

不同增菌液对单增李斯特菌的增菌效果比较

苏嘉妮*, 邓嘉慧, 赵梓烽

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: 目的 比较不同选择性增菌液对单增李斯特菌增菌效果及对干扰菌的抗干扰性。**方法** 参考国标 GB/T 4789.30-2016 和国际 ISO 11290-1-2017, 将 2 种来源的单增李斯特菌(标准菌株、分离菌株)和 2 种干扰菌(大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌)分别接种到 4 种不同增菌液中, 观察增菌后菌液的生长情况。**结果** 研究发现低浓度菌液(10^2 数量级), Fraser 肉汤对单增李斯特菌的增菌效果及抗干扰性优于 LB 肉汤。选择性添加剂浓度过高会抑制李斯特菌的生长, 通过选择合适的选择性添加剂及改变添加剂的浓度可以提高检出率。**结论** 在实验室日常检验过程中, 需考虑样品类别, 选择合适的培养基。提高检测的准确率。

关键词: 单增李斯特菌; 增菌; 干扰菌; 显色培养基

Comparison of the effects of different enrichment mediums on the growth of *Listeria monocytogenes*

SU Jia-Ni*, DENG Jia-Hui, ZHAO Zi-Feng

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To compare the effects of different selective enrichment mediums on the growth of *Listeria monocytogenes* and the anti-interference ability against interfering strains. **Methods** According to GB/T 4789.30-2016 and ISO 11290-1-2017, two kinds of *Listeria monocytogenes* (standard strain, isolated strain) and two kinds of interference bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) were cultured by four different bacterial growth solution to observe the growth of the bacteria. **Results** When the low-concentration enrichment medium reaches 10^2 CFU/mL, the study found that Fraser was better than LB broth in increasing bacteria and anti-interference. Too high concentration of selective additives would inhibit the growth of *Listeria*, and the detection rate could be improved by selecting appropriate selective additives and changing the concentration of additives. **Conclusion** It is necessary to consider the type of sample and select the appropriate medium to improve the accuracy of detection in the laboratory's daily detection process.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; enriched culture; interfering strains; chromogenic medium

1 引言

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)广泛存

在于环境和食品中, 被 WHO 列为 20 世纪 90 年代末四大食源性致病菌之一, 可致人和动物产生李斯特菌病, 老年人、孕妇、婴儿(即胎儿和新生儿)、免疫缺陷人群

基金项目: 广东省食品检验所科技创新基金项目(2019JS10)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Project of Guangdong Institute of Food Inspection (2019JS10)

*通讯作者: 苏嘉妮, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。E-mail: 1343811472@qq.com

*Corresponding author: SU Jia-Ni, Assistant Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: 1343811472@qq.com

易感染,致死率高达 20%~30%^[1,2]。因此,在食品卫生微生物检验中,必须加以重视。现有的 Lm 检验方法除国标方法外,酶底物显色技术、免疫学和分子生物学检测等快筛技术也得到广泛的运用^[3]。但国标法仍是目前较为准确的检验方法。Lm 能通过各种媒介进入加工过程,并且在适宜的温度下生长繁殖,但由于加工过程中易受生产、包装、储藏、运输等环境的影响导致 Lm 菌体处于亚损伤状态,需要有一种适合的培养基来修复受损伤的菌体,以防漏检,而良好的增菌培养基是提高检出率的重要手段^[4-6]。

常规的单增李斯特菌检测方法通过使用含有不同浓度添加剂的液体培养基进行 2 步增菌,再用选择性鉴别培养基分离培养,生化试验验证。本研究参考国标 GB/T 4789.30-2016 和国际 ISO 11290-1-2017^[7,8],比较 2 种方法中不同选择性增菌液对单增李斯特菌及其干扰菌的增菌效果及抗干扰性,为提高单增李斯特菌的检出率提供参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

