

## 一种能同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的培养基

刘园园, 肖性龙, 余以刚, 陈谷, 李晓凤, 唐语谦, 吴晖\*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

**摘要** 【目的】设计制备一种能够同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌的复合增菌肉汤。【方法】挑选合适的添加剂进行单因素实验, 确定增菌肉汤的成分及配比, 采用平板计数法及三重荧光 PCR 技术验证肉汤的增菌效果。【结果】结果得到一种能同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌的选择性增菌肉汤(SSL), 经验证 SSL 可使得 3 种目标菌以相对一致的速度进行富集, 经过 37℃ 150 r/min 振荡培养 24 h 后, 菌体浓度到达  $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL, 非目标菌生长受到抑制。应用荧光 PCR 扩增样品, 可同时得到 3 种目标菌的扩增曲线。在 710 份实际样品检测中, 无假阳性及假阴性报告。【结论】研究结果表明, SSL 肉汤可用于沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌的共增菌, 可用于多重 PCR 检测的前增菌。

**关键词**: SSL 肉汤; 复合增菌培养液; 沙门氏菌; 金黄色葡萄球菌; 单增李斯特菌

**中图分类号**: Q93-3 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)10-1389-08

食源性致病菌是引起食源性疾病的主要因素之一, 在世界食品安全领域中备受关注。其中, 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及单增李斯特菌普遍存在于多种食物中, 是引起食品污染的重要因素<sup>[1-3]</sup>。我国和国标都规定, 以上 3 种致病菌是保证食品安全的必检项目<sup>[4]</sup>。

基于免疫学和分子生物学技术的快速发展, 耗时费力的传统检测方法逐渐被其所取代<sup>[5-6]</sup>。现今, 研究的趋势是在一个检测平台上同时检测多种致病菌, 例如多重 PCR 技术、DNA 微阵列等<sup>[7-8]</sup>, 以此缩短检测周期。然而运用这些方法时, 必须考虑到影响检测的三个重要因素: 第一, 食品是经过加工、深加工、冷冻、包装、储藏等过程得到的, 食品中的致病菌随着环境的改变, 会受到损伤, 活力下降。该情况下, 应用 PCR、基因芯片等分子生物学方法检

测时准确率下降, 为了防止带有致病菌食品的漏检, 食品在检测致病菌前需要进行增菌。第二, 现有分子生物学检测技术的检测限在  $10^2 \sim 10^4$  左右, 当食品受污染程度低时, 前期增菌必不可少。第三, 当存在较多的背景微生物时, PCR 等技术的检测准确性受到影响。目前的检测方法中, 不同致病菌有独立的检测方法, 需要分别进行增菌。因此得到一种能同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌的共增培养基, 对实现共检技术具有重要的意义。

国内外现有研究中, 涉及共增菌培养基技术的研究主要包括: 沙门氏菌和志贺氏菌共增技术<sup>[9]</sup>、沙门氏菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的共增技术(BSB)<sup>[10]</sup>、沙门氏菌、大肠杆菌及单增李斯特菌的共增技术(SEL)<sup>[11]</sup>、以及广谱增菌肉汤(UPB)等, 除 SEL 肉汤具备一定的选择性外, 其余均属于无选择

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-06-0746)

\* 通信作者。E-mail: fehwu@scut.edu.cn

作者简介: 刘园园(1984-), 女, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: liuyuan910@163.com

收稿日期: 2009-03-31; 修回日期: 2009-06-07

性增菌培养基,不能满足背景微生物多时对特定目标菌进行增菌的要求。迄今为止,未见关于沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌选择性共增菌技术的报道。

本文旨在研究一种能够同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌的选择性增菌培养基,并利用传统检测方法及荧光 PCR 技术验证其同时增菌的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) (CMCC 47731)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) (CMCC 34761) 及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (CMCC 41002) 为本实验室保藏菌株。出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic E. coli* O157:H7) (ADCPC931)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) (CMCC70331)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*) (SHCDC ye23)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*) (ADCPC239)、产气肠杆菌(*Enterobacter Aerogenes*) (CMCC70739)、福氏志贺氏(*Shigella flexneri*) (GZCDC 719)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (SZCIQ 62-1t)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (SHCDC pa11-k) 由深圳太太药业基因诊断部惠赠。所有菌株接种于营养琼脂斜面 4℃ 保存备用。

**1.1.2 试剂:**胰酪胨大豆肉汤(TSB)、氯化镁孔雀绿增菌液(RV)、7.5%氯化钠肉汤、Fraser 肉汤(FB)、亚硫酸铋琼脂(BS)、Baird-Parker 氏培养基、改良 Mc Bride 琼脂(MMA) 购于广东环凯微生物科技有限公司。胰酪胨、蛋白胨、葡萄糖、吡啶黄、萘啶铜酸、苯乙醇、氯化锂、亚碲酸钾、磷霉素、甘露醇、丙酮酸钠、七叶苷等购于青岛海博生物技术有限公司。

