性差异 ( $p < 0.01$ )。该研究结果表明市售单增李斯特菌国标检验培养基质量差异大。

**关键词:** 单核细胞增生李斯特氏菌; 李氏增菌肉汤; PALCAM 琼脂培养基; 李斯特氏菌显色培养基

文章编号: 1673-9078(2022)01-44-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.0910

## Comparison of the Quality of Chinese National Standard Test Media for

### *Listeria monocytogenes*

YU Wen, AN Lin, CUI Shenghui\*

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

**Abstract:** The quality of different brands of commercially available Chinese National Standard (CNS) test media for *Listeria monocytogenes* (LM) was compared by investigating the enrichment effects of the media on LM and non-LM bacterial strains. Using the spiral spread count method, the growth of 30 LM strains and nine non-LM strains in four brands of the *Listeria* enrichment broths LB<sub>1</sub> and LB<sub>2</sub>, six brands of PALCAM agar media, and six brands of *Listeria* chromogenic media was quantitatively determined. Experimental results showed that the average concentrations of the 30 LM strains were  $2.04 \times 10^8$ ~ $4.59 \times 10^8$  CFU/mL in the four brands of LB<sub>1</sub> enrichment broths and  $2.36 \times 10^7$ ~ $2.69 \times 10^7$  CFU/mL in the LB<sub>2</sub> enrichment broths. The average growth rate was 0.55 in PALCAM agar medium D but exceeded 0.85 in the remaining five brands of PALCAM agar media and all six brands of *Listeria* chromogenic media. Significant differences were observed in the enrichment effects of the 30 LM strains in the *Listeria* enrichment broths (LB<sub>1</sub> and LB<sub>2</sub>), PALCAM agar media, and *Listeria* chromogenic media ( $p < 0.05$ ). The enrichment effects of the four brands of *Listeria* enrichment broths differed significantly from those of the six brands of PALCAM agar media and six brands of *Listeria* chromogenic media ( $p < 0.01$ ). Our results indicate that quality varies considerably among the various commercially available CNS test media for LM.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; *Listeria* enrichment broth; PALCAM agar medium; *Listeria* chromogenic medium

引文格式:

余文,安琳,崔生辉.单增李斯特菌国标检验培养基质量的比较[J].现代食品科技,2022,38(1):44-49,+10

YU Wen, AN Lin, CUI Shenghui. Comparison of the quality of Chinese national standard test media for *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 44-49, +10

收稿日期: 2021-08-18

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2017YFC1601400)

作者简介: 余文 (1983-), 女, 助理研究员, 研究方向: 食品与化妆品微生物检测, Email: 6646227@qq.com

通讯作者: 崔生辉 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物与食品安全, E-mail: cuishenghui@aliyun.com

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM, 以下简称单增李斯特菌) 为细胞内寄生的革兰氏阳性无芽孢杆菌, 是引起人畜共患病的重要食源性致病菌<sup>[1-3]</sup>, 它可以污染生肉、熟肉制品、蛋类等多种食品<sup>[4]</sup>。单增李斯特菌可以在冷藏条件下生长, 其污染水平是确定冷藏食品安全性的关键因素<sup>[5]</sup>。低浓度 ( $10^2$  CFU/g) 的污染即可感染高危人群, 包括新生儿、孕妇和免疫缺陷者等<sup>[6-7]</sup>, 引起败血症、脑膜炎及单核细胞增生等多种疾病, 死亡率高达 20%~30%<sup>[8-10]</sup>。鉴于单增李斯特菌致病力较强<sup>[11-12]</sup>, GB 29921-2021《食品安全国家标准预包装食品中致病菌限量》<sup>[13]</sup>中对熟肉制品和即食生肉制品中单增李斯特菌进行了明确的限量规定, 并指定依据 GB 4789.30-2016《食品安全国家标准食品中微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》<sup>[14]</sup> (以下简称 GB 4789.30-2016) 开展检验。

