

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240229008

冷链即食食品生产加工环境中李斯特氏菌属 检测方法的建立与应用

石嵩¹, 陈万达¹, 武志超¹, 赵琳娜², 孟云³, 杨丹^{1*}

[1. 国贸食品科学研究院, 国家副食品质量监督检验中心, 北京 102209; 2. 北京奥博星生物技术有限责任公司, 北京 100193; 3. 梅里埃诊断产品(上海)有限公司, 上海 201315]

摘要: **目的** 建立可用于冷链即食食品生产加工环境中李斯特氏菌属的分离与检测方法, 对生产企业的环境进行监控。**方法** 本研究结合美国食品药品监督管理局-细菌学分析手册(Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, FDA-BAM)单增李斯特氏菌检测方法, 通过制备冻干定量菌球模拟增菌实验, 对增菌液中萘啶酮酸和吡啶黄素的添加时间、头孢曲松钠的添加浓度进行研究, 确定最佳增菌方式和头孢曲松钠浓度, 并将其应用到实际冷链即食食品生产企业环境中李斯特氏菌属的分离检测中。**结果** 3种李斯特氏菌属和背景菌的冻干菌球的浓度分别为120 CFU/球和1100 CFU/球。通过模拟增菌实验, 延后4 h使用添加剂, 可使李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌的检出率均提高10%, 在此基础上头孢曲松钠添加量在6~8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌的检出率均为100%。**结论** 该方法可提高李斯特氏菌属的检出率。为冷链即食食品生产企业的环境监控提供了技术保障。

关键词: 李斯特氏菌属; 冷链即食食品; 环境监控

Establishment and application of a detection method for *Listeria* spp. in the production and processing environment of cold chain ready-to-eat food

SHI Song¹, CHEN Wan-Da¹, WU Zhi-Chao¹, ZHAO Lin-Na², MENG Yun³, YANG Dan^{1*}

[1. Guomao Food Science Research Institute, National Center for Food Quality Supervision and Inspection, Beijing 102209, China; 2. Beijing Aobo Xing Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100193, China; 3. BioMérieux (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201315, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the isolation and detection of *Listeria* spp in the production and processing environment of cold chain ready-to-eat food, and to monitor the environment of production enterprises. **Methods** This study combined the national standard method and the Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM) for the detection of *Listeria monocytogenes*. The addition time of nalidixone acid and acriflavin and the concentration of ceftriaxone sodium in the bacteria growth solution were studied through the preparation of freeze-dried quantitative bacteria pellet simulation experiment. The optimal bacteria growth method and concentration of ceftriaxone sodium were determined and applied to the separation and detection of *Listeria* in the actual cold chain ready-to-eat food production enterprise. **Results** The concentrations of lyophilized *Listeria* and background bacteria were 120 CFU/ ball and 1100 CFU/ ball, respectively. According to the simulated proliferation experiment, the

*通信作者: 杨丹, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全及相关科研和管理工作。E-mail: yang_dan@cofco.com

*Corresponding author: YANG Dan, Senior Engineer, Guomao Food Science Research Institute, National Center for Food Quality Supervision and Inspection, Road 4, South District, Future Science City, Beiqijia Town, Changping District, Beijing 102209, China. E-mail: yang_dan@cofco.com

detection rates of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* were increased by 10% after the application of the additive for 4 h. On this basis, when the dosage of ceftriaxone sodium was 6–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the detection rates of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* were 100%. **Conclusion** This method can improve the detection rate of *Listeria*. It provides technical support for environmental monitoring of cold chain ready-to-eat food production enterprises

KEY WORDS: *Listeria* spp.; cold chain ready-to-eat food; environmental monitoring

0 引言

即食食品通常无需额外的加工处理, 打开包装即可以直接食用^[1]。随着经济发展, 人们消费方式发生改变, 即食食品种类不断丰富, 其中冷链即食食品因其口味鲜美, 且营养成分得以充分保留, 在市场中深受消费者的喜爱^[2]。冷链即食食品生产过程必须确保食品在 $\leq 8^\circ\text{C}$ 的条件下进行加工、贮存、运输和销售, 所以其加工过程中会使用大量的水, 生产加工环境常处于低温高湿条件, 而这种环境有利于李斯特氏菌属产生及其生物膜的形成^[3]。