**1.1.3 主要仪器:**ABI 7500 荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)、生化培养箱、气浴摇床、pH 计、分光光度计(广州梓兴化玻仪器有限公司)。

**1.1.4 样品来源:**共 710 份样品,包括牛排 198 份,猪排 212 份,鸡肉 213 份,猪肠 87 份来源于深圳出入境检验检疫局及东莞出入境检验检疫局。用于人工污染的样品鸡肉及牛肉购于广州当地超市。

### 1.2 基础培养基的制备

称取胰酪胨 17 g、蛋白胨 3 g、氯化钠 15 g、磷酸二氢钠 2.5 g、葡萄糖 2.5 g 加入到 1000 mL 蒸馏水中,混匀,调节 pH 至 7.0~7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌

15 min 4℃ 下保存备用。

### 1.3 抑制剂及促进剂的筛选

考察的抑制剂及促进剂种类及用量见表 1。将 3 种目标菌分别在营养琼脂上传代 2 次,挑取典型单个菌落接种于营养肉汤,培养 5~6 h,用生理盐水梯度稀释,分别将约 10~100 CFU/mL 的目标菌接种至含有不同添加成分的肉汤中,以不含添加成分的基础培养基为空白对照,37℃ 150 r/min 振荡培养 24 h。根据菌悬液浓度适当稀释测其  $OD_{540}$ ,以确定添加成分的种类及含量,制备共增培养基(SSL)。

表 1 不同抑制剂及促进剂对 3 种目标菌生长的影响

Table 1 The impact of additives on the growth of the three target pathogens

Additive agents	Dosage	<i>S. enteritidis</i> (%) <sup>*</sup>	<i>S. aureus</i> (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
Lithium chloride(g/L)	4	2.83	8.15	52.39
	2	1.27	0.42	0.93
	1	0	0	2.66
Acriflavin(mg/L)	10	39.01	90.13	26.07
	5	19.93	89.84	13.28
	2.5	4.95	89.93	12.42
Nalidixic acid(mg/L)	20	8.53	55.53	33.13
	10	6.48	32.82	1.72
Phenyl ethano(mL/L)	5	1.24	13.38	0
	2.5	88.45	40.74	92.88
	1	89.90	22.23	92.75
Fosfomycin(mg/L)	20	92.42	91.40	92.76
	10	91.37	92.08	78.06
	5	91.54	90.04	62.03
Potassium tellurite (mg/L)	0.4	90.73	34.58	88.55
	0.2	53.27	31.76	6.57
	0.1	15.09	13.81	2.19
Sodium pyruvate(mg/L)	5	-44.96	-27.13	-35.87
	2.5	-37.58	-24.71	-29.15
Mannito(g/L)	5	0	-26.29	0
Esculin(g/L)	0.1	-0.27	0	-13.39

\* the percent means inhibition rate, which is  $100 \times (\text{growth in the base-medium with the additives} / \text{growth in the base-medium}) \times 100$ ; 0 means no obvious influence; negative number means that the additives have accelerating effect on the target pathogens.

### 1.4 SSL 的单菌增菌效果的验证

将 10~100 CFU/mL 的 *L. monocytogenes*、*S. enteritidis* 和 *S. aureus* 分别接种到 100 mL SSL 中,37℃ 150 r/min 振荡培养 36 h。同时将等量的目标菌分别接入各自的选择性增菌肉汤中(*S. enteritidis*: RV、*S. aureus*: 7.5% 氯化钠肉汤、*L. monocytogenes*: FB)。取 4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h、36 h 的培养物,分别用 BS、B-P 及 MMA 进行平板计数。重复试验 3 次,每次试验采用 2 个平行重复。

### 1.5 SSL的复合增菌效果的验证

按以下4种混合比例,将3种目标菌的混合物分别接种至100 mL SSL中(1)沙门氏菌:金葡菌:单增李斯特菌 = 1:1:1(100 CFU/mL);(2)沙门氏菌:金葡菌:单增李斯特菌 = 1:100:1000(10 ± 1 CFU/mL, 100 ± 10 CFU/mL, 1000 ± 100 CFU/mL);(3)沙门氏菌:金葡菌:单增李斯特菌 = 100:1000:1(100 ± 10 CFU/mL, 1000 ± 100 CFU/mL, 10 ± 1 CFU/mL);(4)沙门氏菌:金葡菌:单增李斯特菌 = 1000:1:100(1000 ± 100 CFU/mL, 10 ± 1 CFU/mL, 100 ± 10 CFU/mL)。37℃ 150r/min 振荡培养24 h,取6 h、12 h、14 h、18 h、20 h、22 h、24 h的培养物进行平板计数。将上述比例的目标菌接入到TSB中,取24 h的培养物进行平板计数对比。重复试验3次,每次试验采用2个平行重复。

