

研究报告

沙门菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌的选择性共增菌培养基的研制

易青¹, 宁喜斌^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 3. 国家淡水水产品加工技术研发分中心, 上海 201306)

摘要:目的 研制一种可同时对沙门菌、金黄色葡萄球菌及副溶血性弧菌进行富集共增菌培养基 SSV, 达到同时检测 3 种食品中常见的食源性致病菌的目的。方法 根据 3 株菌的营养需求, 选择不同的培养基组分进行单因素实验, 确定选择性共增菌培养基的配方, 通过 OD_{600nm}、受损菌复苏、多重聚合酶链式反应 (PCR)、培养基选择性 4 个方面对 SSV 培养基进行验证。结果 确定增菌培养基的成分为: 蛋白胨 10.0 g、KH₂PO₄ 1.5 g、NaCl 15.0 g、LiCl 1.0 g、Na₂S₂O₃ 5.0 g、去氧胆酸钠 0.05 g、甘露醇 1.0 g、丙酮酸钠 5.0 g、蒸馏水 1 000 mL。SSV 培养基能同时富集以上 3 株菌, 37 °C 培养 16 h 后, 3 株菌的菌体浓度均达到 10⁷ CFU/mL 及以上; SSV 培养基对于受损的目标菌有良好的复苏效果, 复苏后 OD_{600nm} 较于复苏前增长了 3 倍; 同时多重 PCR、培养基选择性也得到很好的验证。结论 共增菌培养基 SSV 可用于同时培养沙门菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌, 培养基配制简易, 节约成本。后续可与多重 PCR 检测方法联用, 提高检测率和准确性。

关键词: 共增菌培养基; 沙门菌; 金黄色葡萄球菌; 副溶血性弧菌; 受损菌复苏

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)04-0510-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.04.004

Development of selective co-enrichment medium for *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*

YI Qing¹, NING Xibin^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 3. National R&D Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing Technology, Shanghai 201306, China)

Abstract: Objective A co-enrichment medium SSV which can simultaneously enrich *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* was developed for the simultaneous detection of the above three foodborne pathogens in foods. **Methods** According to the nutritional needs of the three strains, the medium components were selected by single factor experiments, and the formula of selective co-enrichment medium was developed. The SSV medium was verified through bacterial number change, injured bacteria recovery, multiple polymerase chain reaction (PCR) and medium selectivity. **Results** The components of enrichment medium were determined as followed: Peptone 10.0 g, KH₂PO₄ 1.5 g, NaCl 15.0 g, LiCl 1.0 g, Na₂S₂O₃ 5.0 g, sodium deoxycholate 0.05 g, mannitol 1.0 g, sodium pyruvate 5.0 g and distilled water 1 000 mL. The above three strains could be enriched in SSV medium at the same time. After cultured at 37 °C for 16 h, the cell concentrations of the three strains reached 10⁷ CFU/mL at least. SSV medium had a good resuscitation effect on the damaged target bacteria, and the OD_{600nm} tripled after resuscitation. At the same time, the function was well verified by multiplex PCR and medium selectivity. **Conclusion** The co-enrichment medium SSV can be used to simultaneously culture *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. The preparation of the medium is simple and cost-effective. It can be combined with multiplex PCR to improve the detection rate and accuracy.

Key words: Co-enrichment medium; *Salmonella enteritidis*; *Staphylococcus aureus*; *Vibrio parahaemolyticus*; recovery of injured bacteria