GB 4789.30-2016 中使用李氏增菌肉汤 (LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>) 对食品中可能污染的单增李斯特菌进行两步选择性增菌, 再划线到 PALCAM 琼脂培养基和李斯特氏菌显色培养基上对可疑菌落进行分离, 并进行生化鉴定。其中 LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub> 增菌肉汤和选择分离培养基是影响单增李斯特菌分离效果的重要因素。GB 4789.28-2013《食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》<sup>[15]</sup> (以下简称 GB 4789.28-2013) 选用了一株单增李斯特菌 (ATCC19115) 和 2 株非目标菌 (大肠埃希菌 ATCC25922 和粪肠球菌 ATCC29212) 采用了半定量的方法对 LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub> 增菌肉汤进行质控。但单增李斯特菌作为一个种, 其遗传基础复杂, 仅符合 GB 4789.28-2013 的培养基是否能满足常见单增李斯特菌的分离尚有待分析。

本研究使用 30 株单增李斯特菌和 9 株非单增李斯特菌对市售 4 个品牌的李氏增菌肉汤、6 个品牌的 PALCAM 琼脂培养基和李斯特氏菌显色培养基质量进行了对比分析, 所获数据以期作为培养基的质控、GB 4789.28-2013 和 GB 4789.30-2016 修订提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基与菌株

李氏增菌肉汤 (LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>) 购自 A、B、C、D 四个公司; 李斯特菌显色培养基购自 A、B、C、D、G、F 六个公司; PALCAM 琼脂培养基购自 A、B、C、D、E、F 六个公司; 胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA) 购自美国 BD 公司。

本研究采用菌株包括实验室保存的 30 株单增李斯特菌和 9 株非单增李斯特菌 (见表 1)。30 株单增李斯特菌包括标准菌株 ATCC19115 (源自美国菌种保藏中心) 和 29 株本实验室从食品中分离的单增李斯特菌。

表 1 9 株非单增李斯特菌信息

Table 1 Information of 9 non-*Listeria monocytogenes*

序号	菌株名称	菌株编号
1	粪肠球菌	ATCC29212
2	大肠埃希氏菌	ATCC25922
3	粪肠球菌	MS2515
4	大肠埃希氏菌	CICC29001
5	金黄色葡萄菌	ATCC25923
6	表皮葡萄球菌	CMCC26609
7	枯草芽孢杆菌	CMCC63501
8	阴沟肠杆菌	MS2323
9	肺炎克雷伯菌	ATCC700603

### 1.2 主要仪器

PL2002 电子天平, 梅特勒-托利多公司; MLS-3780 高压灭菌器, 日本三洋公司; Thermo 1389 生物安全柜, 美国 THERMO 公司; PR 205050 GCN 生化培养箱, 美国 THERMO 公司; 全自动微生物螺旋加样系统, 西班牙 IUL 公司; Viteck compact 2 全自动微生物分析系统, 法国梅里埃公司; BrukerAutoflex II 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS), 德国 Bruker 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌株确认

使用全自动微生物分析系统和 MALDI-TOF MS 对 30 株单增李斯特菌进行确认。

#### 1.3.2 李氏增菌肉汤比对

取 30 株单增李斯特菌和 9 株非单增李斯特菌的 TSA 平板二代新鲜培养物, 加入无菌生理盐水中, 制备 2.6~2.8 麦氏浊度的菌悬液, 用无菌生理盐水梯度稀释到合适倍数, 采用 E50 模式螺旋涂布至 TSA 平板上, 平行涂布两个平板, 36 °C 培养 24 h, 进行计数。将 LB<sub>1</sub> 增菌肉汤 1 mL 分装于 24 孔板中, 取合适浓度的菌液 10 μL 分别加入不同厂家的 LB<sub>1</sub> 增菌肉汤中 (接种水平为 300~500 CFU/孔), 30 °C 培养 24 h。取培养后的 LB<sub>1</sub> 增菌肉汤梯度稀释到合适倍数, 采用 E50 模式螺旋涂布至 TSA 平板上, 平行涂布两个平板, 36 °C