李氏增菌肉汤(LB₁, LB₂)基础、营养肉汤、胰酪大豆胨琼脂培养基(soybean casein digest agar, TSA)、萘啶酮酸(10 g/L)、吡啶黄(10 g/L)、李斯特氏菌显色培养基(北京陆桥技术股份有限公司); Half FRASER(Demi FRASER)抗生素肉汤(碱性)、Ammonium iron(III) supplement、Selective supplement(德国默克公司)。

AC2-4S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); LRH-250 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); VITEK 2 Compact 自动微生物快速检测分析系统(法国梅里埃公司)。

2.2 菌 株

单增李斯特菌标准菌株(ATCC 19115)、大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)购自美国 Microbiologics 公司;单增李斯特菌分离株由本实验室从食品中分离得到。

2.3 实验方法

2.2.1 菌株复苏及验证

将菌株从-80 °C 冰箱取出,分别接种至营养肉汤 36 °C 培养 24 h 复苏,从肉汤挑取 1 环菌液划线在 TSA 培养基,36 °C 培养 24~48 h,挑取平板上菌落用 VITEK 2 Compact 进行鉴定符合菌株生化特征。

2.2.2 实验菌液制备及菌落计数

将单增李斯特菌标准菌株和分离株、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌分别在 TSA 培养基传代 2 次,保证菌株活性,挑取单个菌落接种于营养肉汤,培养 7 h 后,用生理盐水稀释至 10⁻⁵~10⁻⁸。分别取 0.1 mL 不同浓度稀释液

涂布接种于 TSA 平板中,36 °C±1 °C 培养 48 h±2 h,每种浓度作 2 次重复。菌落计数,作为各稀释度的单增李斯特菌标准菌株和分离株、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌的实际菌浓度。

2.2.3 不同选择性增菌液对单增李斯特菌及干扰菌的增菌效果测定

参考 GB/T 4789.30-2016 和 ISO 11290-1-2017 增菌方法,单增李斯特菌标准菌株和分离株分别取 10⁻⁵~10⁻⁸ 浓度的菌液 0.1 mL,大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌分别取 10⁻⁵~10⁻⁶ 浓度的菌液 0.1 mL,接种于 LB₁ 和 LB₂、1/2 Fraser 和 Fraser 肉汤中,30 °C±1 °C 培养 24 h±2 h,分别划线分离于 TSA、李斯特显色培养基,36 °C±1 °C 培养 24~48 h。每种浓度作 3 次重复。

2.2.4 不同选择性增菌液抗干扰性检测

分别取 0.1 mL 10⁻⁶ 浓度大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌菌液(作为混合干扰菌),单增李斯特菌标准菌株取 10⁻⁶ 浓度的菌液 0.1 mL(作为目标菌),接种于 LB₁ 和 LB₂、1/2 Fraser 和 Fraser 肉汤中,制成 1/2 单增李斯特菌/混合干扰菌。除单增李斯特菌标准菌株取 10⁻⁷ 浓度菌液,其余同上,制成 1/20 单增李斯特菌/混合干扰菌(30±1) °C 培养 24 h±2 h,分别划线分离于 TSA、李斯特显色培养基,36 °C±1 °C 培养 24~48 h。每种浓度作 3 次重复。

2.2.5 4 种增菌液培养基成分

4 种增菌液培养基成分,见表 1。

3 结果与分析

3.1 单增李斯特菌和干扰菌在不同增菌液增菌后生长情况

添加单增李斯特菌和干扰菌于不同增菌液,观察增菌后的生长情况,结果见表 2。添加单增李斯特菌菌量在 10³ CFU/mL 数量级时,2 种方法的增菌液不存在差异。添加菌量在 10² CFU/mL 数量级时,单增李斯特菌标准菌在 LB₂ 增菌液中受到了抑制。添加菌量低于 10² CFU/mL 数量级时,单增李斯特菌标准菌在 LB₂ 增菌液中受到了抑制,1/2 Fraser 增菌液部分受到抑制,而添加单增分离株可以比较明显看出添加菌量低于 10² CFU/mL 数量级时,LB₁ 和 LB₂ 的增菌效果弱于 1/2 Fraser 和 Fraser。单增李斯特菌标准菌和分离株增菌后结果不一致和菌株的活性有一定的关系。