收稿日期: 2021-11-11

作者简介: 易青 女 硕士研究生 研究方向为食品安全、微生物学 E-mail: 1598842414@qq.com

通信作者: 宁喜斌 男 教授 研究方向为食品安全、微生物学 E-mail: xbning@shou.edu.cn

近年来,由食源性病原微生物引发的群体中毒事件数不胜数。据世界卫生组织统计,全球每年约有220万人死于食源性疾病^[1],食源性病原微生物主要包括细菌、病毒、寄生虫^[2],由致病细菌引起的中毒事件居于食品微生物危害首位^[3],其中沙门菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是食物中主要检出的三大致病菌^[4]。因此,高效、快速地检出食品中常见的食源性致病菌对保障现代食品安全具有重要意义。传统检测方法只能对单一病原菌进行检测,同时存在检测时间长、检测程序繁琐、工作量大等缺点^[5],相较而言,共增菌技术因可同时富集多种致病菌,缩短了检测时间,操作简单等优点受到越来越多研究人员的关注。为富集不同致病菌,魏琼等^[6]研制了针对沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌的复合增菌培养基;许一平等^[7]研制了针对大肠杆菌、沙门菌及金黄色葡萄球菌的共增菌培养基;此外,国外还有针对沙门菌、副溶血性弧菌的共增菌培养基以及通用型预增菌培养基(Universal preenrichment broth, UPB)^[8-11]。然而食品在加工储藏过程中,微生物受到低温、pH、高渗透压、防腐剂、超高压等^[12-14]环境影响,部分细菌受损,损伤状态下的细菌会导致检测时其检出率降低,影响检出结果准确性。虽然细菌在损伤状态下可能会丧失部分代谢活性,但在适宜条件下这种状态会得到一定恢复,重回正常生理状态。国内外研制的增菌培养基均未涉及对损伤状态下细菌的影响,因此,可通过研究共增菌培养基对受损菌的修复能力避免检测结果假阴性的出现。本文通过研制一种能够同时富集沙门菌、金黄色葡萄球菌及副溶血性弧菌的培养基(SSV培养基),并使得该培养基对处于损伤状态下的3株目标菌有一定复苏作用,从而进一步对3株菌达到较好的富集效果,旨在提高致病菌的现代快速检测技术效率。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

THZ-300C 恒温培养摇床、GPH-9270 隔水式培养箱(上海一恒科技有限公司),DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器),A300 梯度 PCR(朗仪 LongGene 科学仪器公司),Synergy 酶标仪(Bio-Tek 宝特科技有限公司),SRA-200 均质机(上海新勒机电科技有限公司)。

沙门菌(*Salmonella enteritidis* CMCC15611, *S. enteritidis* 15611)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC41002, *S. aureus* 41002)、副溶血性弧菌(*Vibrio*

parahaemolyticus ATCC13847, *V. parahaemolyticus* 13847)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、志贺菌(*Shigella*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*),均为本实验室保藏。

营养琼脂、四磺酸钠煌绿增菌液(Tatrathionate broth, TTB)、7.5% 氯化钠肉汤、3% 氯化钠碱性蛋白胨水、胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptic soy broth, SB)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(Xylose lysine desoxycholate, LD)、Baird-parker 琼脂基础(BP)、硫代硫酸盐柠檬酸胆盐蔗糖琼脂(Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)、蛋白胨(分析纯,青岛高科园海博生物技术有限公司), KH_2PO_4 、NaCl、LiCl、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、甘露醇、丙酮酸钠、去氧胆酸钠、萘啶酮酸、亚硝酸钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 出发培养基的选择

参照沙门菌、金黄色葡萄球菌及副溶血性弧菌在食品安全国家标准 GB 4789.4—2016、GB 4789.10—2016 及 GB 4789.7—2013 中增菌所用的培养基并去除具有选择性的成分,将出发培养基成分分为蛋白胨、 KH_2PO_4 、NaCl。蛋白胨为微生物提供氮源和能源,NaCl 在培养基中起到调节渗透压的作用,而 KH_2PO_4 用于稳定微生物生长过程中 pH 的变化,称取上述 3 种成分加入到 1 000 mL 蒸馏水中。

1.2.2 组分单因素试验

以 1.2.1 中培养基为基础培养基,选取可能的抑制剂和促进剂。考虑到金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌生长需要一定盐分,故将 NaCl 也作为添加组分。将 3 种目标菌接种于分别添加了 8 种添加剂 NaCl、LiCl、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、甘露醇、丙酮酸钠、去氧胆酸钠、萘啶酮酸、亚硝酸钾)各 3 个水平的基础培养基中,作为添加组分筛选组,以不含上述任一组分的基础培养基作为空白对照,37 °C 培养 24 h,测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值,实验重复 3 次,每次实验设置两组平行实验。考察的培养基组分种类及用量见表 1。

1.2.3 目标菌在增菌培养基单独生长效果的研究

以 10^2 CFU/mL 为初始接种量,将 3 株菌分别接种到 1.2.2 确定好成分的增菌培养基中,37 °C、170 r/min 培养 24 h。每隔 4 h 取培养物进行适宜的梯度稀释。平板涂布至 XLD、BP 以及 TCBS 培养基中,实验重复 3 次,每次平行 2 次。37 °C 培养 24 h 进行平板菌落计数,分别得出 3 株菌的生长曲线。以各自的选择性增菌液作为对照组,重复上述操

表1 各添加组分及其含量

Table 1 Components and contents of additions

成分	低浓度/(g/L)	中浓度/(g/L)	高浓度/(g/L)
NaCl	2.5	5.0	10.0
LiCl	0.5	1.0	1.5
Na ₂ S ₂ O ₃	2.5	5.0	10.0
去氧胆酸钠	0.05	0.1	0.15
亚硝酸钾	0.000 5	0.001	0.002
茶啉酮酸	0.005	0.01	0.015
甘露醇	1	2	3
丙酮酸钠	5	10	15