李斯特氏菌属是革兰氏阳性细菌^[4], 广泛存在于自然环境、各类食品中, 对恶劣环境具有较强抵抗力^[5-6], 具有嗜冷、嗜盐性^[7], 可污染食品加工、运输、储存等多个环节^[8]。其中单增李斯特氏菌是引起李斯特氏菌病的唯一病原菌^[9], 病死率高达 20%~30%^[10]。有研究表明李斯特氏菌病的暴发和散发病例主要与即食食品有关^[11]。我国福建省 2011–2021 年即食食品的单增李斯特氏菌污染, 以寿司、凉拌菜制品为主^[12], CHEN 等^[13]对我国 21 个省份中, 部分即食食品的致病菌检测后发现, 其中单增李斯特氏菌检出率高达 10.8%, 可见单增李斯特氏菌的污染风险依然较高。而食品生产企业或政府机构仅重视最终产品的检测, 是无法从根上杜绝即食食品中单增李斯特氏菌的污染风险, 应从生产过程中就做好监测与防控。

生产企业作为安全防控主体, 需要通过有效的环境监测程序来杜绝或降低即食食品中李斯特氏菌属的污染。环境监测程序不仅要单增李斯特氏菌进行监测, 还应使用李斯特氏菌属作为指示菌^[14]。行之有效的环境检测方法是保障环境监测程序有效实施的重要技术保障^[15-16], 目前国内及国际上主要是针对单增李斯特氏菌的检测, 缺少针对李斯特氏菌属的分离及检测方法。当前我国已制定了食品中单增李斯特氏菌的检测方法, 而缺少生产环境中的李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌的检测方法。鉴于此, 本研究结合美国食品药品监督管理局-细菌学分析手册(Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, FDA-BAM)检测方法, 从预增菌方式 1%吡啶黄素、1%萘啶酮酸的添加时机、增菌液中添加头孢菌素及其浓度进行了研究, 并应用于某冷链即食食品厂的环境监测, 验证该方法的有效性。对企业生产环境中李斯特氏菌的监测具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC 6538)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides* ATCC10206)、蜡样芽胞杆菌(*B. cereus* ATCC 11778)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* ATCC 27853)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis* ATCC 12228)、粪肠球菌(*E. faecalis* ATCC 29212)、头状葡萄球菌(*S. capitissubsp* ATCC 35661)、恶臭假单胞菌(*P. putida* ATCC 49128)、荧光假单胞菌(*P. Fluorescens* ATCC 13525)、枯草芽胞杆菌(*B. subtilis* ATCC 6633)、斯氏李斯特氏菌(*L. seeligeri* ATCC 35967)、英诺克李斯特氏菌(*L. innocua* ATCC 33090)、单增李斯特氏菌(*L. monocytogenes* ATCC 19111)均购于美国菌种保藏中心。

1.2 实验试剂、仪器与设备

胰蛋白胨大豆琼脂、脱脂乳粉、李氏增菌(*Listeria* enrichment broth base, LB)肉汤、血琼脂平板、1%吡啶黄素、1%萘啶酮酸、0.85%无菌生理盐水(北京陆桥技术股份有限公司); 李斯特显色培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司); 头孢曲松钠(上海罗氏制药有限公司); *Listeria* 李斯特氏菌鉴定条、革兰氏阴性菌鉴定卡、芽孢菌鉴定卡、革兰氏阳性菌鉴定卡[梅里埃(上海)生物制品有限公司]; 中和肉汤采样棉刷[纽勤生物科技(上海)有限公司]; 蔗糖(纯度 99.9%, 国药控股北京有限公司)。

PiloFD8 冷冻干燥机[金西盟(北京)仪器有限公司]; A2 生物安全柜(美国 LABCONCO 公司); ICP600 恒温培养箱(德国 Memmert 公司); Compact 2VITEK 微生物鉴定系统[梅里埃(上海)生物制品有限公司]; SQ810C 高压蒸汽灭菌器[雅马拓科技贸易(上海)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株鉴定