培养 24 h, 进行计数。取 10 μL LB<sub>1</sub> 增菌肉汤接入 1 mL LB<sub>2</sub> 增菌肉汤中, 30 °C 培养 24 h。取 LB<sub>2</sub> 增菌肉汤梯度稀释到合适倍数, 采用 E50 模式螺旋涂布至 TSA 平板上, 平行涂布两个平板, 36 °C 培养 24 h, 进行计数。

### 1.3.3 PALCAM 琼脂培养基和单增李斯特菌显色培养基比对

取 30 株单增李斯特菌和 9 株非单增李斯特菌的 TSA 平板二代新鲜培养物, 加入无菌生理盐水中, 制备 2.6~2.8 麦氏浊度的菌悬液, 用无菌生理盐水稀释到合适稀释度, 采用 E50 模式螺旋涂布至 PALCAM、单增李斯特菌显色培养基和参比 TSA 平板, 平行涂布两个平板, 36 °C 培养 48 h 后进行计数, 接种水平为 20~200 CFU/板。

### 1.3.4 选择性分离固体培养基的生长率计算

取出待测培养基及 TSA 参比培养基, 选择菌落数在 20~200 CFU 的平板按照以下公式计算生长率 ( $P_R$  值):

$$P_R = \frac{N_S}{N_0}$$

式中:

$P_R$ ——生长率;

$N_S$ ——待测培养基平板上得到的菌落总数;

$N_0$ ——参比培养基平板上得到的菌落总数。

### 1.3.5 李氏增菌肉汤及选择性分离固体培养基的统计学分析

按照 GB 4789.28-2013 要求推算, LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub> 肉汤增菌后的浓度须大于 10<sup>4</sup> CFU/mL, 使用增菌后浓度相较标准浓度 (10<sup>4</sup> CFU/mL) 倍数的对数 (以下简称浓度倍数对数) 进行分析, 即增菌后的计数结果除以 10<sup>4</sup> 再取对数。对 30 株单核细胞增生李斯特菌在 4 个品牌的培养基得到的浓度倍数对数, 使用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 分析培养基间差异, 并使用配对  $t$  检验比较 LB<sub>1</sub> 与 LB<sub>2</sub> 两种增菌肉汤中平均生长浓度的差异。

对 30 株单增李斯特菌在 6 个品牌的 PALCAM 琼脂培养基和单增李斯特菌显色培养基上的生长率, 使用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 分析培养基间差异, 并使用配对  $t$  检验比较 PALCAM 琼脂培养基和显色培养基上生长率的差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 李氏增菌肉汤的增菌效果比较

表 2 30 株单增李斯特菌在 4 个品牌李氏增菌肉汤 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 中增菌后浓度分布情况

Table 2 Concentration distribution of 30 strains of *Listeria monocytogenes* in four brands of *Listeria* enriched broth LB<sub>1</sub> and LB<sub>2</sub>

浓度/(CFU/mL)	LB <sub>1</sub> 品牌				LB <sub>2</sub> 品牌			
	A (株)	B (株)	C (株)	D (株)	A (株)	B (株)	C (株)	D (株)
≤1×10 <sup>4</sup>	2	1	2	0	2	2	2	1
1×10 <sup>4</sup> ~1×10 <sup>5</sup>	0	1	0	1	2	1	4	3
1×10 <sup>5</sup> ~1×10 <sup>6</sup>	1	0	0	1	5	5	4	4
1×10 <sup>6</sup> ~1×10 <sup>7</sup>	1	2	2	1	5	7	10	10
1×10 <sup>7</sup> ~1×10 <sup>8</sup>	8	4	4	6	11	10	5	7
>1×10 <sup>8</sup>	18	22	22	21	5	5	5	5
平均浓度/(CFU/mL)	2.38×10 <sup>8</sup>	4.59×10 <sup>8</sup>	2.04×10 <sup>8</sup>	3.02×10 <sup>8</sup>	2.64×10 <sup>7</sup>	2.69×10 <sup>7</sup>	2.36×10 <sup>7</sup>	2.55×10 <sup>7</sup>

