

彭织云,唐晓阳,李沁,等. 不同来源及血清型李斯特氏菌生长动力学参数比较[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):280-283.

不同来源及血清型李斯特氏菌生长动力学参数比较

彭织云,唐晓阳,李沁,孙晓红,潘迎捷,赵勇

(上海海洋大学食品学院/上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,上海 201306)

摘要:以不同来源、不同血清型李斯特氏菌(*Listeria* spp.)株(临床分离株7株、环境分离株7株和其他来源3株,11种血清型的17个ATCC标准菌株)为研究对象,研究其生长动力学与来源、血清型之间的关系,37℃静置培养条件下获得17株菌的生长曲线,并利用Baranyi模型对其拟合,得到每株菌的生长动力学参数——最大比生长速率(μ_{\max})、延滞期(λ)、最大细胞浓度(y_{\max})。结果表明: μ_{\max} 和 λ 这2个参数的最大值和最小值分别存在显著性差异($P < 0.05$),血清型为3a和4b的2株单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的延滞期存在显著性差异($P < 0.05$),血清型为6a和6b的2株英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*)的最大比生长速率存在显著差异($P < 0.05$)。格氏李斯特氏菌(*Listeria grayi*)菌株与其他菌株存在显著性差异($P < 0.05$),其余不同来源的李斯特氏菌生长动力学差异不显著。

关键词:血清型;李斯特氏菌;生长动力学

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0280-04

李斯特氏菌属(*Listeria*)包括7个种,分别是单核细胞增生性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、绵羊李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*)、英诺克李斯特氏菌(*Listeria innocua*)、韦氏李斯特氏菌(*Listeria welshimeii*)、塞氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*)、格氏李斯特氏菌(*Listeria grayi*)和莫氏李斯特氏菌(*Listeria murrayi*)^[1]。李斯特氏菌是常见的食源性致病菌,如肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等都被证实是李斯特氏菌的感染源^[2]。其中单增李斯特氏菌是一种人畜共患病的病原菌,且其致病性强弱主要与血清型有关^[3],绵羊李斯特氏菌对人类也有一定的致病性^[4],一直被认为是无害的英诺克李斯特氏菌也有文献报道称其有潜在致病性^[5]。

预测微生物学(predictive microbiology),是一门在微生物学、数学、统计学和应用计算机科学基础上建立起来的新学科^[6],通过建立数学模型掌握整个暴露评估中的微生物的动态变化,进一步进行定量风险评估,从而保障食品的安全性^[7]。Capita等比较了单增李斯特氏菌株ATCC19116、菌株64d和菌株M2-5b(来自于临床)的延滞期和最大比生长速率,结果存在显著性差异^[8];Díez-García等发现不同血清型的沙门氏菌(*Salmonella* spp.)的最大比生长速率存在差异^[9],所以确定食品或者模拟食品环境中致病菌的生长动力学情况,在设计试验并进行相关研究时对菌株的选择是一项重要的考虑因素。Begot等认为预测微生物模型中菌株选择

非常重要,并阐述了建立预测模型前应当对大量的菌株进行研究并建议融入菌株的可变因素^[10]。

国内外很多研究都选择美国标准生物物品收藏中心(ATCC)标准菌株为试验菌株^[11-12],所以,本研究对实验室17株李斯特氏菌标准菌株进行研究,为后续建立李斯特氏菌预测模型选择适当的模型菌株提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 本研究所用的17株李斯特氏菌(表1),均购于美国标准生物物品收藏中心(ATCC)。

表1 17株李斯特氏菌

菌株名称	菌株编号	血清型	来源
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC13932	4b	人
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19112	2	人
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19113	3a	人
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19114	4a	人
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19115	4b	人
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC7644	—	人
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19116	4c	鸡
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19118	4e	鸡
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC19117	4d	羊
<i>L. ivanovii</i>	ATCCBAA678	5	羊
<i>L. innocua</i>	ATCC33090	6a	牛
<i>L. innocua</i>	ATCC33091	6b	人
<i>L. seeligeri</i>	ATCC51335	4a	—
<i>L. welshimeri</i>	ATCC43548	6a	—
<i>L. welshimeri</i>	ATCC43549	6b	—
<i>L. welshimeri</i>	ATCC43550	1/2b	土壤
<i>L. grayi</i>	ATCC25400	—	玉米