将标准菌株接种于胰蛋白胨大豆琼脂 36 $^\circ\text{C}$, 培养 24 h 后。使用生化鉴定仪对菌株进行鉴定, 确保菌株无生化变异等现象。

1.3.2 定量菌球制备

本研究通过人为添加和逐级稀释的方法, 还原生产环境中背景菌种类及李斯特氏菌属的含菌量, 并通过预冻的方式, 形成冰晶对菌体的细胞壁造成损伤, 将预冻后

的菌液进行冷冻干燥, 该方式将菌体处于缺氧及低水分环境下, 以上过程模拟了真实生产环境中细菌的亚损伤状态。

(1) 背景菌球制备

将所有非李斯特氏菌属的 10 种背景菌制成 0.5 麦氏浊度(浓度约为 1.0×10^8 CFU)的菌悬液, 每株取 100 μ L 混合成 1 mL 的背景菌混合液, 使用 0.85% 的无菌生理盐水逐级稀释至 10^4 CFU/mL, 将 12% 的脱脂乳粉及 12% 的蔗糖溶于水中, 110°C 中高温高压 5 min 灭菌后, 制成冻干保护剂, 将预期浓度的菌悬液冻干保护剂进行混合, 制成冻干菌悬液, 将冻干菌悬液分装至西林瓶内, 将西林瓶置于冻干机内在 -50°C 下进行预冻约 4 h, 预冻后在 -35°C 下冷冻干燥 18 h, 于 15°C 下进行解析干燥约 4 h, 完成冷冻干燥。冻干结束后, 在冻干仓内压盖, 此时瓶内处于真空状态。制成的菌球预期浓度约为 (10^3 CFU/球)。随机抽取 10 颗菌球, 溶于 10 mL 无菌生理盐水中, 参考 GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》菌落总数方法, 依据 CNAS-CL03-A001:2019《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》中附录 C1 的要求, 进行均匀性检测, 使用单因素方差分析验证其均匀性。

(2) 李斯特氏菌属菌球制备

将 3 种李斯特氏菌, 分别按照背景菌球制备的方法制备成仅含有一种李斯特氏菌的冻干菌球, 预期浓度约为 (10^2 CFU/球) 随机抽取 10 颗菌球, 溶于 2 mL 无菌生理盐水中, 参考 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》(第二法), 进行均匀性检测, 使用单因素方差分析验证其均匀性。

1.3.3 预增菌方式的研究

本研究参考使用 GB 4789.30—2016 中的培养基和鉴定方法, FDA-BAM 第 10 章^[7]中的增菌方式, 通过延后使用增菌液添加剂的时间, 验证对环境中李斯特氏菌属的检出率的影响。

实验共分为两组, 第一组使用含有 1% 萘啶酮酸 0.5 mL 及 1% 吡啶黄素 0.3 mL 的 LB 李氏增菌肉汤肉汤(LB₁) 222 mL, 同时加入背景菌球 1 颗, 并将李斯特氏菌属菌球分别溶解至 10 mL 的无菌生理盐水中涡旋混匀后各取 1 mL 加入至 LB₁ 肉汤中, 李斯特氏菌属与背景菌的比例约为 1:100, 后按照 GB 4789.30—2016 进行检测和鉴定, 共制备 10 份样本。第二组首先使用无添加剂的 LB₁ 增菌液, 按照第一组的方式添加菌株, 于 (30 ± 1) $^\circ\text{C}$ 下培养 4 h 后, 再加入两种添加剂后继续培养 20 h, 后续检测方法及样本数量同第一组。通过统计各组样品中李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌的检出率, 评估预增菌方式的优劣。

1.3.4 抗生素添加浓度的研究

本研究共设立 5 种头孢曲松钠质量浓度, 分别为 2、4、

6、8 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。首先将注射用头孢曲松钠按说明书配制成为 1 mg/mL 的原液, 后使用不含有添加剂的 LB 肉汤基础稀释至预期浓度。按照 1.3.3 中第二组的操作方式进行菌株的添加及后续检测, 每个浓度共制备 10 份样本。通过统计各组样品中李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌的检出率, 选择最适宜的头孢曲松添加浓度。

1.3.5 预增菌方式与抗生素添加的实际应用

通过上述实验结果, 选定模拟环境中李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌检出率最高的组合, 应用至本市某即食冷链食品生产企业中, 对其热加工区、降温区、搅拌区、切配区及包装区的食品接触表面及非食品接触表面进行样本采集。通过对相同区域近 12 个月的环境监测数据进行对比, 验证本研究的检测方法, 可提高食品生产企业的环境监控的有效性。