### 1.6 SSL对非目标菌增菌效果的验证

将约10<sup>4</sup> CFU/mL的非目标菌分别接种至100 mL SSL及TSB中,37℃ 150 r/min 振荡培养36 h。取12 h、24 h、36 h的培养物测定其OD<sub>540</sub>,判断非目标菌的生长情况。此外将10<sup>2</sup> CFU/mL的3种目标菌及10<sup>4</sup> CFU/mL的非目标菌同时接入到SSL中,37℃ 150 r/min 振荡培养24 h目标菌各自的选择性培养基上进行平板计数,判断目标菌生长受影响状况。重复试验3次,每次试验采用2个平行重复。

表2 在三重荧光PCR中使用的TaqMan探针及核酸引物

Table 2 Oligonucleotide primers and TaqMan probes used in FQ-PCR

Pathogens	Target gene	Sequence (5'→3')	T <sub>m</sub> /℃	Product size/bp
<i>S. enteritidis</i>	invA	fw TTATCGAGATCGCCAATCAGTC	57.7	117
		rv TCCGTGAAGCAAAACGTAGC	58.1	
		pb FAM-AATACTGAGCGGCTGCTCGCCTT-BHQ1	67.0	
<i>L. monocytogens</i>	iap	fw CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT	58.4	173
		rv CGCGACCGAAGCCAATA	59.5	
		pb VIC-ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTG-BHQ1	67.5	
<i>S. aureus</i>	Sa442	fw TTCTCACGACTAAATAAACGCTCA	58.3	144
		rv GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT	57.1	
		pb CY5-CAGAACACAATGTTCCGATGCAACGT-BHQ2	67.5	

\* fw, forward primer; rv, reverse primer; pb, probe.

### 1.10 数据分析方法

使用 Micro Excel(Micro office professional edition 2003, Microsoft Corporation)对各组试验数据进行处理及绘制生长曲线。

## 2 结果

### 2.1 抑制剂、促进剂的选择及配方的确定

2.1.1 抑制剂:由表1可知,在基础培养基中加入4 g/L的氯化锂对沙门氏菌及金黄色葡萄球菌影响较小,但对单增李斯特菌的抑制作用达到50%。

### 1.7 人工接种样品的检测

取1 mL 3种目标菌的混合培养物(菌浓度为10<sup>2</sup> CFU/mL),加入到25 g生牛肉(根据GB 4789-2008检测不含目标菌)中,至于灭菌袋中,混匀,室温下处理15 min使菌液均匀吸收,加入225 mL SSL肉汤,混匀,37℃ 150 r/min 振荡培养24 h。未接种3种目标菌的样品做阴性对照。取12 h、16 h、20 h、24 h的培养物,用已灭菌生理盐水做十倍梯度稀释,在目标菌的选择性培养基上做平板计数。相同方法进行鸡肉样品污染。

### 1.8 实际污染样品的检测

710份样品,共710份样品,包括牛排198份,猪排212份,鸡肉213份,猪肠87,样品保存与-20℃环境下待检。取25 g样品与225 mL SSL混匀,37℃ 150 r/min 振荡培养24 h。平板计数。

### 1.9 三重荧光PCR检测

荧光PCR引物及探针见表2。在25 μL反应体系中进行,10 × PCR buffer 0.25 μL, Mg<sup>2+</sup> (3 mmol/L) 1.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, 3种目标菌上下游引物各1 μL, 3种目标菌的探针(5 pmol)各0.5 μL, 3种目标菌的DNA模板各2 μL, Taq酶(5 μ/μL) 0.5 μL, DEPC水11 μL。反应条件为反应条件:95℃ 预变性4 min, 95℃ 10 s, 60℃ 45 s, 72℃ 30 s, 40个循环。

2 g/L的氯化锂对3种菌的抑制作用均不明显。在培养基中加入吡啶黄,强烈抑制金黄色葡萄球菌的生长,不可使用。10 mg/mL的萘啶铜酸对三种菌的抑制作用不明显。苯乙醇则同时抑制沙门氏菌和单增李斯特菌的生长。磷霉素即使在低剂量下也会强烈抑制沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的生长,对李斯特菌的抑制作用相对较弱。不同浓度的亚硝酸钾对沙门氏菌的作用有明显的差异,0.1 mg/L的用量增减则可产生较大的生长速度的变化。在0.1 mg/L条件下,沙门氏菌有较好的生长效果。为使3种菌有

较一致的生长速度,最终确定使用氯化锂 2 g/L,萘啶铜酸 10 mg/L,亚硝酸钾 0.1 mg/L。

**2.1.2 促进剂:**因为抑制剂成分的存在,对于 3 种目标菌并非完全没有抑制作用,考虑使用促进成分,改善 3 种目标菌的生长。本研究共考虑丙酮酸钠、甘露醇及七叶苷。由实验结果可知,5 g/L 及 2.5 g/L 的丙酮酸钠对 3 种菌的生长均有促进作用。当加入甘露醇时,金黄色葡萄球菌的菌体浓度增大,但对沙门氏菌及单增李斯特菌没有明显的影响。七叶苷对 3 种目标菌的促进作用均不明显。最后确定使用 2.5 g/L 的丙酮酸钠及 2.5 g/L 的甘露醇。