注:“—”表示没有相关信息。

1.1.2 试剂和仪器 胰酪大豆琼脂肉汤(TSB),购自北京陆桥技术有限责任公司;BioTek多功能酶标仪(基因有限公

收稿日期:2012-12-03

基金项目:上海市科委部分地方院校能力建设项目(编号:11310501100);上海市科委科技创新行动计划项目(编号:12391901300);上海市科委工程中心建设项目(编号:11DZ2280300)。

作者简介:彭织云(1988—),女,上海人,硕士研究生,主要从事食品安全风险评估方向研究。E-mail:852785737@qq.com。

通信作者:赵勇,博士,副教授,研究方向为食品生物技术和风险评估方向。Tel:(021)61900503;E-mail:yzhao@shou.edu.cn。

司);24 孔板;摇床 (THZ-82A 汽浴恒温振荡器)。

1.2 方法

1.2.1 37 °C 下生长曲线测定 从 -80 °C 冰箱中取出甘油管,室温解冻,然后从甘油管中各取 100 μL 分别加到 5 mL 的胰酪大豆琼脂肉汤 (TSB) 中,放入 37 °C、130 r/min 的摇床中进行活化,共活化 2 次,取 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.5 左右时作为初始菌量。接 10 μL 初始菌液到装有 1 mL TSB 的 24 孔板中,在 37 °C 静置培养情况下,每隔 1 h 用酶标仪测 $D_{600\text{ nm}}$ 值^[13],每株菌 2 个平行,共重复 3 次。

1.2.2 动力学模型拟合 利用 Dmfit 软件中的 Baranyi 模型拟合李斯特氏菌的动态生长情况:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \left[\frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right] \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(\frac{e^{-\mu_{\max} t} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

式中: $y(t)$ 为 t 时的细胞浓度 (AU); y_{\max} 为最大细胞浓度 (AU); y_0 为初始细胞浓度 (AU); μ_{\max} 为最大比生长速率 (AU/h); q_0 为细菌初始状态值; λ 为延滞期时间 (h)^[14]。

1.2.3 模型验证 偏差因子为预测值和观测值之间的平均变异提供了一个衡量的指标^[15]。当 $B_f > 1$ 时,对延滞期来说是可靠的,而 $B_f < 1$ 时, μ_{\max} 这个参数是可信的,如果 $B_f = 1$,那么预测值和试验值之间重复性很好。 B_f 表达式如下:

$$B_f = 10^{\left[\sum \lg(U_{\text{predicted}}/U_{\text{observed}}) \right] / n} \quad (4)$$

又因为偏差因子没有表明模型的准确性,所以就用到准确因子。准确因子表明了模型的准确度,表明预测值与观察值之间的相近度。 A_f 值越大大于 1 模型的准确性越小,如果 $A_f = 1$ 那么模型的拟合效果很好^[16]。 A_f 表达式如下:

$$A_f = 10^{\left[\sum \lg(U_{\text{predicted}}/U_{\text{observed}}) \right] / n} \quad (5)$$

1.2.4 统计学处理 数据处理采用 SPSS 17.0 统计软件,生长参数的比较采用 One - Way ANOVA 方法,聚类分析和主成分分析 (PCA) 使用 Past 软件。

2 结果与分析

2.1 李斯特氏菌生长曲线的测定

图 1 为 17 株李斯特氏菌的生长曲线。从图 1 可以看出,编号为 ATCC25400 的 *L. grayi* 菌株最大细胞浓度 (y_{\max}) 大于其他菌株,其 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.57 AU 左右;而编号为 ATCC33091 的 *L. innocua* 菌株尚未达到最大细胞浓度,其 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.3 AU 左右。菌株 ATCC25400 在 5 h 左右进入对数期,11 h 左右进入稳定期;菌株 ATCC33091 生长曲线平缓,没有明显的对数期,17 h 尚未进入稳定期。