1.4 数据处理

用 EXCEL 2019 软件, 对均匀性检测数据进行统计分析和制表, 将测试数据转换为以 10 为底的对数值后, 进行单因子方差分析, 显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

考核所用菌株制备前经过 VITEK compact 2 及 API 鉴定后, 未发生菌株变异现象, 鉴定结果准确, 可用于能力验证样品的制备。

2.2 定量菌球的均匀性检测结果

2.2.1 背景菌球的均匀性检测结果

随机抽取 10 颗菌球, 溶于 10 mL 无菌生理盐水中, 使用菌落总数方法重复测定两次, 结果取对数后, 经过单因素方差分析, F 值为 $2.08 < F_{0.05}(1,12)$ 3.02, 平均值约为 1100 CFU/球。表明背景菌球间含菌量无显著性差异, 是均匀的。检测结果见表 1。

2.2.2 李斯特氏菌属菌球均匀性检测结果

随机抽取 3 种李斯特氏菌冻干菌球, 每种 10 颗, 溶于 2 mL 无菌生理盐水中, 涂布于李斯特氏菌显色培养基上, 培养后计数。结果取对数后, 进行单因素方差分析, 经统计分析英诺克李斯特氏菌球的 F 值为 1.13, 平均值约为 120 CFU/球; 斯氏李斯特氏菌球的 F 值为 1.25, 平均值约为 120 CFU/球; 单增李斯特氏菌的 F 值为 1.43, 平均值约为 120 CFU/球, 且均小于临界值 $F_{0.05}(1,12)$ 3.02, 表明各菌球间含菌量无显著性差异, 是均匀的。检测结果见表 2~4。通过均匀性检测结果可见, 采用冷冻干燥制备冻干菌球的方式, 证实了所制备的菌球具有良好的均一性, 在后续实验过程中, 其含菌浓度一致, 验证结果具有良好的可重复性。

表 1 背景菌均匀性测定结果
Table 1 Determination results of background bacterial uniformity

编号	背景菌/(CFU/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果 1	114	117	113	95	103	97	105	106	112	99
结果 2	105	103	115	97	105	105	95	100	106	107
结果 1 对数值	2.06	2.07	2.05	1.98	2.01	1.99	2.02	2.03	2.05	2.00
结果 2 对数值	2.02	2.01	2.06	1.99	2.02	2.02	1.98	2.00	2.03	2.03
自由度	组间	9	MS	组间	0.001037	F 值	2.08	平均值	1100 CFU/球	
	组内	10		组内	0.000499					

注: MS 为均方差。

表 2 英诺克李斯特氏菌均匀性测定结果
Table 2 Results of uniformity determination of *Listeria inokii*

菌株名称 编号	英诺克李斯特氏菌/(CFU/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果 1	52	57	61	62	57	60	54	60	61	53
结果 2	57	62	58	60	62	62	60	59	59	59
结果 1 对数值	1.72	1.76	1.79	1.79	1.76	1.78	1.73	1.78	1.79	1.72
结果 2 对数值	1.76	1.79	1.76	1.78	1.79	1.79	1.78	1.77	1.77	1.77
自由度	组间	9	MS	组间	0.000547	F 值	1.13	平均值	120 CFU/球	
	组内	10		组内	0.000483					

表 3 斯氏李斯特氏菌均匀性测定结果
Table 3 Results of uniformity determination of *Listeria sterna*

菌株名称 编号	斯氏李斯特氏菌/(CFU/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果 1	65	57	65	57	60	55	61	57	57	65
结果 2	60	59	62	59	63	62	55	62	54	60
结果 1 对数值	1.81	1.76	1.81	1.76	1.78	1.74	1.79	1.76	1.76	1.81
结果 2 对数值	1.78	1.77	1.79	1.77	1.80	1.79	1.74	1.79	1.73	1.78
自由度	组间	9	MS	组间	0.000624	F 值	1.25	平均值	120 CFU/球	
	组内	10		组内	0.0005					

表 4 单增李斯特氏菌均匀性测定结果
Table 4 Results of uniformity determination of *Listeria monocytogenes*