表 3 单增李斯特菌在 4 个品牌李氏增菌肉汤 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 增菌后浓度比较 (CFU/mL)

Table 3 Comparison of concentration of *Listeria monocytogenes* after enrichment of LB<sub>1</sub> and LB<sub>2</sub> in four brands of *Listeria* enriched brot (CFU/mL)

菌株编号	LB <sub>1</sub> 品牌				LB <sub>2</sub> 品牌			
	A	B	C	D	A	B	C	D
ATCC19115	1.22×10 <sup>8</sup>	4.24×10 <sup>7</sup>	6.82×10 <sup>7</sup>	1.47×10 <sup>7</sup>	8.20×10 <sup>4</sup>	2.27×10 <sup>5</sup>	1.20×10 <sup>4</sup>	4.90×10 <sup>4</sup>
FC2257	1.00×10 <sup>3</sup>	3.55×10 <sup>7</sup>	4.85×10 <sup>7</sup>	6.25×10 <sup>7</sup>	5.00×10 <sup>4</sup>	1.15×10 <sup>5</sup>	6.70×10 <sup>4</sup>	1.30×10 <sup>5</sup>
FC2963	6.45×10 <sup>6</sup>	6.91×10 <sup>7</sup>	7.72×10 <sup>7</sup>	6.14×10 <sup>7</sup>	3.21×10 <sup>5</sup>	5.93×10 <sup>5</sup>	6.00×10 <sup>3</sup>	1.75×10 <sup>5</sup>
FC4278	1.00×10 <sup>3</sup>	1.10×10 <sup>4</sup>	1.51×10 <sup>3</sup>	2.20×10 <sup>4</sup>	4.00×10 <sup>3</sup>	5.50×10 <sup>3</sup>	1.30×10 <sup>4</sup>	1.10×10 <sup>4</sup>
FC11106	1.92×10 <sup>5</sup>	1.61×10 <sup>3</sup>	1.20×10 <sup>3</sup>	1.93×10 <sup>5</sup>	3.47×10 <sup>3</sup>	1.00×10 <sup>3</sup>	1.00×10 <sup>3</sup>	1.00×10 <sup>3</sup>
FC13175	1.56×10 <sup>7</sup>	5.46×10 <sup>6</sup>	8.92×10 <sup>6</sup>	1.61×10 <sup>7</sup>	2.41×10 <sup>5</sup>	9.87×10 <sup>4</sup>	3.50×10 <sup>4</sup>	8.50×10 <sup>4</sup>

注: 表格列举结果为在不同品牌培养基中增菌后浓度低于 1×10<sup>5</sup> CFU/mL 的单增李斯特菌。

表4 非单增李斯特菌在李氏增菌肉汤 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 中 24h 增菌效果比较 (CFU/mL)Table 4 Comparison of 24 h increasing effect of non-monocytosteria in Listeria increasing broth LB<sub>1</sub> and LB<sub>2</sub> (CFU/mL)

菌株名称	LB <sub>1</sub> 品牌				LB <sub>2</sub> 品牌			
	A	B	C	D	A	B	C	D
粪肠球菌 MS2515	8.18×10 <sup>6</sup>	2.60×10 <sup>7</sup>	2.43×10 <sup>6</sup>	1.83×10 <sup>7</sup>	2.84×10 <sup>5</sup>	2.98×10 <sup>8</sup>	2.40×10 <sup>4</sup>	3.83×10 <sup>6</sup>
枯草芽孢杆菌 CMCC63501	<100	<100	<100	<100	<100	<100	5.96×10 <sup>7</sup>	8.21×10 <sup>6</sup>
大肠埃希氏菌 CICC29001	<100	<100	<100	<100	<100	2.83×10 <sup>5</sup>	<100	<100
阴沟肠杆菌 MS2323	1.19×10 <sup>5</sup>	<100	<100	1.24×10 <sup>6</sup>	<100	1.22×10 <sup>8</sup>	<100	<100
肺炎克雷伯菌 ATCC700603	8.06×10 <sup>8</sup>	1.06×10 <sup>9</sup>	1.76×10 <sup>8</sup>	2×10 <sup>7</sup>	1.09×10 <sup>9</sup>	1.06×10 <sup>9</sup>	9.16×10 <sup>8</sup>	3.42×10 <sup>8</sup>

