

以荧光显示,并将特定物质固定化,使实验操作、结果判断得到了改良,这是独特之处。因此,纸片荧光法是一种值得推广的检测方法,尤其适用于对食品厂 HACCP 现场监控的评估。

该方法操作时仍需要注意:1.避免外源性荧光物质的非特异性干扰。2.检测时,应设立阴性和阳性对照,避免主观判断误差。3.纸条以避光、4℃储存为宜。本文研究仅限于检测冷冻食品范围,纸片荧光法是否适用于其它类型食品的检测,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 卢纯惠,等.水质总大肠菌群和埃希氏大肠杆菌“酶-底物快速检测法”研究[M].1992.
- [2] 中华人民共和国国家进出口商品检验局中华人民共和国进出口商品检验行业标准 SN0169-92 出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群、和大肠杆菌检验方法[S].
- [3] Eugene W Rice, Marhin J Allen, Stephen C Edberg. Efficacy of B-glucuronidase assay for identification of Escherichia coli by the defined-substrate technology[J].Applied and Environmental Microbiology, 1990, (5): 1203-1205.
- [4] M R Adams, S M Grubb, A Harner, et al Colorimetric enumeration of Escherichia coli based on B-glucuronidase activity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, (7): 2021-2024.
- [5] Stephen C Edberg, Martin J Allen, Darrell B Smith. Defined substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli from water: collaborative study[J]. Edberg et al: assoc off anal chem, 1991, 74 (3).
- [6] Eugene H Peterson, Mark L Nierman, Richard A rude, et al. Comparison of AOAC method and fluorogenic (MUG) assay for enumeration Escherichia coli in foods[J]. Journal of Food Science, 1987, 52(2).
- [7] Liv Fiksdal, Monique Pommepuy, Marie-Paule Caprais, et al Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques[J]. Applied and Environmental. Microbiology, 1994, (5): 1581-1584.
- [8] AOAC 编译委员会. AOAC 公定分析方法(第十五版)[M]. 1990.

水产品中单核细胞增生李斯特氏菌检验研究

于 兵, 麻丽丹, 张 勇

(丹东出入境检验检疫局, 辽宁 丹东 118000)

摘 要: 本文是对水产品中单核细胞增生李斯特氏菌常规检验的研究。结合国家标准、行业标准和 FDA《细菌学检验手册》第八版中所述方法进行检验。自朝鲜进境的水产品 23 类、255 批中检出李斯特氏菌 7 株。结果表明, 由于食品加工过程对微生物损害极大, 使大多数微生物处于濒死状态, 因而加速受损细胞恢复是单核细胞增生李斯特氏菌检验前增菌的关键。在检验过程中最初分离时发现了可疑菌落并就此进行确认和得出结论, 而不是延长增菌时间继续分离和鉴定, 容易产生假阴性结果。

关键词: 水产品; 单核细胞增生李斯特氏菌; 检验

Studying the Detection of Listeria Monocytogenes in Aquatic Product

YU Bing, MA Li-dan, ZHANG Yong

(Dandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Dandong 118000, China)

Abstract: This paper studies the conventional detection of Listeria monocytogenes in aquatic product. Combines nation standard, trade standard with method described in FDA《Bacteriological Analytical Manual》8th edition during detection. There are seven Listeria positive in 23 kinds, 255 batches of aquatic product imported from North Korea. The result shows that because of food processing doing severe harm to microbiology, most of them are in the agonal state, so that stimulating the injured

收稿日期: 2003-02-08

作者简介: 于兵(1970-), 男, 工程师, 本科, 主要从事食品微生物和兽药残留检验研究。

cell to recover is the key work in the *Listeria monocytogenes* pre-enrichment procedure during detection. When there are suspect colonies in the first division, do conforming work and get the conclusion at first, instead of going on enriching, it is easy to get false negative result.