2.2 17 株李斯特氏菌株生长模型拟合及验证

为了直观地比较分析这 17 株菌的生长动力学,本研究应用 Baranyi 模型对以上 17 株菌生长曲线进行拟合,得到动力学参数——最大比生长速率 (μ_{\max})、延滞期 (λ)、最大细胞浓度 (y_{\max}),并利用 SPSS 软件对这些参数进行分析比较。

结果如表 2 所示, R^2 都在 0.98 以上, R^2 值越接近 1 表明估计的回归方程对样本数据的拟合效果越好^[17]。有文献证

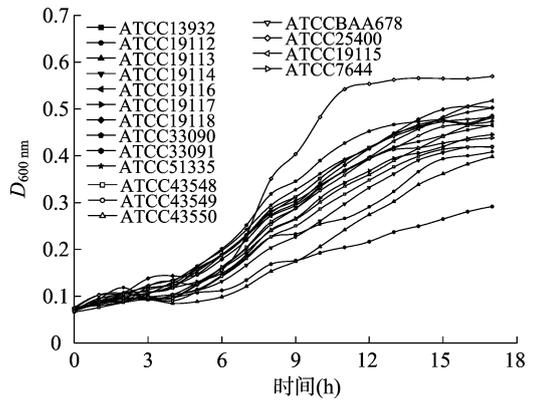


图 1 17 株李斯特氏菌生长曲线

实,通过 $D_{600\text{ nm}}$ 测得的生长速率和通过平板计数测得的生长速率在 95% 的置信区间内^[18]。表 2 中偏差因子 (B_f) 的范围基本在 0.9 ~ 1.05 之间,准确因子 (A_f) 的范围在 1.012 ~ 1.056 之间, Ross 等鉴定, B_f 的范围在 0.9 ~ 1.05 之间时那么就认为这个模型很好,在 0.7 ~ 0.9 或者 1.06 ~ 1.15 范围时这个模型可以被接受^[19]。以上数据验证了 Baranyi 模型能很好地拟合李斯特氏菌的生长特性^[20]。

17 株菌的最大比生长速率 (μ_{\max}) 最大值为 (0.087 5 ± 0.004 7) AU/h,最小值为 (0.015 7 ± 0.000 7) AU/h,平均值为 (0.038 6 ± 0.002 7) AU/h ($P < 0.05$);延滞期 (λ) 最小值为 (2.45 ± 0.312) h,最大值为 (5.75 ± 0.345) h ($P < 0.05$),平均值为 (3.74 ± 0.329) h;最大细胞浓度 (y_{\max}) 最小值为 (0.423 ± 0.005) AU,最大值为 (0.565 ± 0.004 6) AU,平均值为 (0.476 ± 0.004 8) AU (表 2)。

2.3 不同血清型李斯特氏菌生长参数比较分析

对表 2 中的模型参数按不同血清型进行分类,并对这些数据进行分析比较,结果见图 2。

图 2A 是 2 株不同血清型的 *L. innuoca* 菌株,这 2 株菌的最大比生长速率分别为 (0.015 7 ± 0.000 7)、(0.047 8 ± 0.002 1) AU/h,存在显著差异 ($P < 0.05$);图 2B 是 7 株不同血清型的 *L. monocytogenes* 菌株,血清型分别为 3a、4a、2、4c、4d、4e、4b,其中血清型为 3a 和 4b 的 2 株菌的延滞期存在显著性差异 ($P < 0.05$),其余几株不同血清型的菌株延滞期没有显著差异。Díez - García 等研究结果,由 Gompertz 模型拟合的不同血清型的沙门氏菌生长参数是各不相同的^[21]。Begot 等的研究表明单增李斯特氏菌的耐热性与血清型存在显著相关性^[22],血清型是 4b 的单增李斯特氏菌比其他血清型菌株耐酸 ($P < 0.05$)。本研究通过对比发现不同血清型李斯特氏菌株的动力学参数存在差异, *L. innuoca* 菌株的 6a 和 6b 血清型的最大比生长速率存在显著性差异,而单增李斯特氏菌的 3a、4a、4b 这 3 种血清型也存在显著性差异,其他血清型差异不显著,具体数值也各不相同。本研究不足点是供试菌株数量有限,后续会分离野生型菌株并进行相关分析。