单增李斯特菌 ATCC19115 在 4 个品牌 LB<sub>1</sub> 肉汤中的生长浓度均可达到 1×10<sup>7</sup> CFU/mL 以上,而在 LB<sub>2</sub> 肉汤中的生长浓度均低于 2×10<sup>5</sup> CFU/mL。30 株单增李斯特菌在 4 个品牌的 LB<sub>1</sub> 中的平均生长浓度极显著性高于 LB<sub>2</sub> 中的平均生长浓度 ( $t_{df=119}=10.03, p<0.01$ )。LB<sub>1</sub> 增菌肉汤和 LB<sub>2</sub> 增菌肉汤中加入了不同浓度的萘啶酮酸和吡啶黄作为抑菌剂, LB<sub>1</sub> 增菌肉汤中萘啶酮酸的浓度为 22.20 μg/mL, 吡啶黄的浓度为 13.30 μg/mL; LB<sub>2</sub> 增菌肉汤中萘啶酮酸的浓度为 20 μg/mL, 吡啶黄的浓度为 25 μg/mL<sup>[14]</sup>。可见 LB<sub>2</sub> 增菌肉汤中萘啶酮酸的浓度几乎为 LB<sub>1</sub> 增菌肉汤中的二倍, 因此 LB<sub>2</sub> 抑菌性较 LB<sub>1</sub> 强, LB<sub>1</sub> 增菌效果优于 LB<sub>2</sub>。

30 株单增李斯特菌在 4 个品牌 LB<sub>1</sub> ( $F_{3,87}=2.92, p<0.05$ ) 和 LB<sub>2</sub> ( $F_{29,87}=18.12, p<0.01$ ) 肉汤中的平均生长浓度可见显著性差异, 其中 B 品牌的 LB<sub>1</sub> 增菌后浓度显著高于其余 3 个品牌 ( $p<0.05$ )。LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 液体培养基的基础成分一致, 为胰胨、多价胨、酵母膏、磷酸盐、氯化钠、和七叶苷。其中磷酸二氢钾、磷酸氢二钠等化学物质较为稳定, 一般差异性不大, 造成不同品牌 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 培养基质量差异的原因, 多为胰胨、多价胨、酵母膏等营养成分的质量和配比差异。

6 株单增李斯特菌在部分品牌的 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 肉汤的生长浓度低于 1×10<sup>5</sup> CFU/mL, 其中单增李斯特菌 FC4278 和 FC11106 在不同品牌肉汤中的生长状况最差(表 3), 其余 24 株单增李斯特菌在 4 个品牌的 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 肉汤的生长浓度超过 1×10<sup>5</sup> CFU/mL。FC4278 和 FC11106 单增李斯特菌在 4 个品牌的李氏增菌肉汤中增菌效果不佳, 上述结果提示, 李氏增菌肉汤中的营养成分不能满足这 2 株单增李斯特菌的需求, 且李氏增菌肉汤中的抑菌成分对这 2 株单增李斯特菌有一定的抑制作用。朱海华等<sup>[16]</sup>的研究中发现对单增李斯特菌的增菌效果更佳的增菌肉汤 LB<sub>3</sub>。

大肠埃希氏 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和表皮葡萄球菌 CMCC26609 在 4 个品牌的 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 肉汤中均未见显著生长; 粪肠球菌 MS2515、大肠埃希氏

CICC29001、枯草芽孢杆菌 CMCC63501 和阴沟肠杆菌 MS2323 在部分品牌 LB<sub>1</sub> 或 LB<sub>2</sub> 肉汤中呈显著生长; 肺炎克雷伯菌 ATCC700603 在所有品牌 LB<sub>1</sub> 和 LB<sub>2</sub> 肉汤中均呈显著生长(表 4)。