添加干扰菌大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌于不同增菌液中,结果发现,1/2 Fraser 和 Fraser、LB₂ 增菌液均能抑制干扰菌的生长,当添加金黄色葡萄球菌菌量达到 10² CFU/mL 数量级时,LB₁ 不能完全抑制干扰菌金黄色葡萄球菌的生长。

表 1 培养基组成成分
Table 1 Composition of media

		LB ₁	LB ₂	Half Fraser	Fraser
成分/(g/L)	胰胨	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g
	多价胨	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g
	酵母浸粉	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g
	氯化钠	20 g	20 g	20 g	20 g
	磷酸二氢钾	1.4 g	1.4 g	1.35 g	1.35 g
	磷酸氢二钠	12 g	12 g	12 g	12 g
	七叶苷	1 g	1 g	1 g	1 g
	氯化锂	/	/	3 g	3 g
	柠檬酸铁铵	/	/	500 mg	500 mg
添加剂浓度/(mg/L)	盐酸吡啶黄素	13.3 mg	25 mg	10 mg	20 mg
	茶啶酮酸	22.2 mg	20 mg	12.5 mg	25 mg

表 2 单增李斯特菌和干扰菌在不同增菌液的生长情况
Table 2 Growth of *Listeria monocytogenes* and interfering strains in different enrichment media

指示菌	稀释度	菌量/ (CFU/mL)	GB 增菌方法						ISO 11290-1-2017 增菌方法							
			培养基	TSA 平板			李显平板			培养基	TSA 平板			李显平板		
				管 1	管 2	管 3	管 1	管 2	管 3		管 1	管 2	管 3	管 1	管 2	管 3
单增标准株	10 ⁻⁵	630	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	+	+	+	+	+	+
			LB ₂	+#	+#	+#	+#	+#	+#	F	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁶	60	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	+	+	-	+	+	+
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	4	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	+#	+#	-*	+#	+#	+#
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	+	+	+	+	+	+
单增标准株	10 ⁻⁸	<10	LB ₁	-	-	-	-	-	-	1/2F	-	-	-	-	-	+
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-
单增分离株	10 ⁻⁵	520	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	+	+	+	+	+	+
			LB ₂	+	+	+	+	+	+	F	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁶	70	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	+	+	+	+	+	+
			LB ₂	+	+	+	+	+	+	F	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻⁷	12	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	+	+	+	+	+	+
			LB ₂	+	+	+	+	+	+	F	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁸	4	LB ₁	-	-	-	-	-	-	1/2F	+	+	+	+	+	+	
		LB ₂	+	-	-	+	-	-	F	+	+	+	+	+	+	
大肠埃希菌	10 ⁻⁵	530	LB ₁	-	-	-	-	-	-	1/2F	-	-	-	-	-	-
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	+	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	60	LB ₁	-	-	-	-	-	-	1/2F	-	-	-	-	-	-
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	10 ⁻⁵	84	LB ₁	+	+	+	+	+	+	1/2F	-	-	-	-	-	-
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	11	LB ₁	+	+	-	+	+	-	1/2F	-	-	-	-	-	-
			LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	+

注: +为有菌生长, -为无菌生长, *为只在一区生长, #为只在一区少量生长, F 是 Fraser, 1/2F 是 Half Fraser。李斯特氏菌显色培养基, 李显平板。

3.2 添加干扰菌对目标菌生长情况的影响

添加干扰菌(大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌)后对单增李斯特菌增菌检出效果的影响, 结果见表 3。添加单增李斯特菌/混合干扰菌比例达到 1/2 和 1/20 时, 1/2 Fraser 和 Fraser、LB₁ 抗干扰性高于 LB₂。特别是当单增李斯特菌/混合干扰菌比例达到 1/20 时, 李斯特显色培养基上目标菌不生长, 说明杂菌量较多, LB₂ 无法抑制杂菌的生长, 导致杂菌和目标菌成竞争生长, 影响目标菌分离。