**2.1.3 培养基的制备:**按配方称取足量的胰酪胨、蛋白胨、葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钠、丙酮酸钠、甘露醇、氯化锂溶解与 11 蒸馏水中,加热溶解,冷却至室温,调节 pH 值为 7.0 ~ 7.2。 $1 \times 10^5$  Pa 灭菌

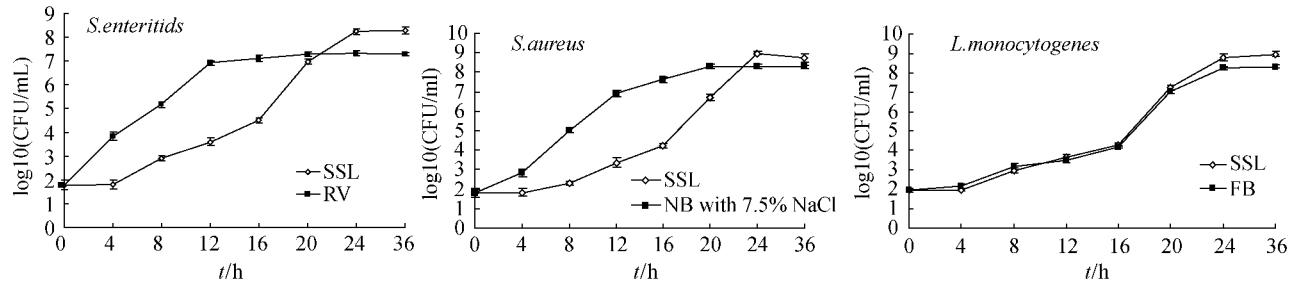


图 1 SSL 肉汤单独增菌效果

Fig.1 Individual growth of three target pathogens in SSL.

**2.2.2 SSL 肉汤复合增菌效果:**在复合增菌实验中(图 2),当 3 种目标菌以相同的接种浓度接入 SSL 中时,3 种菌具有相似的生长速度、滞后期及最大菌浓度。经过 24 h 培养后,3 种菌均达到  $10^8$  CFU/mL,与接入 TSB 后具有相当的最大菌浓度(*S. enteritidis*:  $7.8 \times 10^8$  CFU/mL, *L. monocytogenes*:  $10.2 \times 10^8$  CFU/mL, *S. aureus*:  $9.1 \times 10^8$  CFU/mL)。当接种浓度比例为 1:1000:100 (Sa:Sta:Lm) 时,如实验前的预计,单增李斯特菌及金黄色葡萄球菌的最大菌浓度明显高于沙门氏菌,经过 16 h 培养后,沙门氏菌浓度仍维持在初始接入水平,但 24 h 后,沙门氏菌的菌体浓度达到  $10^4$  CFU/mL,可满足分子生物学检测所需的菌体浓度。而在 TSB 中,24 h 后,沙门氏菌的浓度低于 10 CFU/mL。当接种浓度比例为 1000:100:1 (Sa:Sta:Lm) 时,单增李斯特菌的最大菌浓度达到  $10^5$  CFU/mL。相反在 TSB 中,单增李斯特菌不可检测,可能原因是沙门氏菌及金黄色葡萄球菌的生长抑制了单增李斯特菌的生长。当接种浓度比例为 100:1:1000 (Sa:Sta:Lm) 时,与前两个混合比例实验

15 min 冷却至室温后加入萘啶铜酸及亚硝酸钾混匀,保存于 4℃ 备用。

## 2.2 复合增菌培养液 SSL 的增菌效果的验证

**2.2.1 SSL 肉汤单菌增菌效果:**沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌在 SSL 肉汤及 3 种菌各自的选择性增菌肉汤中(RV, 7.5% 氯化钠肉汤及李氏增菌液)的生长曲线见图 1。其中,单增李斯特菌在 SSL 及 FB 中的生长速度相当,有相似的滞后期、指数生长期,且在 SSL 中,单增李斯特菌的最大菌浓度高于 FB,接近于  $10^9$  CFU/mL。对沙门氏菌及金黄色葡萄球菌而言,尽管在 RV 及 7.5% 氯化钠肉汤中目标菌可以较早进入对数生长期(4 h),但经过 24 h 培养后,在目标菌在 SSL 中的菌浓度也达到  $10^8$  CFU/mL,高于在 RV 及 7.5% 氯化钠肉汤中的  $10^7$  CFU/mL。

结果不同,该实验中 3 种菌的最大生长浓度与初始接入浓度不成比例。其中金黄色葡萄球菌的浓度达到  $10^7$  CFU/mL,与沙门氏菌及单增李斯特菌相似。简而言之,以不同接种比例在 SSL 肉汤中接入 3 种目标菌,均有较好的增菌效果。3 种菌表现出相似的生长状况,且最大菌浓度可满足现代检测技术的检测限要求。