作,得出对照组生长曲线。

1.2.4 目标菌在增菌培养基中复合增菌效果的研究

以 10² CFU/mL 为初始接种量,将 *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 以 1:2:1(V/V)接种于 200 mL 增菌培养基中,37 °C 170 r/min 培养 24 h,按 1.2.3 方法进行平板菌落计数,因为 TSB 为通用的微生物增菌肉汤,不具有选择性,所以将其设为对照组,重复上述操作,得出复合增菌时 3 株菌的生长曲线。

1.2.5 受损菌复苏

3 株目标菌各取 1 mL 于无菌离心管中,8 000 r/min(离心半径为 10 cm),离心 3 min,弃上清液后用灭菌生理盐水冲洗 3 次,分别接入酸性环境(pH 3.0)、中性环境(pH 7.0)、碱性环境(pH 12.0)的营养肉汤中,4 °C 培养,每隔 24 h 取样进行平板涂布检查菌数变化,当平板上无菌落生长时,测定当下的 OD_{600 nm},并将此时的样品各取 200 μL 接入 SSV 增菌培养基及各自的国标增菌液里,培养 24 h 测定 OD_{600 nm}。

1.2.6 多重 PCR 检验

3 株目标菌混合接种到 SSV 培养基、TTB、7.5% 氯化钠肉汤、3% 碱性蛋白胨水里,培养 24 h 后用 DNA 提取试剂盒对上述 4 种培养基产物进行 DNA 提取。多重 PCR 引物序列如下:*S. enteritidis* 15611 (480 bp): *invA*-F: 5'-GGGTCAAGGCTGAGGAAG-3', *invA*-R: 5'-GCTAACGCATGAAGAGGG-3'; *S. aureus* 41002 (132 bp): *nuc*-F: 5'-GGCAATACGCAAAGAGGTT-3', *nuc*-R: 5'-GCACTTGCTTCAGGACCAT-3'; *V. parahaemolyticus* 13847 (271 bp): *collagenase*-F: 5'-GAAAGTTGAACATCATCAGCACGA-3', *collagenase*-R: 5'-GGT CAGAATCAAACGCCG-3'。多重 PCR 反应体系: 2× Taq PCR Premix 12.5 μL,混合 DNA 模板 2 μL,上下游引物各 0.5 μL,加水补足至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55.6 °C 30 s, 72 °C 1 min,进行 35 个循环,最后 72 °C 10 min。

1.2.7 增菌培养基的选择性验证

同样以 10² CFU/mL 为初始接种量,将 3 株目标菌和 6 株非目标菌接种于 SSV 培养基中培养,分别取 8、16 h 的培养物测定 OD_{600 nm},实验重复 3 次,每次做 2 次平行实验。

1.2.8 人工模拟污染样品

购于超市的样品(鱼丸、虾丸、蟹棒、鱼肉、猪肉、鸡肉)各取 25 g 均质,将初始浓度为各 10 CFU/mL 的 3 株目标菌混合后取 1 mL 加入到均质好的样品中,4 °C 放置 24 h 后将样品加入到 225 mL 灭菌 SSV 培养基中,37 °C 摇床培养 24 h 计算菌落数。

1.2.9 统计学分析

利用 SPSS 23.0 软件进行数据统计,对 8 种添加剂各水平加入出发培养基后目标菌的生长情况进行单因素显著性差异分析,对增菌培养基中 3 株目标菌的生长情况进行配对 T 检验和差异性分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 增菌培养基成分及浓度的确定

将 3 株目标菌置于不同配方的培养基中培养 24 h,OD_{600 nm} 结果见表 2。当 NaCl 浓度为 10 g/L 时,对沙门菌的生长有一定的促进作用,此浓度下的金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的生长同样受到明显的促进作用(*P*<0.05)。由于基础培养基中已添加 5 g/L 的 NaCl,最终确定 NaCl 添加量为 15 g/L。LiCl 添加量为 1.0 g/L 时,金黄色葡萄球菌的生长速度加快,沙门菌和副溶血性弧菌的生长也处于可以接受的情况(*P*<0.05),由此 LiCl 添加量为 1.0 g/L。根据数据分析,5.0 g/L Na₂S₂O₃ 对沙门菌和金黄色葡萄球菌的生长有促进作用(*P*<0.05),综合考虑,Na₂S₂O₃ 的适宜添加量为 5.0 g/L。由表 2 可以看出,去氧胆酸钠浓度越高,3 种目标菌的生长都受到一定程度的抑制作用,因此选择低浓度 0.05 g/L 的去氧胆酸钠为增菌培养基成分。1.0 g/L 的甘露醇对 3 株菌的生长起到促进作用(*P*<0.05),所以选取 1.0 g/L 的甘露醇作为培养基组分。丙酮酸钠对受损菌种复苏有一定效果,作为一种碳源,5.0 g/L 的丙酮酸钠对 3 株菌的生长有明显促进作用(*P*<0.05),3 株菌生长速度一致,因此丙酮酸钠最适添加量为 5 g/L。亚硝酸钾和茶啉酮酸的添加对 3 株目标菌有很大的抑制作用,不考虑作为增菌培养基的组分。