3.3 4 种增菌液培养基成分比较

通过对比 4 种增菌液培养基成分发现, 主要成分基本一致, 不同是 Fraser 和 Half-Fraser 添加了氯化锂和柠檬酸铁铵。主要使用的选择性添加剂是萘啶酮酸和吡啶黄, 它们浓度不一样, LB₁ 和 LB₂ 中添加剂萘啶酮酸浓度相差不大, 而 LB₂ 的吡啶黄加入浓度较高, Half Fraser 添加剂浓度相对较低, Half Fraser 中添加剂的浓度是 Fraser 中的一半。

4 结 论

由于在致病菌的分离过程中常因检验样品杂菌量大而目标菌量少而影响目标菌的分离, 在干粉培养基中加入选择性添加剂主要是为了抑制除目标菌以外的细菌生长, 而如果添加剂过量也会抑制目标菌的生长^[9]。比较 4 种增菌液发现, 干粉培养基组分相差不大, 不同的是 Fraser 和 Half-Fraser 添加了氯化锂和柠檬酸铁铵。主要使用的选择

性添加剂是萘啶酮酸和盐酸吡啶黄素, 添加剂浓度不一样。选择性添加剂浓度过高会抑制李斯特菌的生长, 通过选择合适的选择性添加剂及改变添加剂的浓度可以提高检出率^[10,11]。

通过此次实验发现, 在添加菌量浓度达到 10³ 数量级时, 4 种增菌液效果无差异, 当低于 10³ 数量级时, LB₂ 增菌效果较差, 这可能与 LB₂ 肉汤选择性添加剂浓度过高有关, 抑制了目标菌的生长。当添加菌量低于 10² 数量级时, 1/2 Fraser 和 Fraser 增菌效果最佳。在添加不同浓度的干扰菌时, 4 种增菌液均能较好的抑制大肠埃希氏菌的生长, 除 LB₁ 外其他 3 种增菌液能抑制金黄色葡萄球菌的生长, 选择性添加剂盐酸吡啶黄素和氯化锂能抑制部分革兰氏阳性菌生长, 这可能与 LB₁ 选择性添加剂浓度有关。当干扰菌量大于目标菌量时, LB₂ 抗干扰性较弱, 李斯特显色培养基生长少量目标菌, 因杂菌量较多时, 与目标菌成竞争生长关系, 从而影响目标菌分离^[12,13]。

综合以上分析, 由于配方成分和选择性添加剂浓度不太一样, 不同增菌液对目标菌的增菌效果、抗干扰性存在差异。在单增李斯特菌检验过程中, Fraser 肉汤增菌效果及抗干扰性优于 LB 肉汤。食品种类多样, 基质复杂, 增菌后杂菌多目标菌少, 而且单增李斯特菌易受加工影响而使菌体处于损伤状态, 要准确的检出 Lm 就要将受损的菌体进行有效的修复, 国标法和 ISO 法都采用二次增菌法, 有利于菌体修复、相互补充, 提高食品检出率^[14,15]。

表 3 不同增菌液抗干扰性比较
Table 3 Comparison of anti-interference of different enrichment medium

指示菌	培养基	GB 增菌方法						ISO 增菌方法						
		TSA 平板			李显平板			TSA 平板			李显平板			
		管 1	管 2	管 3	管 1	管 2	管 3	管 1	管 2	管 3	管 1	管 2	管 3	
1/2 单增李斯特菌/混合干扰菌	LB ₁	+	+	+	+/+	+/+	+/+	1/2F	+	+	+	+/+	+/+	+/+
	LB ₂	-	#	-	-	+/+#	+/+#	F	+	+	+	+/+	+/+	+/+
1/20 单增李斯特菌/混合干扰菌	LB ₁	+	+	+	+/+	+/+	+/+	1/2F	*	*	*	+/+*	+/+*	+/+*
	LB ₂	-	-	-	-	-	-	F	+	+	+	+/+	+/+	+/+