**2.2.3 非目标菌的在 SSL 肉汤中的复苏效果:**8 种与食品有关的常见致病菌接入 SSL 肉汤中,经过 24 h 培养后,仅有 *EHEC O157:H7*, *Proteus vulgaris* 和 *Shigella spp.* 生长,其 OD 值从 0.133 分别增长至 0.524, 0.412 和 0.143。其余的五种致病菌未生长 OD 值维持在 0.133 不变。尽管这 3 种菌在 SSL 中可生长,但生长速度远低于 3 种目标菌的生长速度。相反,在 TSB 中,非目标菌生长状况较好,OD 值均增长至 1.000 以上。

同时,将 *EHEC O157:H7*, *Proteus vulgaris* 和 *Shigella spp.* 与 3 种目标菌同时接入 SSL 肉汤中,在 1:10 和 1:100 (目标菌浓度:非目标菌浓度) 2 个接种

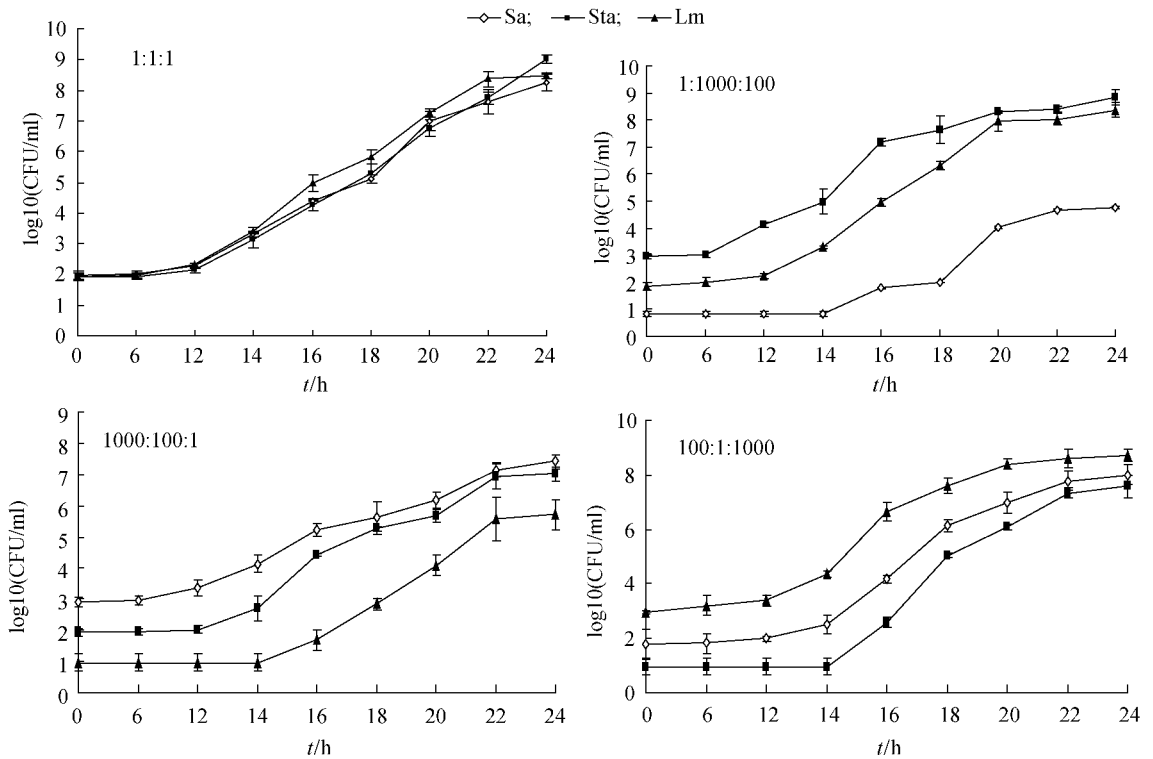


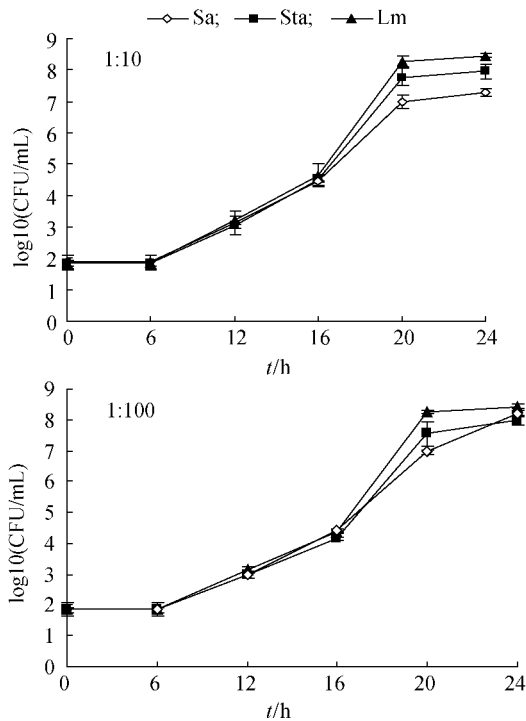
图 2 SSL 肉汤复合增菌效果

Fig. 2 Simultaneous growth of three target pathogens in SSL.