菌株名称 编号	单增李斯特氏菌/(CFU/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果 1	62	65	55	62	59	61	57	63	54	60
结果 2	61	61	57	61	62	59	65	59	59	62
结果 1 对数值	1.79	1.81	1.74	1.79	1.77	1.79	1.76	1.80	1.73	1.78
结果 2 对数值	1.79	1.79	1.76	1.79	1.79	1.77	1.81	1.77	1.77	1.79
自由度	组间	9	MS	组间	0.000537	F 值	1.43	平均值	120 CFU/球	
	组内	10		组内	0.000376					

2.3 预增菌方式研究的结果

对预增菌液中添加剂(1%茶啶酮酸 0.5 mL 及 1%吡啶黄素 0.3 mL)的正常加入与延后使用的检出率进行比较, 经统计第一组正常使用添加剂组的 10 份样品中, 李斯特氏菌属的检出率为 70%, 单增李斯特氏菌的检出率为 40%;

第二组延后加入添加剂组的 10 份样品中李斯特氏菌属的检出率为 80%, 单增李斯特氏菌的检出率为 50%, 结果见表 5。通过结果分析表明, 推迟加入添加剂的时间, 对环境中受伤菌株充分的复苏是有必要的, 通过充分的复苏可提高李斯特氏菌的检出率。

表 5 不同预增菌方法李斯特氏菌属与单增李斯特氏菌检出率
Table 5 Results of detection rate of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* different pregrowth methods

样品号	第一组正常使用添加剂		第二组延后使用添加剂	
	李斯特氏菌属	单增李斯特氏菌	李斯特氏菌属	单增李斯特氏菌
1	+	-	+	-
2	+	+	+	+
3	+	+	+	-
4	-	-	+	+
5	+	-	+	-
6	+	+	-	-
7	-	-	+	+
8	+	+	+	+
9	+	-	-	-
10	-	-	+	+
检出率/%	70	40	80	50

注: +为检出; -未检出, 下同。

2.4 抗生素添加浓度的研究结果

通过对 5 种头孢曲松钠添加浓度中李斯特氏菌属与

单增李斯特氏菌的检出率进行统计, 头孢曲松钠添加量在 6~8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 李斯特氏菌属及单增李斯特氏菌的检出率均为 100%。结果见表 6。通过结果表明, 利用李斯特氏菌对头孢菌素的天然耐药性, 在增菌液中加入头孢曲松, 对其他杂菌的抑制程度进一步增强, 使得李斯特氏菌属可以充分的利用培养基中的营养, 进行生长繁殖, 来提高李斯特氏菌属的检出率。

2.5 实际应用结果

通过实验室模拟检测数据, 选定延后 4 h 使用添加剂并加入 6 $\mu\text{g/mL}$ 的头孢曲松钠, 于增菌液中对本市某即食冷链食品生产企业的生产加工环境进行检测。结果表明各区域均未检出单增李斯特氏菌, 但在热加工区和降温区检出李斯特氏菌属的检出率为 2%和 3.77%, 搅拌区、切配区及包装区检出率为 0%, 总检出率为 1.14%。对比工厂的近 12 个月的历史监测数据总检出率为 0.06%, 可提高李斯特氏菌的检出率, 结果见表 7。通过对比历史检测数据及本方法的检出率对比分析表明, 本方法可提高不同生产区域中李斯特氏菌的检出率。

表 6 不同头孢曲松浓度李斯特氏菌属与单增李斯特氏菌检出率
Table 6 Results of detection rate of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* different ceftriaxone concentrations

头孢曲松质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$		样品号										检出率/%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	李斯特氏菌属	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	90
	单增李斯特氏菌	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	70
4	李斯特氏菌属	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	单增李斯特氏菌	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	80
6	李斯特氏菌属	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	单增李斯特氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
8	李斯特氏菌属	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	单增李斯特氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
10	李斯特氏菌属	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
	单增李斯特氏菌	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90

表 7 历史数据统计与总检出率比较
Table 7 Comparison of historical data statistics and total detection rate

	热加工区/%	降温区/%	搅拌区/%	切配区/%	包装区/%	检出率/%
1月	0	0	0	0	0	0
2月	0	0	0	0	0	0
3月	0	0	0	0	0	0
4月	0	0	0	0	0	0
5月	0	1.82	0	0	0	0.38
6月	0	0	0	0	0	0
7月	0	0	0	2	0	0.38
8月	0	0	0	0	0	0
9月	0	0	0	0	0	0
10月	0	0	0	0	0	0
11月	0	0	0	0	0	0
12月	0	0	0	0	0	0
	12个月总检出率					0.06
本次	2	3.77	0	0	0	1.14

