

高特异性单核细胞增生李斯特菌显色培养基性能研究

滕昆仑¹, 卢勉飞¹, 石小帆¹, 蔡芷荷¹, 吴清平², 张建明¹

1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070

摘要: 目的 研究不同分离培养基对纯菌及实际样品中单核细胞增生李斯特菌的分离效果。方法 根据 GB 4789.30—2010 单核细胞增生李斯特菌检验方法, 比较了本实验室制备的单核细胞增生李斯特菌显色培养基(L. MONO)、PALCAM 及 4 种商品化显色培养基(CHROMagar、厂家 I、厂家 II 和厂家 III) 的性能。结果 6 种培养基的选择性之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。L. MONO 和 III 最好, 其次为 CHROMagar 和厂家 I, 厂家 II 和 PALCAM 较差。49 份样品阳性率为 28.57%。L. MONO 和厂家 III 检出阳性符合率为 100%, 无假阳性和假阴性; CHROMagar 阳性符合率为 92.9%, 厂家 I 和厂家 II 阳性符合率最差, PALCAM 阳性样品完全检出, 但有太多假阳性。结论 L. MONO 性能达到甚至更优于 CHROMagar, 采用特异性更高的水不溶性显色剂可有效避免非特异性菌 β 葡萄糖苷酶的表达及脂肪沉淀环扩散引起的干扰和假阳性, 也能有效解决现有显色培养基制备中配套试剂混匀困难的问题, 是一种更为高效的单核细胞增生李斯特菌显色培养基。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 显色培养基; 分离; 鉴别

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2016)21-3114-04

Research on the chromogenic medium efficiency of high specific *Listeria monocytogenes*

TENG Kun-lun*, LU Mian-fei, SHI Xiao-fan, CAI Zhi-he, WU Qing-ping, ZHANG Jian-ming

* Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Company, Limited, Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract: Objective To evaluate the performance of different isolation medium in *Listeria monocytogenes* of pure bacteria and actual samples. **Methods** The performance of L. MONO chromogenic culture medium that made by our lab was compared with PALCAM and 4 commercial chromogenic media(CHROMagar, manufacturer I, II, III) according to GB 4789.30—2010 Food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*. **Results** The selectivity difference of the 6 selective media was statistical significance($P < 0.01$). L. MONO and III were the best, followed by CHROMagar and I, II and PALCAM were poor. The total positive rate of the 49 samples was 28.57%. The positive rate of L. MONO and III were all 100%, with no false positive and false negative. The positive rate of CHROMagar showed 92.9%. I and II had the worst positive rate. There were too many false positives of PALCAM although true positive samples were completely detected. **Conclusion** The performance of L. MONO was achieve even better than CHROMagar. By using the high specificity of water insoluble chromogenic agent, it can effectively avoid interference and false positive caused by nonspecific β glucosidase expression and lecithin halo spread. It also can effectively solve the difficulty in mixing the corollary reagent of the existing chromogenic media. L. MONO is a more efficient *Listeria monocytogenes* chromogenic medium.

Key Words: *Listeria monocytogenes*; Chromogenic medium; Isolation; Identification

李斯特菌属(*Listeria. spp*) 经常存在于各种动物和环境中, 来源于土壤和水中的李斯特菌可能污染人类消费品, 特别是即食食品^[1-2]。与其他常见致病菌相比, 单核细胞增生李斯特菌的感染率虽然较低, 但致死率高达 20%~50%^[3]。因此, 高效精确地从食品等样品中分离和鉴别出单核细胞增生李斯特菌, 对食品质量控制和疾病预防治疗有重要意义。ISO、FDA 及我国卫生部推荐的标准方法和替代方法是用 PAL-