浓度, 3 种目标菌的生长不受影响, 生长曲线见图 3。经过 24 h 培养后, 3 种目标菌的浓度可达到 10<sup>7</sup> CFU/mL, 与不接入非目标菌的对照组比较, 最大菌浓度相近。

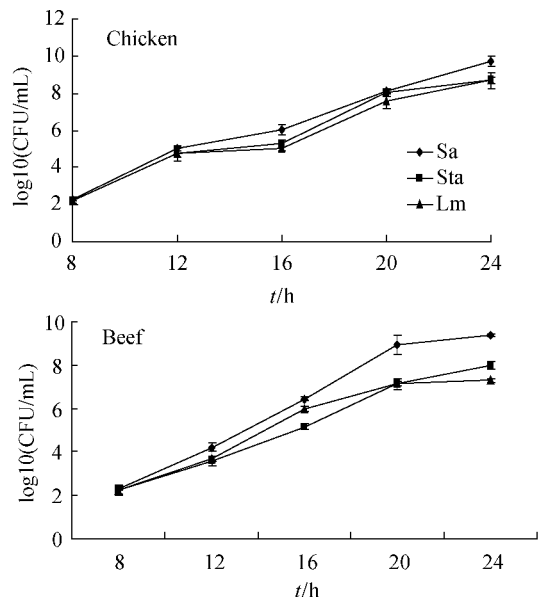
#### 2.4 人工接种样品的检验

3 种目标菌的初始接种量为 10<sup>2</sup> CFU/mL 时, 经过 24 h 培养后, 菌浓度可达到 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>9</sup> CFU/mL, 生长曲线见图 4。取 18 h 的培养物进行 FQ-PCR 检测, 检测结果为阳性。检测结果见图 5。



3 非目标菌存在时目标菌在 SSL 中的生长状况

Fig. 3 Growth of three target pathogens in SSL when non-target pathogens exist.



4 三种目标菌在鸡肉及牛肉的人工污染样品的生长情况

Fig. 4 Growth of three target pathogens in artificially contaminated samples.

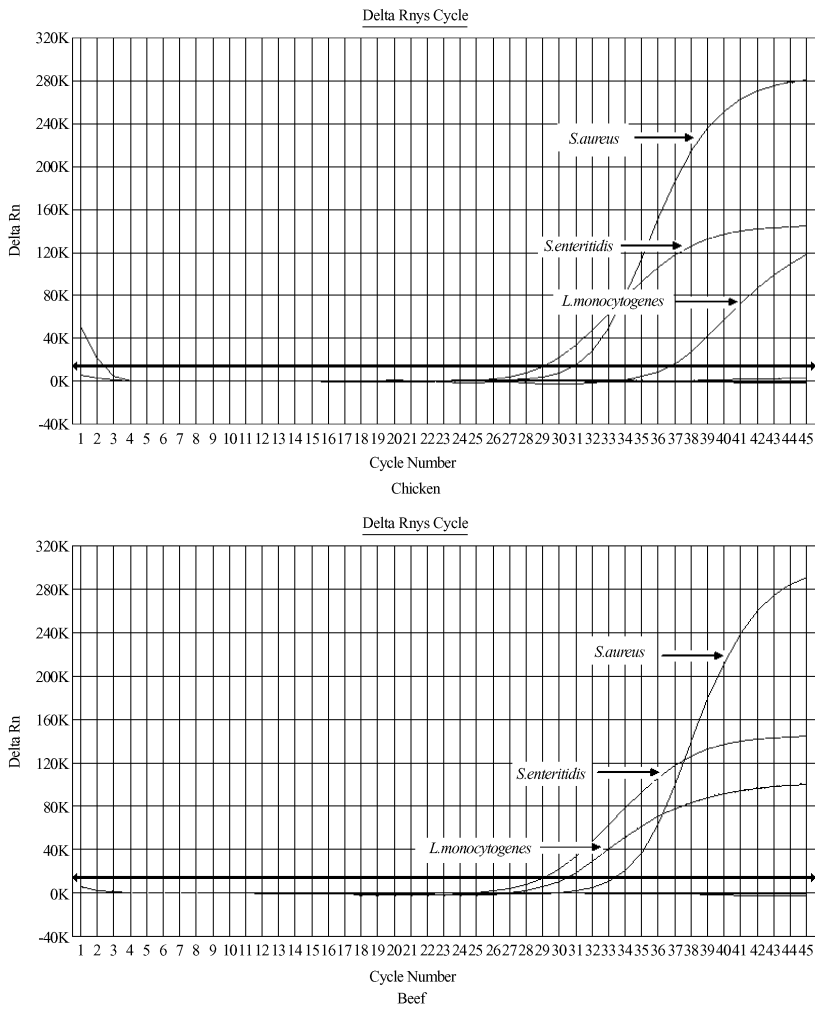


图 5 三种目标菌的人工污染样品 18 h 培养物荧光 PCR 扩增曲线

Fig. 5 FQ-PCR assay with threetargetpathogens inoculated ready-to eat chicken and beef samples.