注: 以上数据均为李斯特氏菌属检出, 无单增李斯特氏菌检出。

3 讨 论

当前我国尚未制定生产环境中李斯特氏菌属的检测方法,大多数企业均参考 GB 4789.30—2016 (第一法)进行检验,但生产环境样本和食品样本存在差异,采用相同的增菌方法,会影响到检测结果的准确性。美国 FDA-BAM 第 10 章中有关于生产环境中李斯特氏菌属的样品采集和检测方法的描述,使用的培养基及培养方式与国标方法差异较大,由于美国生产企业使用的消毒剂和环境背景菌不同于我国的生产企业,所以不能完全照搬美国 FDA-BAM 中的检测方法。针对上述问题,本研究对样品的增菌方式和增菌液中抗生素的种类和浓度进行了研究,建立了基于我国冷链即食食品生产加工环境中李斯特氏菌属的检测方法,并应用于生产企业中的环境监控中。

李斯特氏菌虽然在自然界中广泛存在,但生产环境中含量低^[18],并且食品生产加工环节中会使用到大量的含氯消毒剂或季铵盐类消毒剂,受到消毒剂的影响,常处于亚致死状态,不利于后续检验^[19]。国标中采用 LB₁、LB₂ 进行两次增菌,培养时间均为 24 h,而且在 LB₁ 和 LB₂ 中都添加了萘啶酮酸和吡啶黄用来抑制背景菌。在初次增菌时环境中李斯特氏菌菌株处于受伤状态,如果采用国标中的增菌方式,会不利于菌体复苏^[20],导致李斯特氏菌检出率降低。本研究通过推迟加入添加剂的时间和缩短初次增菌的时间,即 LB₁ 增菌液(30±1)°C 下培养 4 h 后,再加入两种添加剂后继续培养 20 h,给受伤菌株充分的复苏时间,明显提高了李斯特氏菌的检出率。

冷链即食食品生产环境并不属于无菌环境,生产环境长期处于低温状态,李斯特氏菌是作为嗜冷菌仍可生长繁殖^[21],同时原料中含有大量的芽孢菌^[22]、假单胞菌及各类革兰氏阳性菌。LB₁、LB₂ 肉汤中含有的萘啶酮酸,对革兰氏阴性杆菌的抑制生长能力明显^[23],吡啶黄对蜡芽孢杆菌有较强的抑制性^[24-25]。但革兰氏阳性菌及部分假单胞菌仍可大量快速繁殖抑制李斯特氏菌的生长。头孢曲松是第三代头孢类抗生素^[26],能够对革兰氏阳性菌和阴性菌均有显著的抗菌活性,但因头孢菌素不能与李斯特氏菌细胞膜上的青霉素结合蛋白-3,进行结合,故李斯特氏菌对头孢菌素天然耐药^[27]。本研究利用李斯特氏菌对头孢菌素的天然耐药性,将头孢曲松加入到增菌液中来提高环境中李斯特氏菌的检出率,结果显示 6、8 μg/mL 的头孢菌素能明显提高单增李斯特氏菌的检出率。但英诺克李斯特氏菌在增菌液内会大量繁殖,产生抑制物质^[28-29],当检测样品中以英诺克李斯特氏菌为主的占比较高时,该物质会抑制单增李斯特氏菌繁殖生长,后续仍应继续探究相关方法以提高单增李斯特氏菌的检出率。

目前,对于微生物实验室检验方法的建立,多采用自

行制备的新鲜菌悬液来进行验证活动,菌液的均匀性和重复性是影响方法验证结果的重要因素^[30-31],新鲜菌悬液对实验人员工作经验和操作技术要求较高,是方法验证实验操作的难点和关键点。定量冷冻干燥菌球的使用,因其操作方便、计数准确、重复性好,越来越被微生物实验室所关注。本研究采用冷冻干燥的方式,通过冻干型菌悬液的生长能力与新鲜型菌悬液存在差异^[32]模拟了真实生产环境中细菌的亚损伤状态,又通过均匀性检测验证其准确性,保证了方法验证的可靠性。