2.4 不同来源李斯特氏菌生长参数比较分析

对来源分别为人、牲畜、其他方面的李斯特氏菌最大比生长速率及生长延滞期进行显著性分析,结果如表 3、表 4 所示。分别来源于人和牲畜的李斯特氏菌最大比生长速率无显著性差异 ($P > 0.05$),同时来源于人和其他来源的李斯特氏

表2 17株李斯特氏菌的Baranyi模型参数表及验证

菌株编号	μ_{\max} (AU/h)	λ (h)	y_{\max} (AU)	R^2	B_f	A_f
ATCC13932	0.035 7 ± 0.001 6bc	2.71 ± 0.355 c	0.457 ± 0.006	0.997	1.008	1.015
ATCC19112	0.025 0 ± 0.001 5bc	3.17 ± 0.731bcd	—	0.983	0.994	1.030
ATCC19113	0.029 8 ± 0.001 1bc	5.75 ± 0.345a	—	0.994	1.002	1.020
ATCC19114	0.034 8 ± 0.001 16bc	4.86 ± 0.216b	0.423 ± 0.005	0.998	1.001	1.021
ATCC19115	0.035 7 ± 0.001 1bc	2.91 ± 0.267c	0.528 ± 0.009	0.998	1.002	1.012
ATCC7644	0.041 3 ± 0.002 8b	4.14 ± 0.400b	0.431 ± 0.006	0.994	1.008	1.024
ATCC33091	0.015 7 ± 0.000 7c	2.91 ± 0.54bcd	—	0.992	0.991	1.026
ATCC19116	0.040 6 ± 0.001 6bc	3.61 ± 0.260bcd	0.471 ± 0.004	0.997	0.977	1.030
ATCC19117	0.036 3 ± 0.001 9bc	3.90 ± 0.363bcd	0.437 ± 0.006	0.995	1.004	1.012
ATCC19118	0.039 5 ± 0.002 2bc	3.70 ± 0.418 bcd	0.511 ± 0.009	0.995	1.019	1.035
ATCC33090	0.047 8 ± 0.002 1b	3.49 ± 0.265bcd	0.473 ± 0.004	0.997	1.004	1.018
ATCC25400	0.087 5 ± 0.004 7a	5.36 ± 0.192 a	0.565 ± 0.0046	0.997	1.045	1.056
ATCCBAA678	0.040 3 ± 0.001 4bc	3.24 ± 0.258 bcd	0.479 ± 0.004	0.998	1.167	1.170
ATCC43550	0.033 8 ± 0.001 3bc	3.47 ± 0.331bcd	0.492 ± 0.011	0.997	1.000	1.014
ATCC51335	0.038 1 ± 0.001 4bc	2.45 ± 0.312d	0.496 ± 0.0057	0.997	0.982	1.032
ATCC43548	0.035 8 ± 0.001 3bc	4.08 ± 0.247bc	0.421 ± 0.0046	0.998	0.999	1.008
ATCC43549	0.039 3 ± 0.002 0bc	3.89 ± 0.386bcd	0.478 ± 0.008	0.996	0.986	1.021

