

研究报告

沙门氏菌检验用培养基的质量控制标准研究

陈怡文,张晓东,余文,任秀,刘娜,崔生辉
(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 通过筛选沙门氏菌检验用培养基的质控菌株,为 GB 4789.28—2013 标准的修订和企业培养基的质控提供依据。方法 使用 GB 4789.28 中规定的菌株及从食品中分离的 9 株沙门氏菌,分别为纽波特沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、布里丹沙门氏菌、科特布斯沙门氏菌、亚利桑那肠沙门氏菌、都柏林沙门氏菌、阿贡纳沙门氏菌和鸭沙门氏菌,通过定量和半定量方法测试 10 种不同品牌的 RV 肉汤、亚硒酸盐胱氨酸增菌液、四硫磺酸钠亮绿培养基和亚硫酸铋琼脂、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐分离培养基的生长率和选择性的差异,以评价市场现有培养基的质量差异及 GB 4789.28—2013 中所用的质控菌株是否能满足沙门氏菌培养基的质量控制。结果 结果显示用同一菌株进行检测时,不同品牌的培养基的生长率和选择性存在差异,且猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)和亚利桑那肠沙门氏菌(*Salmonella arizona*)对培养基的质量有更高的要求。结论 建议培养基生产企业及微生物实验室在培养基检验过程中,使用从食品中分离出的,对培养基质量要求高的质控菌株,同时质控方法应予以高度规范化,以保障检验数据稳定、可靠。

关键词:培养基;质量控制;沙门氏菌;食品

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)03-0491-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.03.015

Study on the quality control standard of culture medium for *Salmonella*

CHEN Yiwen, ZHANG Xiaodong, YU Wen, REN Xiu, LIU Na, CUI Shenghui

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective The purpose of this study was to provide basis for the revision of GB 4789.28—2013 and the quality control of culture media by screening the quality control strains of culture media for *salmonella* test. **Methods** The strains specified in GB 4789.28 and 9 salmonella strains (*Salmonella newport*, *salmonella infantis*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella blegdam*, *Salmonella kottbus*, *Salmonella arizona*, *Salmonella dublin*, *Salmonella agona*, *Salmonella anatis*) isolated from real food were used to test the growth rate and selectivity of 10 different brands of media including Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment, Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth Base enriched broth, Bismuth Sulfite Agar, Hektoen Enteric Agar, Xylose Lysine Desoxycholate Agar by quantitative and semi-quantitative methods. It was evaluated whether the quality control strain used in GB4789.28—2013 could meet the quality control of salmonella media. **Results** The results showed that the growth rate and selectivity of different media brands were different when the same strain was used, and *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella arizonae* had higher requirements on the quality of media. **Conclusion** It is suggested that medium production enterprises and microbiology laboratories should use strains isolated from food with higher quality requirement in medium testing, and the quality control methods should be highly standardized to ensure the stability and reliability of test data.

Key words: Medium; quality control; *Salmonella*; food

沙门氏菌(*Salmonella*)为革兰氏阴性杆菌,广泛

存在于宠物、家畜和禽类等动物中,是造成人类腹泻的主要原因之一^[1-2]。沙门氏菌感染患者可呈现急性腹泻、发热、恶心或皮肤及皮下组织的化脓性炎症、心内膜炎、关节炎、脑膜炎等症状,通常病程持续 2~7 d,部分人感染后也可呈无症状带菌状态,但可加重患者其他疾病,也可增加幼儿、老人和免疫力低下者的死亡率^[3-6]。根据美国疾病控制与预防中心报告显示美国每年约有 135 万人次感染沙

收稿日期:2021-12-06

基金项目:科技部“食品安全关键技术研发”重点专项(2017YFC1601400)

作者简介:陈怡文 女 助理研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: cyw5437@126.com

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为生物与食品安全

E-mail: cuishenghui@aliyun.com

门氏菌,在中国每年有超过 300 万人次感染沙门氏菌^[7-9]。沙门氏菌感染通常是由于人类食用了被沙门氏菌污染的食物,所以提高食品中沙门氏菌的检出率是控制感染沙门氏菌的关键因素。检测食品中沙门氏菌的方法为先通过增菌培养基来富集食品中的沙门氏菌,再经过选择性分离培养基进行分离和生化鉴定。培养基的质量是影响沙门氏菌检出率的主要因素。

《中华人民共和国食品安全法》规定国家食品安全标准具有强制性,GB 4789 系列方法为我国食品微生物国家食品安全标准检验方法,其中《GB 4789.4—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检测》(以下简称 GB 4789.4)规定了食品中沙门氏菌检测所用培养基,而《GB 4789.28—2013 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》(以下简称 GB 4789.28)中则规定了沙门氏菌检测用培养基的质量要求^[10-11]。虽然上述标准对检验过程和试剂进行了规范,但在实际的检验过程中发现个别沙门氏菌很难在培养基上生长,或不能生长,对食品中致病菌的检出存在严重风险。鉴于《GB 29921—2021 食品安全国家标准 食品中致病菌限量》中对沙门氏菌的限量值进行了明确规范,为保证实验室结果的真实可靠,急需对 GB 4789.28 中质控菌范围进行重新定义,同时对质控方法的规范性进行探讨^[12]。本文增加培养基质量验收的 9 株沙门氏菌均来自于实验室对食品样品检验中检出

的菌株,同时检验培养基品牌覆盖市场所能购买的全部培养基品牌。鉴于半定量评价方法的不稳定性,本次研究全部采用定量方法,尽量减少实验过程中的不稳定因素。本次试验通过对沙门氏菌培养基质控菌株的研究,能够进一步提高致病菌的检出率,最大限度降低食品安全风险。