4 结 论

综上所述,本研究通过模拟实验,改变预增菌的添加剂加入时机,可使李斯特氏菌属检出率均提高 10%,还增加使用了适宜浓度的头孢曲松作为环境菌抑制剂,将其检出率提高至 100%,应用于某冷链即食食品厂的环境监测,可提高李斯特氏菌属的检出率。该方法可应用于冷链即食食品生产企业中李斯特氏菌属的环境监控,为生产企业的环境监控提供了技术保障。填补了食品生产企业李斯特氏菌环境监控的技术空白,为相关部门的标准制修订提供了科学依据。

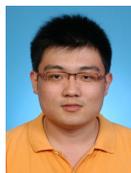
参考文献

- [1] MANTEGAZZA G, GARGARI G, DUNCAN R, *et al.* Ready-to-eat rocket salads as potential reservoir of bacteria for the human microbiome [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(1): e297022.
- [2] 姚春晓,宋波,吴素芳,等. HACCP 体系在冷链即食食品生产中的应用[J]. *食品工业*, 2021, 42(6): 342-346.
YAO CX, SONG B, WU SF, *et al.* Application of HACCP system in cold chain ready-to-eat food production [J]. *Food Ind*, 2021, 42(6): 342-346.
- [3] ABOU ER, ELSOHABY I, AL-MOHAMMADI AR, *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activities of probiotic *Lactobacillus plantarum* against *Listeria monocytogenes* isolated from milk, chicken and pregnant women [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1201201.
- [4] 杨炳辉. 食品中单增李斯特氏菌国内外控制要求有哪些[J]. *中国海关*, 2023, (3): 50-52.
YANG BH. What are the domestic and foreign control requirements for *Listeria monocytogenes* in food [J]. *China Customs*, 2023, (3): 50-52.
- [5] MUCHAAMBA F, STEPHAN R, TASARA T. *Listeria monocytogenes* cold shock proteins: Small proteins with a huge impact [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 1061.
- [6] AMAGLIANIG, BLASIG, SCUOTAS, *et al.* Detection and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains in ready-to-eat products [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2021, 18(9): 675-682.
- [7] FOGAÇ AM, BHUNIA AK, LOPES-LUZ L, *et al.* Antibody-and nucleic acid-based lateral flow immunoassay for *Listeria monocytogenes* detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(16): 4161-4180.
- [8] ROLHION N, COSSAR TP. How the study of *Listeria monocytogenes* has led to new concepts in biology [J]. *Future Microbiol*, 2017, 12(7): 621-638.
- [9] ALEGBELEYE OO, SINGLETONI, SANT'ANA AS. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review [J]. *Food Microbiol*, 2018, 73(8): 177-208