综上所述,最终将增菌培养基的组分和含量定为:蛋白胨 10.0 g、KH₂PO₄ 1.5 g、NaCl 15.0 g、LiCl 1.0 g、Na₂S₂O₃ 5.0 g、去氧胆酸钠 0.05 g、甘露醇

表2 各种添加成分对3株目标菌生长的影响
Table2 Effect of various additives on the growth of three target bacteria

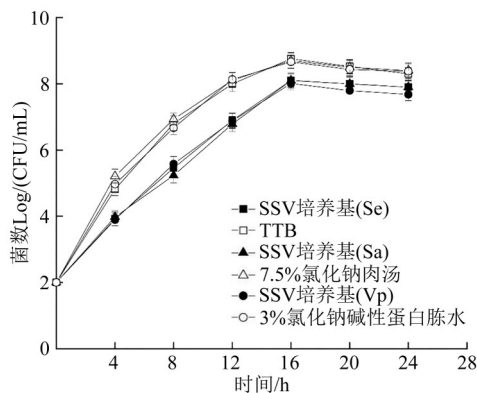
成分	浓度/(g/L)	目标菌 OD _{600 nm}		
		<i>S. enteritidis</i> 15611	<i>S. aureus</i> 41002	<i>V. parahaemolyticus</i> 13847
对照组	—	0.608±0.027	0.550±0.006	0.547±0.013
NaCl	2.5	0.557±0.022 ^{b*}	0.643±0.021 ^{a*}	0.658±0.012 ^{b*}
	5.0	0.436±0.009 ^{a*}	0.741 0±0.047 ^{b*}	0.554±0.027 ^{a*}
	10.0	0.694±0.013 ^{c*}	0.933±0.038 ^{c*}	0.861±0.043 ^{c*}
LiCl	0.5	0.468±0.020 ^{a*}	0.449±0.038 ^{a*}	0.441±0.046 ^{a*}
	1.0	0.685±0.006 ^{c*}	0.620±0.019 ^{a*}	0.628±0.013 ^{a*}
	1.5	0.573±0.013 ^{b*}	0.536±0.040 ^{b*}	0.551±0.024 ^{b*}
Na ₂ S ₂ O ₃	2.5	0.546±0.012 ^{b*}	0.545±0.042 ^{b*}	0.372±0.001 ^{a*}
	5.0	0.700±0.010 ^{c*}	0.667±0.023 ^{c*}	0.552±0.043 ^{c*}
	10.0	0.467±0.026 ^{a*}	0.475±0.019 ^{a*}	0.481±0.013 ^{b*}
去氧胆酸钠	0.05	0.578±0.015 ^{c*}	0.642±0.028 ^{c*}	0.594±0.016 ^{c*}
	0.01	0.449±0.023 ^{b*}	0.432±0.019 ^{b*}	0.522±0.044 ^{b*}
	0.15	0.358±0.013 ^{a*}	0.384±0.003 ^{a*}	0.451±0.025 ^{a*}
亚碲酸钾	0.000 5	0.067±0.017 ^{a*}	0.068±0.025 ^{a*}	0.007±0.032 ^{a*}
	0.001	0.080±0.023 ^{b*}	0.092±0.017 ^{b*}	0.085±0.038 ^{b*}
	0.002	0.130±0.017 ^{c*}	0.126±0.019 ^{c*}	0.119±0.014 ^{c*}
萘啶酮酸	0.005	0.053±0.009 ^{a*}	0.067±0.006 ^{a*}	0.061±0.029 ^{a*}
	0.01	0.097±0.021 ^{b*}	0.095±0.031 ^{b*}	0.087±0.016 ^{b*}
	0.015	0.144±0.017 ^{c*}	0.121±0.028 ^{c*}	0.111±0.031 ^{c*}
甘露醇	1.0	0.729±0.005 ^{c*}	0.699±0.045 ^{b*}	0.641±0.017 ^{c*}
	2.0	0.689±0.006 ^{b*}	0.587±0.017 ^{a*}	0.572±0.013 ^{b*}
	3.0	0.591±0.011 ^{a*}	0.582±0.014 ^{a*}	0.503±0.008 ^{a*}
丙酮酸钠	5.0	0.744±0.040 ^{c*}	0.743±0.035 ^{c*}	0.657±0.014 ^{c*}
	10.0	0.676±0.008 ^{b*}	0.648±0.030 ^{b*}	0.568±0.007 ^{b*}
	15.0	0.543±0.022 ^{a*}	0.457±0.010 ^{a*}	0.518±0.010 ^{a*}