CAM 和显色培养基进行检测和分离^[4-7]。传统的 PALCAM 经过长期的应用验证, 能有效地分离李斯特菌, 但无法区分致病和非致病的李斯特菌, 另外许多七叶苷阳性的菌也会产生大量的假阳性及干扰^[8]。近年来兴起的李斯特菌显色培养基, 采用属特异性 β -葡萄糖苷酶和磷脂酰肌醇或胆碱酶显色技术, 由于特异性较差, 实际样品检测中会产生较多的假阳性。平板制备时对磷脂酰肌醇或胆碱配套试剂要求严格, 温度过高会产生絮状物, 难以观察到菌落特征, 温度过低又易凝固而不能再次加热溶解。本实验室针对上述存在问题研发出新的单核细胞增生李斯特菌显色培养基, 通过对其性能进行探讨, 为食品中单核细胞增生李斯特菌的分离鉴别提供更好的方法。

基金项目: 广州市科技计划项目(201300000074)

作者简介: 滕昆仑(1982-) 男, 硕士, 中级工程师, 主要从事食品微生物快速检测及风险评估。

通讯作者: 吴清平, E-mail: wuqp203@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 单核细胞增生李斯特菌 43 株、其他李斯特菌 13 株、其他菌 73 株(包含链球菌 4 株、肠球菌 3 株、葡萄球菌 16 株、芽胞杆菌 14 株、肠杆菌科及真菌 36 株)由本实验室保存。

1.1.2 样品 食品样品 49 份(水产品 10 份、肉 11 份、青菜 14 份、巴氏奶 3 份、即食食品 4 份、冷冻食品 7 份)采自本地超市、市场及餐饮店。

1.2 仪器与试剂 AP4000 全自动螺旋接种仪(美国 SBI 公司); Smartcounter 自动菌落计数仪(广东环凯微生物科技有限公司); 脉冲均质器(广东环凯微生物科技有限公司); 电热恒温培养箱。LB₁ 增菌液(批号: E0323Y); LB₂ 增菌液(批号: E0340Y); PALCAM 平板(批号: E0462Y); 自制单核细胞增生李斯特菌显色培养基 L. MONO、Chromagar(批号: 000174)、厂家 I(批号: 150326)、厂家 II(批号: 20130515)、厂家 III(批号: E0330Y); MID Listeria 李斯特菌生化鉴定条(批号: B0042D)。

1.3 方法

1.3.1 目标菌的生长显色 冻干菌种复苏后取第三代新鲜培养 24 h 的单核细胞增生李斯特菌制成 0.5 麦氏浊度菌悬液, 10 倍梯度稀释至 10³ cfu/ml, 取 100 μl 螺旋接种到 L. MONO、PALCAM 和另外 4 种显色培养基平板上, 以 TSA 为参照, (36 ± 1) °C 培养 24 h 观察单核细胞增生李斯特菌在 6 种培养基上的生长情况。

1.3.2 非目标菌的特异性和选择性 将 13 株非单核细胞增生李斯特菌的脑心浸液过夜肉汤, 用 1 μl 接种环在平板上四区划线, (36 ± 1) °C 培养 24 h 观察菌特征。将 73 株其他菌的脑心浸液过夜肉汤, 用 1 μl 接种环在平板上平行划 6 条直线, 同时以 TSA 为参照, (36 ± 1) °C 培养 24 h。培养后按以下方法对培养基计算生长指数 G: 每条有比较稠密菌落生长的划线则 G 为 1, 每个培养皿上最多为 6 分。如果仅一半的线有稠密菌落生长, 则 G 为 0.5。如果划线上没有菌落生长、生长量少于划线的一半或菌落生长微弱, 则 G = 0。记录每个平板的得分总和得到 G。非目标菌的生长指数一般 G ≤ 1。