2.5 实际样品的检验

表 3 为实际样品的检测结果,所有样品同时采用 GB4789 - 2008 检测。710 份样品中,26 份被确定为沙门氏菌阳性,其中 1 份被由国标法判定为阴性而 PCR 检测为阳性。19 份样品被确定为单增李斯

特菌阳性。19 份样品被确定为金黄色葡萄球菌阳性,其中 2 份被 PCR 断定为阳性而被国标法判定为阴性。这 3 份由荧光 PCR 判定为阳性而被国标法判定为阴性的样品进一步通过克隆扩增片段进入质粒 pUC-19 T 经测序证实荧光 PCR 的判断正确。

表 3 实际样品采用国标法及 SSL 联合 FQ-PCR 检测法检测结果

Table 3 Target pathogens detection by the conventional method and SSL with FQ-PCR from naturally contaminated food samples

Sample	No. of samples analyzed	Sa ( PCR/Culture )			Lm ( PCR/Culture )			Sta ( PCR/Culture )		
		+ / + *	+ / -	- / +	+ / +	+ / -	- / +	+ / +	+ / -	- / +
Beefsteak	198	5	0	0	2	0	0	3	0	0
Pork chop	212	6	0	0	5	0	0	1	0	0
Chicken	213	8	1	0	7	0	0	11	2	0
Pig bowel	87	7	0	0	5	0	0	4	0	0
Total	710	26	1	0	19	0	0	19	2	0

\* Conventional methods were strictly performed according to GB4789 - 2008 issued by General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China as standard detection methods. + / +, positive for both PCR and conventional cultivation; - / +, negative for PCR and positive for conventional cultivation.

### 3 讨论

本研究中,SSL是一种选择性的复合增菌肉汤,根据改良胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)配方,形成基础培养基,满足菌体生长需求。在此基础上联合添加2 g/L的氯化锂,10 mg/L的萘啶铜酸及0.1 mg/L的亚硝酸钾,可较好抑制背景微生物的。验证了Charlotte Nexman Jacobsen<sup>[12]</sup>的研究结论:10 mg/L的萘啶铜酸对*E. coli*,*P. fluorescens*,*B. cereus*的抑制效果达到97%,对*L. monocytogenes*的抑制作用为7%,对*S. aureus*的抑制作用为20%,2g/L的氯化锂对*S. aureus*无抑制作用。同时也验证了朱敏<sup>[13]</sup>等的研究结论:亚硝酸钾对*B. cereus*及*E. coli*有强烈的抑制作用,但对*L. monocytogenes*及*S. aureus*抑制作用不明显。此外,补入丙酮酸钠和甘露醇作为生长促进因子,支持细胞生长,利于损伤沙门氏菌的复苏,促进金黄色葡萄球菌的富集<sup>[14-15]</sup>。

由本研究可知,当3种目标菌以不同的初始接入量接种至TSB中时,接种量为 $10 \pm 1$  CFU/mL的目标菌生长受到明显抑制,无法满足3种目标菌同时生长的要求,可能的原因是接种量大的菌快速成为优势菌体,抑制了接种量小的菌体的生长。SSL肉汤较好的克服了这一问题,仅当沙门氏菌的初始接入量为 $10 \pm 1$  CFU/mL时,其生长落后于单增李斯特菌及金黄色葡萄球菌,但经过24 h培养,沙门氏菌的浓度达到 $10^4$  CFU/mL,可满足PCR检测限的要求。而当金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌的初始接入量为 $10 \pm 1$  CFU/mL时,3种目标菌可以相对一致的速度生长,实现目标菌的同时富集。

现有预增菌肉汤(UPB)可用于多种致病菌的共增菌培养,但它缺少抑制剂,无法实现目标菌的选择性生长,不适合高背景微生物的样品的前增菌<sup>[16]</sup>,SSL肉汤可以弥补该不足。经过SSL增菌之后无需再次进行选择性的增菌,可直接用于PCR检测。

综上所述,本研究得到的SSL肉汤,具有较好的选择性,能够使沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌以相对一致的速度生长,经24h培养后,菌体浓度可达到 $10^7$  CFU/mL以上,一步完成前增菌及选择性增菌,培养物可满足后期PCR检测需求。在今后的研究中,还可以继续探讨培养基中抑制剂的抑菌机理及在共增菌过程中3种目标菌之间的影响,以及在与PCR检测技术接轨时,如何消除培养基成分对检测结果的影响,以完善整个共检技术流程。

致谢 本研究得到教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-06-0764)的资助,深圳太太基因工程有限公司,深圳出入境检验检疫局及东莞出入境检验检疫局的帮助,特此致谢!