注:不同小写字母代表同一列同一添加剂中生长差异具有统计学意义, $P < 0.05$; *代表同一列中与对照组生长差异有统计学意义, $P < 0.05$

1.0 g、丙酮酸钠 5.0 g, 1 000 mL 蒸馏水。配制后充分混匀, 调节 pH 为 7.2 ~ 7.4, 121 °C 灭菌。将该培养基命名为 SSV 培养基。

2.2 SSV 培养基单增菌研究

将 *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 分别接种至 SSV 培养基及对应国标增菌液里, 得出生长曲线见图 1。



注: Se 表示 *S. enteritidis*; Sa 表示 *S. aureus*; Vp 表示 *V. parahaemolyticus*

图1 3株目标菌单增菌效果研究

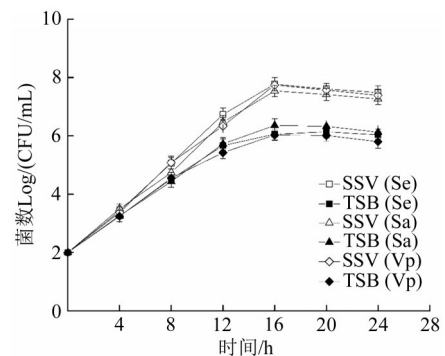
Figure 1 Effect of 3 target strains of mono proliferative bacteria

图1为初始浓度为 10² CFU/mL 的3株目标菌分别接种在各自的标准选择性增菌液及 SSV 培养基中, 与国标中3株菌的增菌液比较, SSV 培养基菌数增长速率开始稍慢于国标增菌液, 当培养至 16 h

时两组培养基菌液浓度均达到 10⁸ CFU/mL, 可见 SSV 培养基达到了与国标增菌液相同的增菌效果。因此, SSV 增菌培养基可满足 *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 的前增菌需要。

2.3 目标菌混合增菌效果的研究

将 *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 以 1:2:1 (V/V) 接种至 SSV 培养基及胰蛋白胨大豆肉汤中, 培养结果见图 2。



注: Se 表示 *S. enteritidis*; Sa 表示 *S. aureus*; Vp 表示 *V. parahaemolyticus*

图2 3株目标菌混合增菌效果研究

Figure 2 Effect of 3 strains of target bacteria on augmentation

S. enteritidis 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 在两组培养基里培养, 当培养时间至 4 h 后, SSV 培养基每 4 h 的增菌速度优

于对照组,且通过数据分析得出组间有显著性差异($P<0.05$)。培养 16 h 后,SSV 培养基里 3 株目标菌的菌液浓度均达到 10^7 CFU/mL 及以上(图 2),而对照组只能达到 10^6 CFU/mL。说明 SSV 培养基对于 3 株目标菌的增菌效果优于对照组,可用于后续检测限研究。