1.3.3 实际样品分离 以无菌操作取样品 25 g(ml) 加入含 225 ml LB₁ 增菌液的均质袋中, 脉冲均质 2 min。(30 ± 1) °C 培养 24 h, 取 0.1 ml 转接于 10 ml LB₂ 增菌液, (30 ± 1) °C 培养 24 h。取 LB₂ 增菌液划线接种于 PALCAM 和 5 种显色培养基上, (36 ± 1) °C 培养 24 h。单核细胞增生李斯特菌在 L. MONO 上典型菌落为蓝绿色光滑规则小菌落; 在 PALCAM 上典型菌落为小灰黑色菌落, 周围有棕黑色水解圈; 在其他李斯特显色培养基上为蓝绿色小菌落, 周围有乳白色脂肪沉淀环。

1.3.4 分离株的鉴定 每种平板各挑取 3 个单菌落进行革兰染色和氧化酶试验, 然后制成菌悬液, 采用 MID Listeria 生化鉴定条对 6 种培养基分离到的疑似菌株进行鉴定。

2 结果

2.1 目标菌的生长显色 43 株单核细胞增生李斯特菌在 L. MONO 上呈现蓝绿色光滑规则小菌落; 在 PALCAM 上黑色小菌落, 周围培养基上有黑色素圈, 有些菌落中心凹陷; 在另外 4 种显色培养基上为蓝绿色光滑规则小菌落, 周围有乳白色脂肪沉淀环。

2.2 非目标菌的特异性和选择性 13 株非单核细胞增生李斯特菌在 6 种培养基上的特征见表 1。在 L. MONO 上伊氏李斯特菌显出与单核细胞增生李斯特菌相同的蓝绿色, 其他李斯特菌为无色菌落, 能与单核细胞增生李斯特菌明显区分。在 CHROMagar、厂家 I、厂家 II、厂家 III 4 种显色培养基上伊氏李斯特菌为蓝绿色菌落, 周围有乳白色脂肪沉淀环, 其他的李斯特菌为蓝绿色菌落无乳白色沉淀环, 在与单核细胞增生李斯特菌或蜡样芽胞杆菌等卵磷脂酶阳性的菌同时存在时易引起干扰。

在 PALCAM 上伊氏李斯特菌与其他李斯特菌和单核细胞增生李斯特菌一样呈黑色小菌落, 周围有黑色晕圈, 部分菌落中心凹陷, 无法将单核细胞增生李斯特菌及伊氏李斯特菌与其他非致病性李斯特菌区分。

73 株非李斯特菌包含葡萄球菌属、芽胞杆菌科、肠球菌属、链球菌属、肠杆菌科、假单胞菌属、弧菌属、念珠菌、酵母菌、霉菌。在 L. MONO 上 4 株不能完全抑制, 分别为 1 株金黄色葡萄球菌、1 株梭状芽胞杆菌、1 株坚强芽胞杆菌、1 株大肠埃希菌, 但均为无色菌落, 能与单核细胞增生李斯特菌明显区分; PALCAM 上 29 株不能抑制, 分别为葡萄球菌 16 株、芽胞杆菌 12 株、大肠埃希菌 1 株, 芽胞杆菌为黑色菌落, 周围有黑色晕环与目标菌菌落相近, 难以区分; 在 CHROMagar 和厂家 I 上均有 8 株不能抑制, 分别为葡萄球菌 2 株、芽胞杆菌 5 株、大肠埃希菌 1 株, 其中 3 株蜡样芽胞杆菌显蓝绿色较大菌落, 周围有乳白色脂肪沉淀环, 1 株梭状芽胞杆菌与 1 株坚强芽胞杆菌显蓝绿色较大菌落; 厂家 II 有 27 株不能抑制, 分别为葡萄球菌 16 株、芽胞杆菌 10 株、大肠埃希菌 1 株, 其中 3 株蜡样芽胞杆菌显蓝绿色较大菌落, 周围有乳白色脂肪沉淀环, 1 株梭状芽胞杆菌、1 株坚强芽胞杆菌显蓝绿色较大菌落; 厂家 III 有 4 株不能抑制, 分别为 1 株金黄色葡萄球菌、1 株梭状芽胞杆菌、1 株坚强芽胞杆菌、1 株大肠埃希菌, 其中梭状芽胞杆菌和坚强芽胞杆菌为较大蓝绿色菌落。L. MONO 及 CHROMagar、厂家 I、厂家 II、厂家 III 4 种显色培养基对芽胞杆菌属、葡萄球菌属等抑制较差。方差分析结果表明 6 种培养基的选择性之间差异有统计学意义($P < 0.01$),