Key words: aquatic product; *Listeria monocytogenes*; detection

中图分类号: S9

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)01-0139-03

单核细胞增生李斯特氏菌(*L.monocytogenes*)是一种人畜共患病的病原菌, 由于它广泛存在于动植物食品中, 容易引起由食物中毒导致的李斯特氏菌病的发生, 该菌可以侵袭全身, 主要表现为败血症、脑膜炎、单核细胞增多, 对某些免疫缺陷的病人和抵抗力低下的人常引起较为严重的病症, 而且死亡率较高。该菌在食品中繁殖温度范围较宽(1~45℃), 冷藏不影响其繁殖, 含有单核细胞增生李斯特氏菌的食品冷藏时间越长, 危险性越大, 因此, 食品中的单核细胞增生李斯特氏菌引起了世界各国的关注, 我国和其他许多国家将其列为进出口食品的必检项目^[1]。

我局于2002年1月开展单核细胞增生李斯特氏菌检验项目, 并于1月31日从1批自朝鲜进境的冻青柳蛤肉中检出单增李斯特氏菌, 为我国首次从该国进境水产品中检出该菌。至今共检查由朝鲜进口的水产品23类、255批, 检出李斯特氏菌7株, 其中单增李斯特氏菌4株, 英诺克李斯特氏菌(*L.innocua*)2株, 西尔李斯特氏菌(*L.seeligeri*)1株。现将鉴定结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

所有待鉴定的7株李斯特氏菌均从朝鲜进口的3类6批冷冻水产品中分离得到, 其中从2批章鱼、1批青柳蛤肉、1批海胆中分离出4株单核细胞增生李斯特氏菌, 从2批锥螺中分离出1株英诺克李斯特氏菌和1株西尔李斯特氏菌, 从1批盐渍泥螺中分离出英诺克李斯特氏菌1株。

1.2 诊断试剂

李斯特氏菌增菌肉汤EB, 选择分离培养基MMA、OXA、CHROMagar显色培养基、纯化培养基TSA-YE、鉴别培养基TSI、MR-VP、硝酸盐还原、尿素、甘露醇、鼠李糖、木糖、七叶苷均购于北京陆桥技术有限责任公司, 均在有效期内使用。

1.3 试验用对照菌为典型单核细胞增生李斯特氏菌、英诺克李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌, 购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.4 鉴定方法

综合GB4789.30-1994、SN0184-93和FDA细菌鉴定手册第八版第十章所述方法操作。

检验程序如下: 25g样品加入到225ml EB加丙酮酸钠中匀质后于30±1℃增菌培养4h后加选择剂丫啶黄素、萘啶酮酸继续培养44h^[2], 在24h和48h, 将EB增菌液中划线分离于1个MMA、1个OXA、1个CHROMagar显色培养基上, 将平板置于CO₂比例为5%, 35±1℃培养24~48h, 然后将MMA上生长的可疑菌落置45°斜射白光下(享利照明), 由解剖镜观察菌落颜色, 取5个灰蓝色菌落划线分离于TSA-YE平板35℃24h培养以达纯化目的^[1]。将OXA平板上生长的5个黑色可疑菌落划线分离于TSA-YE平板上纯化。取纯化后的菌落做溶血试验和系列生化, 同时做革兰氏染色和显微镜下运动观察, 并穿刺一个MTM培养基25℃培养48~72h, 观察伞状运动, 在CHROMagar显色培养基上挑取蓝色周围有晕环的菌落, 划线分离在TSA-YE平板上纯化, 以下鉴定步骤同上。

2 结果

从朝鲜进口的23类、255批水产品中检出的李斯特氏菌7株, 其中单增李斯特氏菌4株、英诺克李斯特氏菌2株、西尔李斯特氏菌1株(见表1), 它们的生物学特性如下。

2.1 培养特征和形态

所有分离出的6株李斯特氏菌, 在MMA平板和纯化培养基TSA-YE平板上35℃培养48h后均生长成半透明1~1.5mm圆形露滴状菌落, 在45°斜射白光下用解剖镜观察呈灰蓝色菌落^[1]。在OXA平板上生长24h后菌落呈现黑色, 直径为1mm, 在其周围形成一个黑色环。培养48h, 菌落仍呈黑色, 直径2~3mm, 除在菌落周围有一环外, 在菌落中心部位的深层也形成黑点。穿刺MTM培养基25℃培养48h后可见呈伞状运动生长, 在油镜下观察细菌运动呈翻转样, 革兰氏染色为G⁺短杆菌, 两端钝圆, 偶有球状、双球状, 无芽胞^[2]。