### 参考文献

- [1] Schuchat A, Swaminathan B, Broome C. V. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Review*, 1991, 4, 169 - 183.
- [2] Kusunoki K, Jin M, Iwaya M, et al. Salmonella contamination in domestic raw chickens in Tama, Tokyo, and serovar or drug-resistance of isolates (1992 - 1999). *Japan Journal of Food Microbiology*, 2000, 17, 207 - 212.
- [3] Halpin-Dohnalek MI, Marth EH. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods—A review. *Journal of Food Protection*, 1989, 52, 267 - 282.
- [4] 王晶, 王林, 黄晓蓉. 食品安全快速检测技术. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [5] 吴清平, 范宏英, 张菊梅. 食源性致病菌免疫及分子检测新技术研究进展. *食品科学(Food Science)*, 2005, 26(11): 269 - 273.
- [6] Kawasaki S, Horikoshi Y, Okada, Takeshita K, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *Journal of Food Protection*, 2005, 68, 551 - 556.
- [7] Chiang YC, Yang CY, Li C, et al. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. And *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107: 131 - 137.
- [8] Oscar G, Gomez-Duarte, Jing Bai, et al. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, 63: 1 - 9.
- [9] 俞彩娥. 沙门菌和志贺菌通用增菌液增菌效果实验观察. 预防医学情报杂志(*Journal of Preventive Medicine Information*), 2006, 22(3): 369 - 370.
- [10] 许一平, 陈福生. 一种能同时富集沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的增菌培养基. *微生物学通报(Microbiology)*, 2007, 34(2): 208 - 210.
- [11] Hyochin K, Arun KB. SEL, a Multipathogen Selective Enrichment Broth for Simultaneous Growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environment. Microbiology*, 2008, 6: 66 - 4859.
- [12] Jacobsen CN. The influence of commonly used selective agents on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 50: 221 - 226.

- [13] 朱敏,梅玲玲,程苏云.改良李斯特菌增菌液的研究.中国卫生检验杂志(*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*),2007,17(2):293-295.
- [14] 王晓英.广谱前增菌肉汤强化苹果酒和苹果汁中沙门菌复苏.国外医学.卫生学分册(*Foreign Medical Science - Hygiene*)2002,29(6):381-383.
- [15] 胡秀杰,张相萍,包小兵.金黄色葡萄球菌增菌培养基增菌效果观察.医药论坛杂志(*Journal of Medical Forum*),2005,26(18):4-5.
- [16] Bailey JS, Cox NA. Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria* in foods. *Journal of Food Protection*, 1992, 55, 256-258.

## A multi-pathogen selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*

Yuanyuan Liu, Xinglong Xiao, Yigang Yu, Gu Chen, Xiaofeng Li, Yuqian Tang, Hui Wu\*  
(College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] A selective enrichment broth (SSL) was formulated to allow simultaneous growth of *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. [ **Methods** ] Suitable additive agents were selected by single factor experiment, the enrichment effect of the broth for the three pathogens were evaluated by conventional detection method and real-time PCR. [ **Results** ] A selective enrichment broth, SSL, was obtained by adding the selective agents, including nalidixic acid, lithium chloride, and potassium tellurite, in the basic broth, and sodium pyruvate and mannitol as the supplemented elements. Recovery of three target pathogens in SSL was obtained within 24 h of incubation at 37 °C, yielding cell densities of  $10^7 - 10^8$  CFU/mL. Meanwhile, SSL broth effectively inhibited the growth of non-target organisms. 710 samples were detected by SSL with real-time PCR, and there is no error report. [ **Conclusion** ] SSL is demonstrated to be a promising new multiplex selective enrichment broth for simultaneous detection of the three most prominent foodborne pathogens by multipathogen detection on a single assay platform.

**Keywords:** SSL broth; multipathogen selective enrichment broth; *Salmonella enteritidis*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Supporting Plan of Excellent Talent of New Century from Ministry of Education( NCET-06-0764 )

\* Corresponding author. E-mail: fehwu@scut.edu.cn

Received: 31 March 2009/Revised: 7 June 2009



### 科学出版社新书推介(2009-08)

#### 现代医学分子生物学双语精编

伍欣星 李晖 赵旻 主编

978-7-0-025153-4 ¥55.00 2009年8月出版

**内容简介:** 本书的编写具有鲜明特色,采用了中、英文双语形式,共精编了11章内容,分别用中、英文阐述了当前医学分子生物学的基础知识和前沿进展,包括基因组、转录组、蛋白质组学的基本概念, rRNA 及非编码 RNA、基因表达的调控、细胞周期与细胞凋亡、细胞信号转导、肿瘤分子生物学及生物信息学等基本原理和应用。

本书是为帮助我国医学院校高年级学生(七年制、八年制)和硕士、博士研究生学习医学分子生物学的基础知识,熟练运用专业英语查阅国外文献,从事科学研究而专门编写的教材,旨在帮助那些具备一定英语基础并初步掌握医学分子生物学知识的人士提高生物医学专业水平及专业英语水平。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 李韶文 联系电话:010-64031535 64000849

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目