2.4 受损菌复苏

人工诱导使 3 株目标菌成为受损菌,再接入 SSV 培养基和对应的国标增菌液培养 24 h 进行复苏,结果见图 3、图 4、图 5。

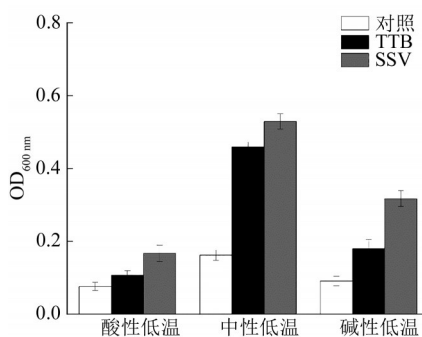


图 3 *S. enteritidis* 15611 复苏情况

Figure 3 Resuscitation of *S. enteritidis* 15611

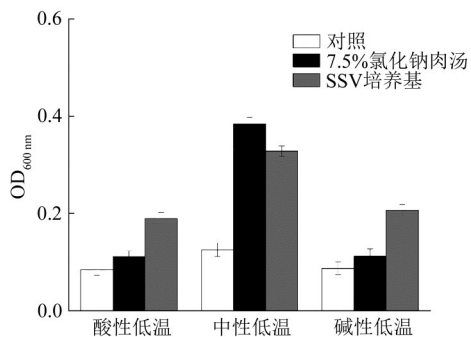


图 4 *S. aureus* 41002 复苏情况

Figure 4 Resuscitation of *S. aureus* 41002

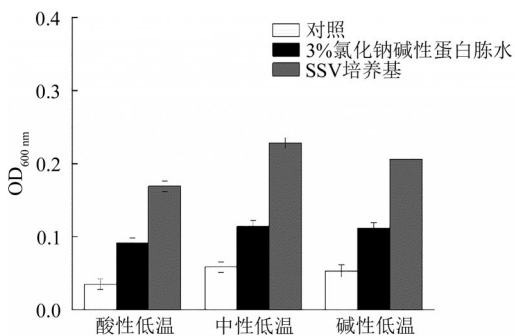


图 5 *V. parahaemolyticus* 13847 复苏情况

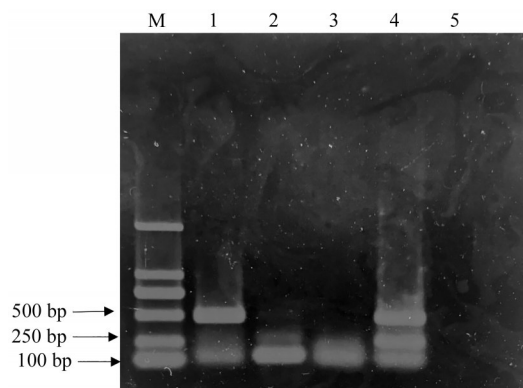
Figure 5 Resuscitation of *V. parahaemolyticus* 13847

受损的 3 株目标菌经过 SSV 培养基培养 24 h 后, *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 经过复苏后 OD_{600nm} 值增长了 3 倍左右,复苏效果优于国标增菌液。本实验所研制的 SSV 增菌培养基可使在酸性低温、中性低

温、碱性低温环境下受损的 3 株目标菌得到一定程度的复苏。

2.5 多重 PCR 检验

3 株目标菌经过 SSV 培养基的混合培养后,可扩增产出 *S. enteritidis* 15611 的 *invA* 基因 480 bp、*S. aureus* 41002 的 *nuc* 基因 132 bp、*V. parahaemolyticus* 13847 的 *collagenase* 基因 271 bp 的特异性条带。从图 6 看出,TTB、7.5% 氯化钠肉汤、3% 氯化钠碱性蛋白胨水对 3 株目标菌混合培养的电泳结果均没有 SSV 培养基效果好。



注:M:DNA 分子质量标准;1:TTB;2:7.5% 氯化钠肉汤;3:3% 碱性蛋白胨水;4:SSV 培养基;5:阴性对照

图 6 多重 PCR 电泳结果

Figure 6 Results of multiple PCR electrophoresis

2.6 SSV 增菌培养基的选择性验证

表 3 结果显示 SSV 增菌培养基对目标菌有很好的富集效果,且富集效果显著高于对照组($P<0.05$)。同时 6 株非目标菌在 SSV 增菌培养基中生长都受到一定的抑制作用,而在对照组中,非目标菌的 OD 值都显著高于 SSV 增菌培养基($P<0.05$),进一步说明 SSV 增菌培养基的选择性。结果见表 3。

2.7 人工模拟污染样品增菌效果

SSV 增菌培养基对实际样品有不错的增菌效果,将初始浓度为各 10 CFU/mL 人工污染样品接入 SSV 增菌培养基于 37 °C 摇床培养 24 h 后,6 个污染样品菌落总数均超过 10^5 CFU/mL,超过国家标准的规定。结果见表 4。

3 讨论

国际上研制的一种通用型增菌培养基 UPB^[10] 可同时富集多种病原菌,但由于该培养基无选择性,所以在富集目标菌时必然会受到其他杂菌的影响。ANDREW 等^[9]研制出一种选择性富集沙门菌、大肠杆菌 O157:H7 和单核细胞增生李斯特菌的共富集肉汤,经过培养使菌体浓度从 10^2 CFU/mL 增

加至 $10^6 \sim 10^8$ CFU/mL, 可满足后续检测限的要求; 张巧艳等^[8]通过响应面设计出大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌的选择性共富集肉汤, 通过后续提取 DNA 进行 PCR 检测, 大大缩短了病原菌检出时间。虽然国内外对共增菌技术都有不同层面的试验, 但很少探讨培养基对病原菌的损伤修复能力, 故本研究通过人工诱导细菌损伤来探究 SSV 培养基对其损伤修复作用。为避免其他杂菌对目标菌株生长的影