L. MONO 和厂家Ⅲ最好(94.52%) ,其次为 CHROMagar(89.04%) 和厂家 I (89.04%) ,厂家Ⅱ(63.01%) 和 PALCAM(60.27%) 较差。

表 1 13 株非单核细胞增生李斯特菌在 6 种培养基上的特征

细菌名	菌株数(株)	L. MONO	PALCAM	CHROMagar	厂家 I	厂家Ⅱ	厂家Ⅲ
伊氏李斯特菌 <i>Listeria ivanovii</i>	2	B	BLACK	B/HALO	B/HALO	B/HALO	B/HALO
西氏李斯特菌 <i>Listeria seeligeri</i>	2	C	BLACK	B	B	B	B
格氏李斯特菌 <i>Listeria grayi</i>	2	C	BLACK	B	B	B	B
威尔士李斯特菌 <i>Listeria welshimeri</i>	2	C	BLACK	B	B	B	B
英诺克李斯特菌 <i>Listeria innocua</i>	5	C	BLACK	B	B	B	B

注: B: 蓝绿色; C: 无色; HALO: 脂肪水解圈阳性。

2.3 实际样品分离 综合所有培养基分离及鉴定结果 49 份样品中共检出 14 份阳性,阳性率为 28.57%。L. MONO 分离到 14 份阳性,目标菌为蓝绿色小菌落,背景菌为无色。PALCAM 分离到 21 份阳性,黑色菌落周围有黑色晕环。CHROMagar 分离到 13 份阳性,厂家 I 分离到 11 份阳性,厂家Ⅱ只分离到 6 份阳性,厂家Ⅲ分离到 14 份阳性,目标菌为蓝绿色小菌落,周围有乳白色脂肪沉淀环,背景菌中有大量蓝绿色菌落和无色菌落。

14 份阳性样品中,水产品 3 份(鲑鱼、罗非鱼、黄花鱼)、肉类 2 份(肉糜、猪肉)、蔬菜 3 份(香菇 2、金针菇)、巴氏奶 1 份、冷冻产品 4 份(冻羊肉卷、冻鸡腿、冻鸡翅 2),单核细胞增生李斯特菌在多种食品基质中均存在,在冷冻产品中污染机率相对较高,这与其本身耐低温的习性有一定关系。其中 L. MONO 单核细胞增生李斯特菌显色培养基和厂家Ⅲ李斯特菌显色培养基分离的 14 份阳性样品上的可疑菌株,经鉴定为单核细胞增生李斯特菌,检出率为 28.57%,阳性符合率为 100%,无假阳性和假阴性;PALCAM 传统培养基检出的 21 份阳性样品中 14 份确认阳性,检出率为 42.86%,阳性符合率为 100%,假阳性率为 33.3%;CHROMagar 检出的 13 份疑似阳性样品经确认均为阳性,检出率为 26.53%,阳性符合率为 92.9%;厂家 I 分离到的 11 份阳性样品均确认为阳性,检出率为 22.45%,阳性符合率为 78.6%;厂家Ⅱ分离到的 6 份疑似阳性样品确认均为阳性,检出率为 12.24%,阳性符合率为 42.8%,假阴性率为 57.2%。

3 讨论

传统培养基 PALCAM 是基于 Van 等人研究开发的用于从食品样品中分离李斯特菌属的成熟培养基^[9]。国内外标准均推荐此培养基用于分离单核细胞增生李斯特菌和其他李斯特菌。所有李斯特菌均能水解七叶苷形成棕黑色复合物,无法区分致病性单核细胞增生李斯特菌与其他李斯特菌。葡萄球菌、链球菌、肠球菌、芽胞杆菌等在 PALCAM 上能生长的七叶苷阳性菌也会产生与单核细胞增生李斯特菌相近的特征,很难区分。在实际样品检测中,PALCAM 特