注：“—”表示没有得到相关信息。

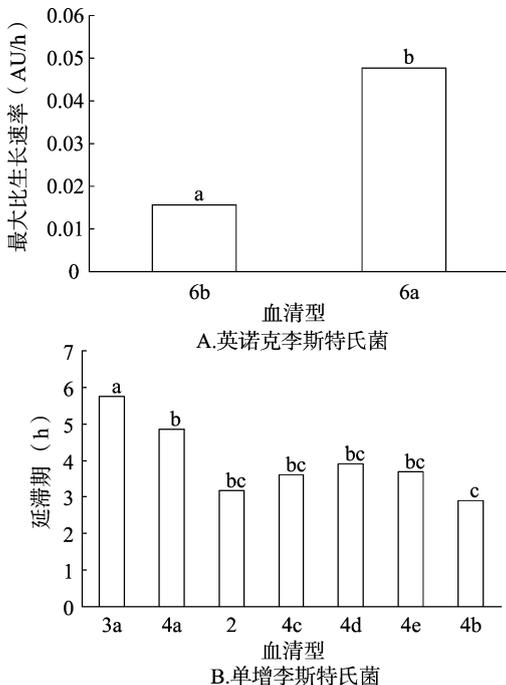


图2 不同血清型菌株生长参数的比较

菌也无显著性差异 ($P = 0.068$)。对不同来源李斯特氏菌的延滞期进行显著性分析(表4),均无显著性差异。

表3 不同来源李斯特氏菌最大比生长速率显著性比较分析结果

来源	人	牲畜	其他
人	1.000		
牲畜	0.240	1.000	
其他	0.068	0.497	1.000

由表3、表4数据分析结果得到,按人、牲畜、其他这3种来源对17株菌株进行分析,最大比生长速率和延滞期这两个

表4 不同来源李斯特氏菌生长延滞期显著性比较分析结果

来源	人	牲畜	其他
人	1.000		
牲畜	0.739	1.000	
其他	0.901	0.672	1.000

生长参数没有显著性差异。

按不同种属对其进行进一步分析,分别对来自人、羊、鸡这3种来源的单增李斯特氏菌进行聚类分析。2株来自于鸡的菌株相似度最高,而菌株4和5、6和7这2组的相似度在其次,菌株7来自于羊而另外3株来自于人,菌株1和2均来自于人,但是这2株菌的相似度最低(图3)。

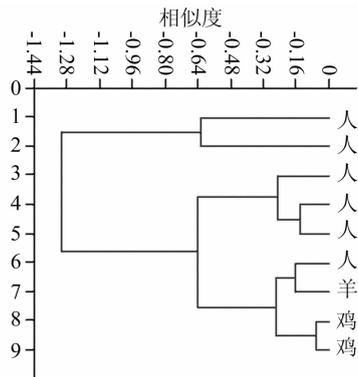


图3 基于动力学参数对不同来源单增李斯特氏菌聚类分析

由以上分析得出,即使都是来源于人的单增李斯特氏菌,其生长也存在差异。

图4以最大比生长速率和延滞期这两个参数做主成分分析,图4中L、M表示的是单增李斯特氏菌。从图中可以看出,*L. grayi*菌株与其他菌株的距离最远,这株菌与其他菌株差异最显著,但是由于目前实验室菌株有限,结果没办法验证,后续将进一步对其进行研究。而9株单增李斯特氏菌中

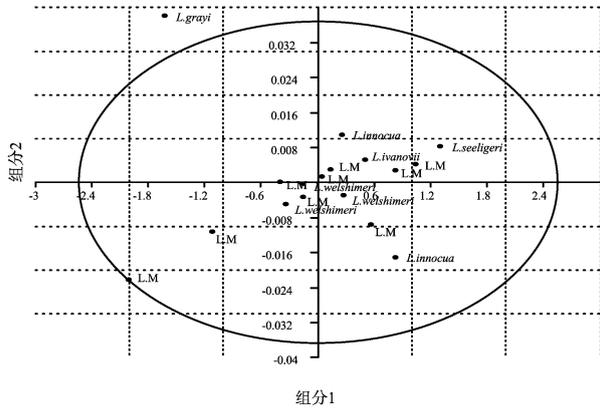


图4 基于动力学参数不同种属的李斯特氏菌主成分分析

有3株较分散,距离也相对较远,2株 *L. innocua* 菌株距离也较远,这些菌株并没有因为是同一种属而聚集在一起,以此判断李斯特氏菌的生长动力学与其种属无明确相关性。

