

涂布平板计数法与 MPN 法定量检测禽肉和蛋中沙门菌的比较

王晓英 余东敏 刘秀梅

(中国疾控中心营养与食品安全所, 北京 100050)

摘要:为选择良好的禽肉和鸡蛋中沙门菌定量检测方法,通过染菌实验,分析比较了涂布平板计数法和 MPN 法,结果表明平板计数法优于 MPN 法。应用平板计数法检测了 16 份鸡蛋和 26 份禽肉试样。沙门菌检出限分别为 1 CFU/ml 和 100 CFU/g。16 份蛋类试样中均未检出沙门菌。26 份鸡肉试样中,20 份为沙门菌阳性,阳性率为 77%。其中 9 份试样沙门菌数低于检出限 100 CFU/g,其余试样菌数范围为 $1.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/g。对 3 份 -20℃ 保存 5 d 的阳性禽肉试样应用 MPN 法进行了冷冻前后沙门菌含量的比较分析,储存后的菌数比冷冻前略有增加。实验结果表明,在食物试样中杂菌污染严重或沙门菌水平较低的情况下,平板法不能准确进行沙门菌计数,仍需进行 MPN 定量检测。

关键词:家禽;卵;沙门氏菌属;微生物学技术

Quantitative detection of *Salmonella* in poultry and shell eggs from retail market by PCA and MPN methods

WANG Xiao-ying, YU Dong-min, LIU Xiu-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: To develop a quantitative method for detecting *Salmonella* in poultry and shell eggs, comparison and analysis of the results of inoculation experiments were performed by using the plate count agar (PCA) method and the Most Probable Number (MPN) method. It indicated that PCA method was superior to MPN method. 16 shell egg samples and 26 raw chicken samples from a supermarket in Beijing were examined by using PCA method. The detection limits of *Salmonella* were 1 CFU/ml for eggs and 100 CFU/g for poultry. All the egg samples were *Salmonella* negative and 20 out of the 26 chicken samples were *Salmonella* positive. The contamination rate of chicken samples was 77%. The contamination level of 9 poultry samples was less than the detection limit 100 CFU/g. The contamination levels of other positive poultry samples were in the range of $1.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/g. Comparison and analysis of *Salmonella* amounts in the 3 positive poultry samples before and after freezing and kept at -20℃ for 5 d were performed by using MPN method. The *Salmonella* levels after freezing were a little higher than before. It proved that PCA method was not able to count *Salmonella* colonies accurately if the sample was heavily contaminated by other microorganisms. MPN method could be an alternative in this case.

Key Words: Poultry; Ovum; *Salmonella*; Microbiological Techniques; MPN

沙门菌病是一种人兽共患病,生肉、蛋、奶,尤其是禽肉为沙门菌感染的主要媒介^[1,2]。近年来,沙门菌食物中毒频频发生^[3],成为国际关注的主要问题^[4-16]。统计资料表明,我国沙门菌食物中毒居微生物性食物中毒之首,给人类和动物健康及食品安全造成严重威胁。

为提高我国高危食品(禽肉、蛋类)中沙门菌污染的检测水平,对沙门菌食物中毒发病率等进行定量危险性评估,从而为保证食品安全,预防和降低食物中毒发病率提供新的科学技术手段。我们改进并分析比较了两种禽肉和鸡蛋中沙门菌定量检测方法,并对部分市售试样进行了定量检测。

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A03);社会公益研究(2002DIA30016)

作者简介:王晓英 女 博士

通讯作者:刘秀梅 女 首席科学家

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds (2001BA804A03) and the Special Funds (2002DIA30016) of Ministry of Science and Technology, China.

1 材料和方法

1.1 菌株、试样

16 份鸡蛋和 26 份鸡肉试样分别采自北京某食品超市,采集当天进行检样。肠炎沙门菌菌株(菌号为 50041)中国药品生物制品检定所医学菌种保藏中心提供。

仪器、培养基和试剂 拍击式均质器,BA Gmix-er-400,法国;缓冲蛋白胨水、乳糖肉汤、氯化镁孔雀绿(MM)增菌液和 CHROMagar 沙门菌显色培养基,均购自北京陆桥公司。