异性差的问题会极大增加用于后续鉴定的人力、物力、财力,检验效率低下。

李斯特菌显色培养基以李斯特菌属特有的 β-葡萄糖苷酶和单核细胞增生李斯特菌及伊氏李斯特菌特有的磷脂酰肌醇/磷脂酰胆碱酶开发,所有李斯特菌本身显蓝绿色菌落,单核细胞增生李斯特菌/伊氏李斯特菌水解磷脂酰肌醇/磷脂酰胆碱产生水不溶性脂肪,在菌落周围形成乳白色沉淀环,伊氏李斯特菌虽然特征与单核细胞增生李斯特菌一致,但只对动物致病,在食品中极少见,因此李斯特菌的显色培养基能够有效将致病性的单核细胞增生李斯特菌与无害李斯特菌区分开来,特异性明显比 PALCAM 高^[10-15]。现行国内外标准中也推荐李斯特菌显色培养基与 PALCAM 配合使用,这有利于减少样品中存在的其他李斯特菌和背景菌对单核细胞增生李斯特菌检测的掩盖问题,从而最大限度地减少漏检的风险。很多其他菌也是 β-葡萄糖苷酶阳性^[16-17],显蓝绿色菌落,当单核细胞增生李斯特菌产生的乳白色沉淀环扩散时极易引起 β-葡萄糖苷酶阳性菌的假阳性。

L. MONO 以单核细胞增生李斯特菌的磷脂酰肌醇特异性磷脂酶(PI-PLC) 毒力因子作为特异性酶,酶底物水可溶,显色基团附着在菌落上显蓝绿色,其他李斯特菌及杂菌为无色。色素不在培养基中扩散,不易引起干扰。水溶性显色底物包含在基质中,省去了将磷脂酰肌醇/磷脂酰胆碱混匀成均一悬液的过程,倾注平板时对温度要求相对较低,培养基的制备更便捷易操作。通过加入磷霉素钠、萘啶酮酸等抑菌剂抑制芽胞杆菌的生长,其选择性更高。单核细胞增生李斯特菌显色培养基 L. MONO 能有效解决特异性及现有显色培养基制备中配套试剂混匀困难的问题及杂菌的干扰,是一种更为高效的分离和鉴别单核细胞增生李斯特菌的显色培养基。

参考文献

[1] Doyle MP, Beuchat LR. Food microbiology fundamentals and frontiers[M]. 3rd ed. Washington, D. C: American Society for Microbiology, 2007: 783-794.

(下转第 3120 页)

Phuangthip 于 2000 年 - 2002 年证实在海产品中检出的副溶血性弧菌中产毒株仅占 5.3% [7], 提示要确定导致发病的菌株和流行株, 还应确认患者和食品中分离到的细菌是否具有同样产毒基因型。

到目前为止, 国内外针对副溶血性弧菌 TDH 的检测应用研究, 大多数采用的是分子生物学技术, 如多重 PCR、实时 PCR、核酸杂交和斑点 ELISA 等利用免疫学技术的研究不多。还未见有使用分子克隆技术结合磁性荧光纳米标记技术用于副溶血性弧菌 TDH 的检测报道。本研究选取副溶血性弧菌特异性的 TDH 作为检测靶基因, 利用 PCR 技术对副溶血性弧菌 TDH 基因进行扩增, 通过基因克隆技术, 再结合磁性荧光纳米颗粒标记技术, 灵敏度可达到 10 cfu/ml。通过与其他非靶细菌实验验证, 结果显示所建立的方法特异性非常高, 可以 100% 检测出产 TDH 副溶血性弧菌。