响, 将 LiCl、Na₂S₂O₃ 和去氧胆酸钠作为抑制剂^[15]成分加入 SSV 培养基中, 同时将丙酮酸钠和甘露醇加入培养基与其他成分共同配合, 使受损或在不良环境下的目标菌得到一定程度的复苏。结果表明, 3 株菌在不同损伤环境下的 OD 值均恢复到原来的 3 倍, 表明 SSV 培养基可进一步提高 *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 阳性检出率。

表3 目标菌和非目标菌在 SSV 增菌培养基和对照组中 8 h 和 16 h 时的生长情况

Table 3 Growth of target bacteria and non target bacteria in SSV co-enrichment medium and control group at 8 h and 16 h

菌株	SSV 培养基		对照组(TSB)	
	8 h	16 h	8 h	16 h
<i>S. enteritidis</i> 15611	0.451±0.018 ^a	0.636±0.051 ^b	0.401±0.021 ^c	0.611±0.011 ^d
<i>S. aureus</i> 41002	0.432±0.023 ^a	0.744±0.056 ^b	0.372±0.007 ^c	0.627±0.024 ^d
<i>V. parahaemolyticus</i> 13847	0.457±0.016 ^a	0.732±0.021 ^b	0.383±0.023 ^c	0.625±0.002 ^d
霍乱弧菌	0.186±0.005 ^a	0.316±0.022 ^b	0.443±0.014 ^c	0.689±0.022 ^d
创伤弧菌	0.169±0.008 ^a	0.296±0.024 ^b	0.395±0.011 ^c	0.642±0.015 ^d
弗氏柠檬酸杆菌	0.172±0.008 ^a	0.308±0.029 ^b	0.431±0.002 ^c	0.681±0.009 ^d
大肠杆菌	0.162±0.003 ^a	0.308±0.003 ^b	0.426±0.013 ^c	0.751±0.012 ^d
志贺菌	0.110±0.002 ^a	0.272±0.009 ^b	0.416±0.012 ^c	0.716±0.008 ^d
腐生葡萄球菌	0.101±0.029 ^a	0.204±0.003 ^b	0.485±0.005 ^c	0.731±0.017 ^d

注: 不同字母代表同行菌株生长具有统计学意义($P < 0.05$)

表4 6种污染样品增菌效果

Table 4 Bacteria increasing effect of 6 contaminated samples

菌株	样品					
	鱼丸	虾丸	蟹棒	鱼肉	猪肉	鸡肉
<i>S. enteritidis</i> 15611	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 41002	+	+	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i> 13847	+	+	+	+	+	+

注: +表示菌数 $\geq 10^5$ CFU/mL

目前, 致病菌的检测可与免疫学检测技术、分子生物学检测技术联用, 其中 PCR^[16] 技术因其特异性高、灵敏度强引起高效快检领域的诸多关注, 故后续可对 *S. enteritidis* 15611、*S. aureus* 41002 及 *V. parahaemolyticus* 13847 的多重 PCR 体系进行研究。通过与 SSV 培养基联用, 对 3 株菌多重 PCR 体系的灵敏性、特异性、重复性等方面进行试验, 使 SSV 培养基—多重 PCR 成为一个更为完善的分子鉴定方案, 从而实现快速高效且更为准确的共检体系的建立。

参考文献

- [1] KIRK M D, PIRES S M, BLACK R E, et al. Correction: World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis [J]. PLoS Medicine, 2015, 12 (12): e1001940.
- [2] WU Y N, CHEN J S. Food safety monitoring and surveillance in China: Past, present and future [J]. Food Control, 2018, 90: 429-439.
- [3] 严礼, 肖稳, 郭焜鹏, 等. 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌和单增李斯特菌选择性共增菌培养基的研制 [J]. 中国

食物与营养, 2020, 26(8): 14-18.

- YAN L, XIAO W, GUO K P, et al. Preparation of selective Co-growing medium for *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* and *Listeria monocytogenes* [J]. China Food and Nutrition, 2020, 26 (8): 14-18.
- [4] 国家食药总局. 2018年食品安全抽检计划和食品安全监督抽检实施细则 [J]. 饮料工业, 2018, 21(1): 3. State Food and Drug Administration. 2018 Food Safety Random Inspection Plan and Implementation Rules of National Food Safety Supervision Random Inspection [J]. Beverage Industry, 2018, 21 (1): 3.
- [5] 翁思聪, 朱军莉, 励建荣. 水产品中 4 种常见致病菌多重 PCR 检测方法的建立及评价 [J]. 水产学报, 2011, 35(2): 305-314. WENG S C, ZHU J L, LI J R. Establishment and evaluation of multiplex PCR method for detection of 4 common pathogens in aquatic products [J]. Acta Fisheries Sinica, 2011, 35 (2): 305-314.
- [6] 魏琼, 陈萍, 刘道文, 等. 沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌复合增菌培养基研制 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(8): 807-809. WEI Q, CHEN P, LIU D W, et al. Preparation of Composite growth medium for *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Public Health, 2011, 27 (8): 807-809.
- [7] 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 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 208-211. XU Y P, CHEN F S. An Enrichment medium for *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Microbiology, 2007, 34(2): 208-211.
- [8] 张巧艳, 何腾飞, 范萍, 等. 乳制品常见致病菌选择性共增