1.2 试样的制备及检测方法

1.2.1 带壳蛋的定量检测 用流水冲洗禽蛋并拭干,浸泡于 75%酒精后,打开蛋壳,将蛋清和蛋黄倒入无菌塑料袋中,用均质器拍击 1 min,制成悬液。无菌操作取 25 ml 悬液加入 100 ml 缓冲蛋白胨水(BPW),制成 1:5 倍稀释液。同时用缓冲蛋白胨水制成 1:10 倍稀释液。分别取原液、1:5 和 1:10 稀释液各 0.2 ml,涂布于 CHROMagar 沙门菌显色平板,(35 ±1) 培养 18~24 h 后进行平板计数。

1.2.2 禽肉的定量检测 无菌称取 25 g 试样,加入 225 ml 无菌乳糖肉汤,制成 1:10、1:100、1:1000 等系

列稀释液,取不同稀释液各 0.1 ml,涂布于 2 个 CHROMagar 沙门菌平板上,(36 ±1) 培养 18~24 h,进行平板计数。

1.2.3 MPN 法 按照美国 FDA 细菌学分析手册(BAM)进行^[6]。

1.3 模拟污染试样的检测

分别取 2 份平行的沙门菌定性检测均为阴性的鸡蛋和冷冻禽肉、新鲜禽肉试样,1 份接种菌液,使菌的终浓度分别为 360 CFU/ml、120 CFU/ml 和 18 CFU/ml,另 1 份不接种,作为阴性对照。平板计数法的试样制备、检测及 MPN 测定方法同上。

1.4 冷冻前后试样中沙门菌数量的比较

将 3 份沙门菌阳性的禽肉试样,置 -20 保存 5 d。分别同时进行平板计数和 MPN 法测定,比较冷冻储存前后试样中沙门菌数的变化。

2 结果

2.1 染菌实验及最低检出限

采用 PCA 平板计数测定沙门菌最低检出限。蛋和禽肉试样分别为 1 CFU/ml 和 100 CFU/g。模拟污染试样的检测结果见表 1。

表 1 不同试样染菌实验检测结果

方法	蛋样			冷冻禽肉			鲜禽肉		
	对照	染菌浓度	检测菌量	对照	染菌浓度	检测菌量	对照	染菌浓度	检测菌量
PCA (CFU/ml)	<1	360	150	<100	120	100	<100	18	10
MPN (MPN/ml)	<0.03	360	11	<0.03	120	24	<0.03	18	2.3

蛋样、冷冻和新鲜禽肉试样的染菌实验表明,平板计数法测得的结果接近于染菌的起始浓度,结果相差 1.2~2.4 倍,小于 1 个数量级。MPN 法所得结果远低于染菌的起始浓度,结果相差 8~30 倍。

2.2 冷冻前后试样中沙门菌数量的变化

为探讨冷冻储存对沙门菌损伤的影响,对定性检测阳性的 3 份禽肉试样 1、3 和 5 号,置 -20 存放 5 d。测定储存前后的菌数变化情况。结果发现,-20 保存后的试样中沙门菌的数量仍有增加。保存 5 d 后,菌数增加了 1 倍,见表 2。

表 2 沙门菌阳性试样于 -20 储存前后的 MPN 值

试样号	MPN/g(前)	MPN/g(后)
1	<0.3	<0.3
3	4.3	9.3
5	2.3	4.3

2.3 试样的检测结果 对 16 份鸡蛋和 26 份禽肉试样进行沙门菌定性检测,同时对阳性试样中沙门菌含量进行了平板计数。从表 3 和表 4 的检测结果可以看出,蛋类试样中均未检出沙门菌,20 份鸡肉试样沙门菌阳性。鸡肉试样的污染状况严重,而其

中鸡胸肉的检出阳性率居首位,为 86%,总的鸡肉检出阳性率高达 77%。

表 3 沙门菌定性检测结果

试样	数量	阳性数	阴性数	阳性率(%)
鸡蛋	16	0	16	0
鸡肉	26	20	6	77
鸡腿	10	7	3	70
鸡胸	7	6	1	86
整鸡	9	7	2	78

表 4 沙门菌阳性试样平板计数检测结果

试样	CFU/g			
	<10 ²	1.5 × 10 ² ~ 10 ³	4.5 × 10 ³ ~ 10 ⁴	1.0 × 10 ⁴ ~ 2.5 × 10 ⁵
鸡腿肉	4	0	1	2
鸡胸肉	2	2	2	0
整鸡	3	0	0	4
合计	9	2	3	6

沙门菌阳性试样定量检测结果表明,在 20 份被沙门菌污染的鸡肉试样中,有 9 份试样的菌数低于检出限 100 CFU/g,其余试样菌数范围为 1.5 × 10² ~ 2.5 × 10⁵ CFU/g。7 份污染的整鸡试样中有 4 份沙门菌的含量高达 1.0 × 10⁴ ~ 2.5 × 10⁵ CFU/g。