此外, 还对该方法进行了敏感性试验。实验模拟不同种类样品进行敏感性试验, 模拟样品中产 THD 的副溶血性弧菌浓度为 1 cfu/ml ~ 10⁵ cfu/ml, 灵敏度比事先研究的食品污染物中产 SEB 的金黄色葡萄球菌试纸条灵敏度提高了 100 倍。由于该技术具有高效、高通量、低成本和速度快等优点, 目前该试剂正在

测试, 可以说是食源性致病菌快速检测技术的重要开发方向。

参考文献

[1] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 871 - 942.
 [2] 陈洪友, 陈敏, 盛跃颖, 等. 副溶血性弧菌食源性疾病暴发分离株的血清型、核糖型及毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 114 - 119.
 [3] 向辉, 朱海, 刘钢, 等. 5 种食源性致病微生物毒力基因重组质粒的构建、克隆表达与表达产物的研究[J]. 华南预防医学, 2014, 40(5): 409 - 415.
 [4] 向辉, 朱海, 孙世宏, 等. 荧光纳米颗粒标记技术快速检测产 enterotoxin B 金黄色葡萄球菌的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(9): 1359 - 1362.
 [5] 代敏, 王大鹏, 陈万义, 等. 副溶血弧菌临床分离株的血清分型及毒力基因分析[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 159 - 164.
 [6] Nishibuchi M, Kaper JB. Termostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infect Immun, 1995, 63(6): 2093 - 2099.
 [7] Bhoopong P, Palittapongarnpim P, Pomwised R, et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5): 1544 - 1550.

收稿日期: 2016 - 06 - 12

(上接第 3116 页)

[2] Gombas DE, Chen Y, Clavero RS, et al. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. J Food Prot, 2003, 66(4): 559 - 569.
 [3] 默里 PR, 巴伦 EJ, 法勒 MA, 等. 临床微生物学手册[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 478.
 [4] International Organization for Standardization. ISO 11290 - 1: 1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method[S]. Switzerland: International Organization for Standardization, 1996.
 [5] International Organization for Standardization. ISO 11290 - 2: 1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method[S]. Switzerland: International Organization for Standardization, 1998.
 [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.30-2010 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
 [7] U. S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998[S]. Maryland: U. S. Food and Drug Administration, 2015.
 [8] Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes* [J]. Industrie Alimentari, 1997, 6(1): 16 - 18.
 [9] Netten PV, Perales I, Moosdijk AVD, et al. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp [J]. Int J Food Microbiol, 1989, 8(4): 299 - 316.
 [10] Hegde V, Leon - Velardea CG, Stam CM, et al. Evaluation of

BBL CHROMagar *Listeria* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples[J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(1): 82 - 87.
 [11] Ritter V, Dick N, Sturm K, et al. Comparison of BBL™ CHROMagar™ *Listeria* to currently recommended media for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food sources [C]. The 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, D. C., 2003.
 [12] Vlaemyneck G, Lafarge V, Scotter S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium [J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(3): 430 - 441.
 [13] Greenwood M, Willis C, Doswell P, et al. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food [J]. J Appl Microbiol, 2005, 99(6): 1340 - 1345.
 [14] Reissbrodt R. New chromogenic plating media for detection of pathogenic *Listeria* spp. - an overview [J]. Inter J Food Microbiol, 2004, 95(1): 1 - 9.
 [15] Stessl B, Luf W, Wagner M, et al. Performance testing of six chromogenic ALOA - type media for the detection of *Listeria monocytogenes* [J]. J Appl Microbiol, 2009, 106(2): 651 - 659.
 [16] Angelidis AS, Kalamaki MS, Georgiadou SS. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β - d - glucosidase - positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA) [J]. Inter J Food Microbiol, 2015, 193(16): 114 - 129.
 [17] Park SH, Chang PS, Ryu S, et al. Development of a novel selective and differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(3): 1020 - 1025.

收稿日期: 2016 - 03 - 28