- 菌技术研究[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(5): 26-30.
- ZHANG Q Y, HE T F, FAN P, et al. Study on selective co-growth of common pathogenic bacteria in dairy products [J]. China Dairy Industry, 2011, 39(5): 26-30.
- [9] ANDREW G G, DAVID M A, ARUN K B, et al. Mixed culture enrichment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Yersinia enterocolitica* [J]. Food Control, 2012, 26(2): 269-273.
- [10] SHANG Y T, YE Q H, WU Q P, et al. PCR and multiplex PCR assays for the detection of *Cronobacter* species using specific targets obtained by a bioinformatics approach [J]. Food Control, 2021, 125: 107896.
- [11] YU Y G, WU H, LIU Y Y, et al. A multipathogen selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2010, 56(7): 585-597.
- [12] AYRAPETYAN M, OLIVER J D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety [J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 8: 127-133.
- [13] 石慧, 陈卓逐, 阚建全. 大肠杆菌在食品加工贮藏中胁迫响应机制的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 250-257.
- SHI H, CHEN Z Z, KAN J Q. Research progress of stress response mechanism of *Escherichia coli* in food processing and storage [J]. Food Science, 2016, 37(9): 250-257.
- [14] BI X F, WANG Y T, ZHAO F, et al. Sublethal injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 by high pressure carbon dioxide [J]. Food Control, 2015, 50: 705-713.
- [15] 晨凡, 秦鲜菊, 徐思源, 等. 沙门氏菌及副溶血性弧菌的共增菌培养基的研制[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 119-124.
- CHEN F, QIN X J, XU S Y, et al. Development of co-growing medium for *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(19): 119-124.
- [16] WILWET L, JEYASHAKILA R, SIVARAMAN B, et al. In-house and on-field validation of the multiplex PCR assay developed for authentication of three commercially important shrimp species [J]. LWT, 2021, 148: 111701.

《中国食品卫生杂志》顾问及第五届编委会名单

顾问: 陈君石、黄璐琦、江桂斌、李林、沈建忠、吴清平、Jianghong Meng(美国)、Patrick Wall(爱尔兰)、Samuel Godefroy(加拿大)、Gerald Moy(美国)、Paul Brent(澳大利亚)、Marta Hugas(比利时)、Yukikko Yamada(日本)、Tom Heilandt(德国)、Andreas Hensel(德国)、Christopher Elliott(英国)、Christine Nelleman(丹麦)

主任委员: 卢江

副主任委员: 王竹天、李宁、孙长颢、王涛、谢剑炜、应浩、丁钢强、张峰、张永慧

主编: 吴永宁

编委(按姓氏笔画排序)

丁钢强(中国疾病预防控制中心营养与健康所)	应浩(中国科学院上海营养与健康所)
于洲(国家食品安全风险评估中心)	张丁(河南省疾病预防控制中心)
于维森(青岛市疾病预防控制中心)	张峰(中国检验检疫科学研究院)
马宁(国家食品安全风险评估中心)	张卫兵(南通市疾病预防控制中心)
马会来(中国疾病预防控制中心)	张立实(四川大学华西公共卫生学院)
马群飞(福建省疾病预防控制中心)	张永慧(广东省疾病预防控制中心)
王君(国家食品安全风险评估中心)	张旭东(国家卫生健康委员会医院管理研究所)
王茵(浙江省医学科学院)	张剑峰(黑龙江省疾病预防控制中心)
王涛(浙江清华长三角研究院)	张朝晖(中国海关科学技术研究中心)
王硕(南开大学医学院)	张惠媛(中国海关科学技术研究中心)
王慧(上海交通大学公共卫生学院)	张遵真(四川大学华西公共卫生学院)
王永芳(国家卫生健康委员会卫生健康监督中心)	陈波(湖南师范大学化学化工学院)
王竹天(国家食品安全风险评估中心)	陈颖(中国检验检疫科学研究院)
王松雪(国家粮食和物资储备局科学研究院)	陈卫东(广东省市场监督管理局)
王晓英(中国动物疫病预防控制中心)	邵兵(北京市疾病预防控制中心)
计融(国家食品安全风险评估中心)	武爱波(中国科学院上海营养与健康所)

(下转第542页)