国内保健食品常用益生菌株的耐药性分析

徐进 刘秀梅

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为了解益生菌保健食品中益生菌的耐药性,采用 E-Test 方法,对中国益生菌保健品市场上常用的菌株进行耐药检测。所用抗生素为抑制细菌细胞壁、细菌核酸合成和蛋白质合成的 13 种耐药实验常用抗生素(阿莫西林/可克拉维、万古霉素、复方新诺明、甲氧苄胺嘧啶、庆大霉素、氯霉素、链霉素、四环素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、萘啶酮酸、头孢曲松和头孢噻吩)。结果表明:在检测的 12 株益生菌中,除动物双歧杆菌 FDBb-12 耐受 2 种抗生素外,其余菌株分别耐受 3~9 种抗生素,属于多重耐药菌。耐药的主要模式为丁胺卡那霉素(12/12)、卡那霉素(12/12)、萘啶酮酸(11/12)、复方新诺明(10/12)、甲氧苄胺嘧啶(9/12)和万古霉素(7/12)。其中,罗伊氏乳杆菌的耐药性最强,对 13 种抗生素中的 9 种耐药。建立并加强国内益生菌的安全评价和耐药性监测体系是必要而迫切的。

关键词:有益菌种;抗药性;微生物;营养保健品

3 讨论

本研究从北京食品超市采集了 16 份蛋试样和 26 份鸡肉试样。蛋试样中均未检出沙门菌,与国际相关报道不甚一致,有待进一步研究。鸡肉试样中,有 20 份沙门菌阳性,阳性率为 77%,表明禽肉沙门菌污染比较严重。整鸡试样的污染率为 78%,而 57% 的阳性试样中的沙门菌含量高达 $1.0 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/g,提示鸡肉生产环节可能存在卫生问题。

参照美国 FDA 细菌学分析手册^[6]和国标^[7]的方法,本研究改进的蛋和禽肉试样中沙门菌平板计数检测法,最低检出限分别为 1 CFU/ml 和 100 CFU/g。冷冻后试样中沙门菌数量的增加,可能是在 -20℃ 沙门菌仍在缓慢增殖,或者是在检样过程中,室温放置时间过长的缘故。

本研究运用的 MPN 法是以美国 FDA 细菌分析手册(BAM)为基础的,与国内直接用增菌培养基 MM 配置 9 管相比,该研究以乳糖肉汤配制 9 管,增加了前增菌步骤,使损伤细胞得以恢复,提高了检出效果。我们采用美国 FDA 细菌分析手册(BAM)中修订的试样中最可能菌数表示为 MPN/g(ml),而未采用国标的 MPN/100 g(ml)^[7],这样的表示结果更为准确。

本次对比研究的结果表明,在食物试样中杂菌污染程度小或沙门菌污染水平较高的情况下,平板

计数法优于 MPN 法,这对食物试样中沙门菌的定量检测是非常适用的。但在杂菌污染严重、而且沙门菌的污染水平非常低的情况下,由于平板法没有前增菌和选择性增菌步骤,杂菌会严重干扰可疑沙门菌菌落的识别和鉴定,不能准确进行沙门菌计数。因此,相比之下,尽管 MPN 法操作复杂,但仍不失为杂菌污染严重食物试样中沙门菌的常规检测方法。

参考文献

- [1] Hope B K, Baker A R, Edel E D, et al. An overview of the *Salmonella enteritidis* risk assessment for shell eggs and egg products[J]. Risk Anal, 2002, 22:203.
- [2] Stock K, Stolle A. Incidence of *Salmonella* in minced meat produced in a European Union approved cutting plant[J]. J Food Prot, 2001, 64:1435.
- [3] Bauml A J, Hargis B M, Tsolis R M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks[J]. Science, 2000, 287:50.
- [4] Rabsch W, Tschape H, Bauml A J. Non-typhoidal Salmonellosis: emerging problems[J]. Microb Infect, 2001, 3:237.
- [5] William Horwitz. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edit. Vol I[Z].
- [6] U. S. FDA Bacteriological Analytical Manual Edit[Z]. 2001.
- [7] GB/T 4789.1~4789—1994. 食品卫生检验方法微生物部分[S].

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;R378.22;TS251.55 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0106-03

作者简介:徐进 男 博士