- [10] MOURA A, CRISCUOLO A, POUSEELE H, *et al.* Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes* [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 2(2): 16185–16194.
- [11] ARSLAN S, ÖZDEMİR F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria species* and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods [J/OL]. *FEMS Microbiol Letters*: 6. [2020-02-01]. DOI: 10.1093/femsle/fnaa006
- [12] 林慧琳, 叶玲清, 叶海梅, 等. 2011-2021 年福建省即食食品中单增李斯特菌的监测及菌株特征分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2023, 39(10): 941–950.
LIN HL, YE LQ, YE HM, *et al.* 2011-2021 in fujian province ready-to-use food increases the monitoring and analysis of characteristics of strains of *Listeria* [J]. *Chin J Zoonoses*, 2023, 39(10): 941–950.
- [13] CHEN Y, CHEN M, WANG J, *et al.* Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China [J/OL]. *Front Microbiol*: 642. [2020-04-15]. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00642
- [14] WIKTORCZYK-KAPISCHKE N, SKOWRON K, GRUDLEWSKA-BUDA K, *et al.* Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 710085.
- [15] LEE BH, COLE S, BADEL-BERCHOUXS, *et al.* Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10(1): 2698.
- [16] 宋艳梅, 夏忠悦, 骆敏, 等. 食品生产加工过程中环境微生物的监测与控制[J]. *食品安全导刊*, 2022, (24): 41–43.
SONG YM, XIA ZY, LUO M, *et al.* Monitoring and control of environmental microorganisms in food production and processing [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2022, (24): 41–43.
- [17] VÄLIMAA AL, TILSALA-TIMISJÄRVIA, VIRTANEN E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain: A review [J]. *Food Control*, 2015, 55: 103–114
- [18] 王乐, 陈佳, 秦丽. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌改良增菌液的研究[J]. *现代食品*, 2022, 28(9): 154–158.
WANG L, CHEN J, QIN L. Study on the improvement of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Mod Food*, 2022, 28(9): 154–158.
- [19] DAILEY RC, MARTIN KG, SMILEY RD. The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered *Listeria enrichment* broth [J]. *Food Microbiol*, 2014, 44: 173–179.
- [20] ZITZ U, UNABOVIC M, DOMIG KJ, *et al.* Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* [J]. *J Food Prot*, 2011, 74(8): 1282–1287.
- [21] 李海麟, 刘于飞, 张维蔚, 等. 广州市市售食品中单核细胞增生李斯特氏菌监测结果分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(7): 2711–2715.
LI HL, LIU YF, ZHANG WW, *et al.* Analysis of monitoring results of *Listeria monocytogenes* in foods sold in Guangzhou [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 12(7): 2711–2715.
- [22] 李轲, 李可, 赵运胜, 等. 即时食品蜡样芽孢杆菌快速检测标准曲线模型的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2022, 29(1): 59–64.
LI K, LI K, ZHAO YS, *et al.* Research on standard curve model for rapid detection of *Bacillus cereus* in point-of-care food [J]. *Cere Food Ind*, 2022, 29(1): 59–64.
- [23] 王晓英. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌检测分析[J]. *福建轻纺*, 2021, (12): 21–23, 26.
WANG XY. Detection and analysis of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Fujian Textile*, 2021, (12): 21–23, 26.
- [24] 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. Study on improving *Listeria growth* solution [J]. *Chin J Health Lab*, 2007, (2): 293–295.
- [25] 张昕, 汪琦, 张惠媛, 等. 检测致病性李斯特氏菌的培养基[J]. *检验检验科学*, 2008, (1): 76–79.
ZHANG X, WANG Q, ZHANG HY, *et al.* Culture medium for the detection of pathogenic *Listeria monocytogenes* [J]. *Sci Inspect Quarantine*, 2008, (1): 76–79.
- [26] GARNIER AS, DRABLIER G, BRIET M, *et al.* Nephrotoxicity of amoxicillin and third-generation cephalosporins: An updated review [J]. *Drug Saf*, 2023, 46(8): 715–724.
- [27] MAT O, GANKAM F, GOUBELLA A, *et al.* Forty years of peritoneal dialysis *Listeria peritonitis*: Case and review [J]. *Perit Dial Int*, 2021, 41(3): 337–340.
- [28] SCANLON LR, GABOR L, KHOURI OR, *et al.* Immunotherapy for ovarian cancer is improved by tumor targeted delivery of a neoantigen surrogate [J]. *Bio Rxiv*, 2023: n. pag. DOI: 10.1101/2023.10.11.561944
- [29] CORNU M, KALMOKOFF M, FLANDROIS JP. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths [J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 73(2-3): 261–274.
- [30] 任河山, 李景云, 王跃凤, 等. 铜绿假单胞菌定量冷冻干燥菌球与新鲜制备菌悬液用于胰酪大豆琼脂培养基适用性检查的研究[J]. *中国药事*, 2022, 36(12): 1397–1402.
REN HS, LI JY, WANG YF, *et al.* Study on the applicability of quantitative freeze-dried globules and freshly prepared bacterial suspension for pancreatic cheese soybean peptone agar medium [J]. *China Pharm Aff*, 2022, 36(12): 1397–1402.
- [31] 李趣婷, 张帆, 李文靖, 等. 商业定量菌株用于药品微生物计数法建立的可行性探讨[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(11): 2093–2097.
LI QC, ZHANG F, LI WJ, *et al.* Feasibility study of commercial quantitative strains for the establishment of microbial counting method for drugs [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 40(11): 2093–2097.
- [32] MORGAN CA, HERMAN N, WHITE PA, *et al.* Preservation of micro-organisms by drying: a review [J]. *J Microbiol Method*, 2006, 66(2): 183–193.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介



石 嵩, 兽医师, 主要研究方向为微生物检验及微生物领域能力验证样品研制。
E-mail: glisters@163.com



杨 丹, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全及相关科研和管理工作。
E-mail: yang_dan@cofco.com