3 结论

血清型为3a和4b的2株单增李斯特氏菌的延滞期存在显著性差异 ($P < 0.05$),血清型为6a和6b的2株英诺克李斯特氏菌的最大比生长速率存在显著差异 ($P < 0.05$),*L. grayi*菌株与其他菌株存在显著性差异 ($P < 0.05$),且17株菌株之间的动力学参数各不相同。

以上结果表明,只挑选1株菌株建立微生物预测模型会导致试验结果与实际情况存在偏差,那么这个模型所预测得到的参数就偏离实际情况从而导致风险评估的不准确性。所以,挑选模型菌株时,必须全面了解菌株的信息,并联系实际情况,选择合适的模型菌株。

参考文献:

[1] 朱献忠. 单核细胞增生性李斯特菌研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1333-1335.

[2] 沙拉麦提·吐尔逊太, 高涛, 阿依夏木, 等. 李斯特菌及其危害研究进展[J]. 地方病通报, 2006, 21(2): 97-99.

[3] Ayaz N D, Erol I. Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(5): 967-972.

[4] 曹际娟, 王耀, 王顺芝, 等. PCR-DHPLC技术快速检测食品中英诺克李斯特氏菌[J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2009, 32(2): 235-238.

[5] Volokhov D V, Duperrier S, Neverov A A, et al. The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(6): 1928-1939.

[6] McMeekin T A, Olley J, Ratkowsky D A, et al. Predictive microbiology: towards the interfaced beyond[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(2/3): 395-407.

[7] 胡洁云, 欧杰, 李柏林. 预报微生物学在食品安全风险评估中的作用[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1397-1403.

[8] Capita R, Alonso - Calleja C, García - Fernández M C, et al. Influence of strain and trisodium phosphate concentration on growth parameters of *Listeria monocytogenes in vitro* [J]. The Society for

Applied Microbiology, 2001, 32(6): 428-432.

[9] Díez - García M, Capita R, Alonso - Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 173-180.

[10] Begot C, Lebert I, Lebert A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions [J]. Food Microbiology, 1997, 14(5): 403-412.

[11] Lemaire S, Van Bambeke F, Tulkens P M. Cellular accumulation and pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of CEM-101, a novel fluoroketolide, against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila* in human THP-1 macrophages [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(9): 3734-3743.

[12] Lee H Y, Chai L C, Pui C F, et al. Profiling of recovery efficiencies for three standard protocols (FDA-BAM, ISO-11290, and modified USDA) on temperature-injured *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(9): 954-959.

[13] Munoz - Cuevas M, Fernandez P S, George S, et al. Modeling the period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under condition of fluctuating temperature and water activity values [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(9): 2908-2915.

[14] Theys T E, Geeraerd A H, Verhulst A, et al. Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella typhimurium* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 128(1): 67-77.

[15] 傅鹏, 李平兰, 周康, 等. 冷却肉中假单胞菌温度预测模型的建立与验证 [J]. 农业工程学报, 2008, 24(4): 229-234.

[16] Mataragas M, Drosinos E H, Vaidanis A, et al. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions [J]. Food Microbiology and Safety, 2006, 71(6): 157-167.

[17] 冯力. 回归分析方法原理及SPSS实际操作 [M]. 北京: 中国金融出版社, 2004.

[18] George S M, Metris A, Stringer S C. Physiological state of single cells of *Listeria innocua* in organic acids [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(2): 204-210.

[19] Pal A, Labuza T P, Díez - Gonzalez F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries [J]. Food Microbiology, 2008, 25(3): 460-470.

[20] Xiong R, Xie G, Edmondson A S, et al. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A [J]. Food Microbiology, 1999, 16(3): 269-279.

[21] Díez - García M, Capita R, Alonso - Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 173-180.

[22] Begot C, Lebert I, Lebert A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions [J]. Food Microbiology, 1997, 14(5): 403-412.