## 2.2 不同品牌 PALCAM 琼脂培养基和李斯特氏菌显色培养基比对结果

30 株单增李斯特菌在 6 个品牌的 PALCAM 琼脂培养基上的生长率存在极显著性差异 ( $F_{5,145}=13.16, p<0.01$ )。包括 ATCC19115 在内的 13 株单增李斯特菌在 D 品牌的 PALCAM 琼脂培养基上生长率低于 0.5, 其中 1 株菌在 E 品牌、4 株菌在 F 品牌培养基上生长率低于 0.5(表 5), 其余 17 株单增李斯特菌在所有品牌的 PALCAM 琼脂培养基上的生长率均超过 0.5。30 株单增李斯特菌在 A、B 和 C 品牌的 PALCAM 琼脂培养基上的生长率均高于 0.5。

30 株单增李斯特菌在 6 个品牌显色培养基上的生长率有显著性差异 ( $F_{5,145}=2.32, p<0.05$ )。30 株单增李斯特菌在 A、B、C、D、G 品牌显色培养基上的生长率均高于 0.5, 3 株单增李斯特菌在 F 品牌培养基上的生长率低于 0.5(表 5)。

30 株单增李斯特菌在显色培养基上的生长率极显著性高于 PALCAM 琼脂培养基上的生长率(使用 A、B、C、D、F 五品牌数据,  $t_{df=149}=3.74, p<0.01$ )。本研究结果提示, 显色培养基对单增李斯特菌的检测效果优于 PALCAM 琼脂培养基。刘成文等、炊慧霞等<sup>[17,18]</sup>等也在研究中提到单增李斯特菌在显色培养基上的检出效率优于 PALCAM 琼脂培养基。李斯特菌在 PALCAM 琼脂培养基上被区分出来是基于 β-D-葡萄糖苷酶的活性。这种酶裂解培养基中的七叶苷产生灰绿色菌落, 然后通过降解产物七叶苷与柠檬酸铁铵中的铁离子反应, 菌落周围产生棕黑色晕圈(6,7-二羟基香豆素)。培养基中的氯化锂和其它的抗生素能抑制革兰氏阴性菌和大多数革兰氏阳性菌生长。PALCAM 琼脂培养基不能将单增李斯特氏菌与其他

李斯特氏菌区分开,因此需要进一步的鉴定分析来确定。李斯特氏菌显色培养基中的色素与李斯特氏菌具有的酶发生特异性反应,水解底物,释放出显色基团。在平板上,单增李斯特氏菌呈现出蓝色菌落,菌落周

围有一圈白色晕环,抑制剂可抑制杂菌的生长。李斯特氏菌显色培养基能区分单增李斯特氏菌与绝大部分其他李斯特氏菌,但不能区分绵羊李斯特氏菌。然而绵羊李斯特氏菌在食品检测中非常少见。

表5 单增李斯特菌在6个品牌PALCAM和显色培养基上生长率比较结果

Table 5 Comparison of growth rate of *Listeria monocytogenes* on 6 brands of PALCAM and chromogenic medium