表1 丹东检验检疫局进口水产品李斯特氏菌检验结果

检品名称	检验 批次	检验结果(株)		
		单增李 斯特氏菌	英诺克李 斯特氏菌	西尔李斯 特氏菌
杂色蛤肉	42	0	0	0
章鱼	14	2	0	0
鳕鱼	3	0	0	0
青柳蛤肉	46	1	0	0
盐渍海蛎子	5	0	0	0
盐渍蚬子	3	0	0	0
海蜇	1	0	0	0
锥螺	11	0	1	1
活蚬子	10	0	0	0
江瑶贝	2	0	0	0
北极贝	5	0	0	0
夏貽贝	2	0	0	0
偏口鱼	5	0	0	0
赤贝	2	0	0	0
鱿鱼	1	0	0	0
冻无头虾	1	0	0	0
鲑鱼头	1	0	0	0
泥螺	49	0	1	0
海参	1	0	0	0
海胆	28	1	0	0
明太鱼	4	0	0	0
梭子蟹	18	0	0	0
海螺肉	1	0	0	0
合计	255	4	2	1

2.2 生化 and 溶血特性

所有7株菌株均不发酵甘露醇,不产生亚硝酸盐,不利用尿素,水解七叶苷。有4株发酵鼠李糖,不发酵木糖,溶血试验阳性(在穿刺点有窄小溶血环),符合单增李斯特氏菌生化特征。2株不发酵鼠李糖和木糖,溶血试验阴性(无窄小溶血环),符合英诺克李斯特氏菌生化特征。另1株为溶血试验阳性,发酵木糖,不发酵鼠李糖,符合西尔李斯特氏菌生化特征。

3 讨论

3.1 由于单增李斯特氏菌在外界环境中分布广泛,所致疾病症状严重,死亡率较高,目前世界各国均将其列入进出口食品必检项目,但由于此菌检验周期较长,全项检验需4~15d。鉴于李斯特氏菌生化反应较为稳定,我们试着先从MMA和OXA平板挑选10个可疑菌落,穿刺血平板37℃培养24h,如果没有窄小的β溶血环产生即

可报告未检出单增李斯特氏菌,如果有窄小的溶血环,可再将菌落分离在TSA-YE平板上纯化,再用纯化的菌落做生化和溶血试验,以确证是否为单增李斯特氏菌,这样阴性结果可以提前1~2d报出。

3.2 由于食品加工过程对微生物损害极大,使大多数微生物处于濒死状态,因而加速受损细胞的恢复是前增菌的关键。GB和SN标准均为直接加抑菌剂,实践证明增菌效果不理想,我们改用FDA细菌鉴定手册第八版第十章所述方法操作,即取25g样品加入装有225ml不含选择剂的增菌液培养4h后,再加选择剂。效果较理想,并在盐分高达20%的盐渍泥螺中检出英诺克李斯特氏菌,目前国内未见相同报道。

3.3 参考目前关于李斯特氏菌分析的取样方案和混合方法的资料,确保样品既代表食品的外观品质又代表内在质量,对将要进行单核细胞增生李斯特氏菌分析的材料在处理、贮藏和运送过程中推荐在4℃下冷藏。在此温度下,虽然李斯特氏菌能生长,但很缓慢。特别注意,如果分析样品是冷冻的话,样品在分析之前应该一直保持冷冻^[3]。

3.4 由于食品中往往含有混合的李斯特氏菌属,在增菌过程中由于英诺克李斯特氏菌生长速度远超过单核细胞增生李斯特氏菌的生长速度,因而在较短的培养时间内,从李斯特氏菌选择性增菌肉汤中分离到单核细胞增生李斯特氏菌就变得特别困难,如果在血琼脂平板或李斯特氏菌选择培养基上有可疑的菌落,那么,从延长培养时间的选择性肉汤中分离到单核细胞增生李斯特氏菌具有很大的可能性。所以,在检验过程中最初分离时发现了可疑菌落并就此进行确认和得出结论,而不是延长增菌时间继续分离和鉴定,就容易产生假阴性结果。

3.5 在23类、255批水产品中共检出4株单增李斯特氏菌,总检出率1.6%,其中章鱼14批中检出2株,检出率为14.3%(2/14),青柳蛤肉46批检出1株,检出率为2.2%(1/46),海胆28批检出1株,检出率为3.6%(1/28),可见章鱼带菌率较高。

参考文献:

- [1] GB4789.30-1994.食品卫生微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验.
- [2] SN0184-93出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌检验方法.
- [3] Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition Chapter 10 *Listeria monocytogenes*.