注: +为有菌生长, -为无菌生长, *为只在一区生长, #为只在一区少量生长, +/为有单增李斯特菌生长。F 是 Fraser, 1/2F 是 Half Fraser。李斯特氏菌显色培养基是李显平板。

参考文献

[1] Food and Agriculture Organization of the United Nations and world Health Organization. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods-technical report, in microbiological risk assessment series, No 52004 [R]. Rome: FAO/WHO, 2004: 1-60.
[2] Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveldel M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the

rise [J]. Interdiscip Persp Inf Dise, 2010, 11(5): 142-168.
[3] 陶文靖. 国内外李斯特菌检测及其快检技术的发展[J]. 食品安全导刊, 2015, (16): 67-69.
Tao WJ. Development of *Listeria* detection and rapid detection technology at home, abroad [J]. Chin Food Saf Magaz, 2015, (16): 67-69.
[4] 傅宜方, 梁春霞, 卢国钧, 等. 前增菌培养方法对热损伤单增李斯特菌复苏效果观察及应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, (5): 777-779, 794.

- Fu YF, Liang CX, Lu GJ, *et al.* Observing effect on resuscitating heat-injured *Listeria monocytogenes* by prebreeding method [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2008, (5): 777-779, 794.
- [5] 吴瑞英, 黄宝明, 梁均和. 单增李斯特菌选择性增菌培养分离的初步探讨[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, (5): 854-855.
- Wu RY, Huang BM, Liang JH. Isolation and cultivation of *Listeria* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, (5): 854-855.
- [6] Office international des epizooties *Listeria monocytogenes* [Z].
- [7] GB 4789.30-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单增李斯特菌检验[S].
- GB 4789.30-2016 National food safety standard-Food microbiology test of *Listeria monocytogenes* [S].
- [8] ISO 11290-1-2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -Part 1: Detection method [S].
- [9] 陶文靖. 李斯特菌检验及快检技术[J]. *质量与认证*, 2015, (6): 66-68, 71.
- Tao WJ. *Listeria* rapid test and inspection technology [J]. *China Qual Certif*, 2015, (6): 66-68, 71.
- [10] 朱敏, 梅玲玲, 程苏云. 改良李斯特菌增菌液的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, (2): 293-295.
- Zhu M, Mei LL, Cheng SY. An improved formula to increase concentration of *Listeria monocytogenes* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, (2): 293-295.
- [11] 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[J]. *食品科学*, 2003, (10): 131-135.
- Lu HM, Zhang YM. Effect of selective enrichment solution on *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Sci*, 2003, (10): 131-135.
- [12] Gnanou BN, Audinet N, Kérouanton A, *et al.* Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 104(2): 1-6.
- [13] 胡朋, 王磊, 何艳玲. 4 种含七叶苷培养基对单增李斯特菌检测效果的比较研究[J]. *检验检疫学刊*, 2017, 27(5): 12-15.
- Hu P, Wang L, He YL. Comparative study on the effect of four kinds of aescin-containing cultures on the detection of *Listeria monocytogenes* [J]. *J Insp Quar*, 2017, 27(5): 12-15.
- [14] 胡杨峰, 韩军, 贾英民. 选择性增菌液对单核增生性李斯特氏菌检出效果的比较[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1987-1991.
- Hu YF, Hang J, Jia YM. Compare of selectivity enrichment broth for detectable effect of *Listeria monocytogenes* [J]. *Microbiol Chin*, 2008, 35(12): 1987-1991.
- [15] 周阳, 祝长青, 郭云昌, 等. 不同食品基质中单核细胞增生李斯特氏菌核酸提取方法的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(11): 1205-1211.
- Zhou Y, Zhu CQ, Guo YC, *et al.* Comparasive study of nucleic acid extraction method of *L. monocytogenes* in the different kinds of food matrix [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2013, 32(11): 1205-1211.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



苏嘉妮, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: 1343811472@qq.com