菌株编号	PALCAM						显色培养基					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	G	F
ATCC19115	0.96	0.96	0.98	0.08	0.95	0.93	0.96	1.20	0.80	1.08	0.72	1.08
FC2257	0.92	0.86	0.97	0.20	0.90	0.88	0.96	1.10	0.77	1.00	1.06	0.94
FC4278	1.07	0.96	0.93	0.09	0.81	0.05	1.07	1.19	0.98	0.98	1.07	0
FC11134	0.90	0.93	1.00	0.06	0.9	0.97	0.97	0.97	1.16	1.11	0.92	1.08
FC11270	0.98	0.96	1.05	0.01	0.86	0.01	1.03	1.19	1.17	0.95	0.83	0.12
FC13175	0.93	1.01	0.96	0	0.92	0	0.79	0.81	0.83	0.83	0.96	0
FC11717	0.88	0.90	0.87	0.21	0.01	0.01	0.88	1.00	1.12	1.21	1.30	0.85
FC2259	0.91	0.87	0.91	0.20	0.81	0.78	0.80	0.77	1.07	0.73	0.77	1.00
FC11102	0.90	0.87	0.92	0	0.76	0.81	1.10	1.10	1.19	1.10	1.29	0.67
FC11106	0.90	0.86	0.92	0	0.82	0.97	1.00	0.97	1.32	0.88	0.97	0.88
FC11117	0.87	0.89	1.00	0	1.00	0.75	0.72	0.98	0.83	0.92	0.95	0.86
FC11129	0.85	0.85	1.01	0.01	0.75	0.86	0.94	1.30	1.15	0.94	0.91	0.91
FC11137	0.90	0.92	0.89	0.09	0.95	0.96	0.87	0.77	1.26	0.98	0.89	1.00
均值	0.92	0.93	0.94	0.55	0.86	0.77	0.90	0.96	0.98	0.96	0.96	0.85

注:表格列举结果为在不同品牌培养基生长率低于0.5的单增李斯特菌。

表6 非单增李斯特菌在PALCAM和显色培养基上的生长率

Table 6 Growth rate of non-monoproliferative *Listeria* on PALCAM and chromogenic medium

菌株名称	PALCAM					显色培养基				
	A	B	C	D	F	A	B	C	D	G
粪肠球菌 ATCC29212	0	0	0	0	0	0	0	0	0.92	0
大肠埃希氏 ATCC25922	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
粪肠球菌 MS2515	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大肠埃希氏 CICC29001	0	0	0	0	0	0	0	0.96	0	0
金黄色葡萄菌 ATCC25923	0.54	0.58	0.45	0.11	0	0	0	0	0	0
表皮葡萄球菌 CMCC26609	0.99	0.90	0.71	0	0	0.83	0.94	0.87	1.19	0
枯草芽孢杆菌 CMCC63501	0	0	0	0	0	0	0	1.00	0.53	0
阴沟肠杆菌 MS2323	0	0	0	0	0	0	0	0.97	0	0
肺炎克雷伯菌 ATCC700603	0	0	0	0	0	0.06	0.10	0.78	0.81	0

9株非李斯特菌在品牌F的PALCAM琼脂培养基和品牌G的显色培养基上均未见生长。大肠埃希菌ATCC25922和粪肠球菌MS2515在五个品牌的显色培养基和PALCAM琼脂培养基上均未见生长。金黄色葡萄菌ATCC25923在A、B、C、D四个品牌的PALCAM培养基上呈现不同程度的生长,但该菌在五个品牌显色培养基上均未见生长。表皮葡萄球菌CMCC26609在三个品牌PALCAM培养基和四个品牌显色培养基上均呈现良好生长。枯草芽孢杆菌

CMCC63501和肺炎克雷伯菌ATCC700603仅在两个品牌的显色培养基上呈现良好生长,而阴沟肠杆菌MS2323仅在品牌C的显色培养基上呈现良好生长(表6)。

### 3 结论

3.1 GB 4789.28-2013中选择了1株单增李斯特菌和2株非单增李斯特菌作为LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>增菌肉汤、PALCAM培养基和单增李斯特菌显色培养基的质控菌株。本研

究选择了 30 株不同来源的单增李斯特菌作为目标菌和 9 株非目标菌。目标菌的来源更广,更全面,非目标菌涵盖了食品中常见的致病菌,更具代表性。此外,GB 4789.28-2013 中对 LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub> 增菌肉汤采用的是半定量计数法, PALCAM 培养基和单增李斯特菌显色培养基采用的是定量计数法进行质控。本研究采用了螺旋涂布计数法对市售的 4 个品牌的李氏增菌肉汤、6 个品牌的显色培养基和 PALCAM 琼脂培养基进行对比,此方法为定量计数法,较 GB 4789.28-2013 中半定量计数法更为准确。

3.2 本研究发现 2 株单增李斯特菌在 4 个品牌的李氏增菌肉汤中增菌效果均不佳,且 LB<sub>1</sub> 增菌肉汤中的平均生长浓度极显著性高于 LB<sub>2</sub> 增菌肉汤。上述结果表明 GB 4789.30-2016 方法中使用 LB<sub>1</sub> 配合 LB<sub>2</sub> 肉汤进行增菌存在漏检风险,且 LB<sub>1</sub> 增菌效果优于 LB<sub>2</sub>。建议修订 GB 4789.30-2016 时,考虑使用 LB<sub>1</sub> 配合另一种对单增李斯特菌增菌效果更佳的肉汤,以提高单增李斯特氏菌的检出率。

3.3 市售的 4 个品牌的李氏增菌肉汤的增菌效果、6 个品牌的 PALCAM 琼脂培养基和李斯特菌显色培养基的检测效果存在显著差异,不同品牌培养基质量差异大。鉴于以上研究分析,建议有关机构研制参比培养基,为培养基的生产和使用提供更规范的质量控制。本研究获实验数据对培养基生产厂家的质量控制和产品质量提升具有一定参考价值,并为 GB 4789.28-2013 标准的制修订提供了参考数据。

## 参考文献

- [1] Schlech III W F, Lavigne P M, Bortolussi R A, et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food [J]. New England Journal of Medicine, 1983, 308(4): 203-206
- [2] Ruiz L, Aertsen A, Gänzle M G, et al. Industrial and host associated stress responses in food microbes. Implications for food technology and food safety [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1522
- [3] Bucur F I, Grigore-Gurgu L, Crauwels P, et al. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2700
- [4] 梁文革,高涛,张丽萍.2005-2018 年陕西省宝鸡市市售食品中单核细胞增生李斯特氏菌污染状况研究[J].医学动物防制,2020,36(1):10-13
- LIANG Wenge, GAO Tao, ZHANG Liping. Study on the contamination status of *Listeria monocytogenes* in foods marketed in Baoji city of Shaanxi province from 2005 to 2018 [J]. Journal of Medical Pest Control, 2020, 36(1): 10-13
- [5] Bahrami A, Baboli Z M, Schimmel K, et al. Efficiency of novel processing technologies for the control of *Listeria monocytogenes* in food products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 61-78
- [6] Gandhi M, Chikindas M L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(1): 1-15
- [7] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(1): 32-46
- [8] 田明胜,王颖,陈波,等.上海市售肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌污染监测和定量分析[J].生物加工过程,2020,18(3):128-132
- TIAN Mingsheng, WANG Ying, CHEN Bo, et al. Contaminant monitoring and quantitative analysis of *Listeria monocytogenes* in retail meat products in Shanghai municipality [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(3): 128-132
- [9] Matanock A, Katz L S, Jackson K A, et al. Two *Listeria monocytogenes* pseudo-outbreaks caused by contaminated laboratory culture media [J]. Journal of clinical microbiology, 2016, 54(3): 768-770
- [10] Buchanan R L, Gorris L G M, Hayman M M, et al. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments [J]. Food Control, 2017, 75: 1-13
- [11] Roberts T, Pinner R. Economic impact of disease caused by *L. monocytogenes* [J]. Topics in Industrial Microbiology: Foodborne Listeriosis, 1990: 137-149
- [12] 赵丽娜,申进玲,宁雪,等.2017~2019 年我国进口食品食源性致病菌污染状况分析[J].食品安全质量检测学报,2020, 11(9):2930-2935
- ZHAO Lina, SHEN Jinling, NING Xue, et al. Analysis on the contamination status of food-borne pathogens of imported food in China from 2017 to 2019 [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(9): 2930-2935
- [13] GB 29921-2021. 食品安全国家标准预包装食品中致病菌限量[S]
- GB 29921-2013. National Standard for Food, Safty Limit of Pathogenic Bacteria in Food [S]

(下转第 10 页)