1 材料与方法

1.1 培养基与菌种

本实验室以客户角色从市场上购买了不同品牌的选择性增菌液体培养基和选择性分离固体培养基。选择性增菌液体培养基包括:RV 肉汤(Rappaport vassiliadis salmonella enrichment, RV)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(Selenite cystine broth, SC)、四硫磺酸钠亮绿培养基(Tetrathionate broth base, TTB),品牌编号分别为:A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 J,其中只有 RV 肉汤含有 J 品牌,该肉汤缺少 A 和 I 品牌;SC 增菌液没有 I 品牌。

选择性分离固体培养基,包括:亚硫酸铋琼脂(Bismuth sulfite agar, BS)、HE 琼脂(Hektoen enteric agar, HE)、木糖赖氨酸脱氧胆盐(Xylose lysine desoxycholate agar, XLD),分别编号为:A、B、C、D、E、F、G、H 和 I,HE 琼脂没有 H、I 品牌。

用于接菌量计数的胰酪大豆胨琼脂培养基(Soybean casein digest agar plate, TSA)购自美国 BD 公司。

表 1 培养基名称及品牌编号

Table 1 The medium name and brand

| 培养基种类 | 培养基名称 | 培养基品牌编号 | | | | | | | | | |
|------------|-------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
| 选择性增菌液体培养基 | RV | × | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | × | √ |
| | SC | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | × | × |
| | TTB | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | × |
| 选择性分离固体培养基 | BS | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | × |
| | HE | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | × | √ | × |
| | XLD | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | × |

注:A、B、C、D、E 为中国品牌培养基,F、G、H、I、J 为外国品牌培养基

培养基评价用菌株见表 1,目标菌序号 1~3 和非目标菌序号 13~15 为 GB 4789.28 标准中规定的培养基质控用菌株,目标菌 4~12 为新增加的 9 株沙门氏菌,菌株均来自中国食品药品检定研究院实验室食品样品检测分离株。部分菌株申请了“CMCC”编号,部分菌株使用的是本实验室的“FC”编号。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备

参照 GB 4789.28 中的工作菌悬液的制备中的要求进行操作。

1.2.2 接种

将 1.2.1 制备的菌悬液取 50 μ L 用涂布接种至待测培养基和 TSA 平板上,36 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 h \pm 2 h,其中 TTB 增菌液需 42 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 24 h \pm 2 h,BS 培养基 36 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 48 h \pm 2 h,进行计数。目标菌每板接种水平为 50~150 CFU,非目标菌每板接种水平为 1 000~5 000 CFU。

1.2.3 选择性分离固体培养基的目标菌生长率定量计算

取出待测培养基及 TSA 参比培养基,选择菌落数在 20~200 CFU 的平板按照以下公式计算生长率

表2 质控菌株信息

Table 2 The information of salmonella strains

| 序号 | 菌株名称 | 菌株编号 | 拉丁名 |
|----|-----------|---------------|--------------------------------|
| 1 | 伤寒沙门氏菌 | CMCC (B)50071 | <i>Salmonella typhi</i> |
| 2 | 鼠伤寒沙门氏菌 | ATCC 14028 | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| 3 | 福氏志贺氏菌 | CMCC (B)51572 | <i>Shigella flexneri</i> |
| 4 | 纽波特沙门氏菌 | CMCC (B)50854 | <i>Salmonella newport</i> |
| 5 | 婴儿沙门氏菌 | FC14227 | <i>salmonella Infantis</i> |
| 6 | 猪霍乱沙门氏菌 | CMCC (B)50730 | <i>Salmonella choleraesuis</i> |
| 7 | 布里丹沙门氏菌 | FC2203 | <i>Salmonella blegdam</i> |
| 8 | 科特布斯沙门氏菌 | CMCC (B)50748 | <i>Salmonella kottbus</i> |
| 9 | 亚利桑那肠沙门氏菌 | FC1459 | <i>Salmonella arizona</i> |
| 10 | 都柏林沙门氏菌 | CMCC (B)50761 | <i>Salmonella dublin</i> |
| 11 | 阿贡纳沙门氏菌 | FC23957 | <i>Salmonella agona</i> |
| 12 | 鸭沙门氏菌 | FC13466 | <i>Salmonella. anatis</i> |
| 13 | 大肠埃希氏菌 | ATCC 25922 | <i>Escherichia coli</i> |
| 14 | 粪肠球菌 | ATCC 29212 | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 15 | 金黄色葡萄球菌 | ATCC 6538 | <i>Staphylococcus aureus</i> |

注:FC编号为本实验室的菌株编号

| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
|-------|------------|--------------------------------|
| 高压灭菌器 | MLS-3780 | 三洋公司 |
| 电子天平 | PL2002 | 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司 |
| 生化培养箱 | PR205050GC | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 水浴锅 | SWB25 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 生物安全柜 | 1389 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |

(P_R 值):

$$P_R = N_s / N_o$$

式中:

P_R ——生长率;

N_s ——待测培养基平板上得到的菌落总数;

N_o ——参比培养基平板上得到的菌落总数 (TSA 平板)。

为避免实验中由于实验仪器和人员等因素造成的偏差,本次实验每个品牌进行 1~3 次重复实验,如果第 1 次实验结果为 $P_R < 0.5$,则进行第 2 次重复实验,如重复实验结果与第 1 次实验结果不一致则进行第 3 次重复实验,选取 3 次实验的最好结果作为该培养基的最终结果。

表2 沙门氏菌用 RV 肉汤增菌后菌落计数结果

Table 2 The results of colony count of *Salmonella* after inoculation with RV broth

| 菌株名称 | 不同品牌 RV 肉汤增菌后菌落计数结果/(CFU/mL) | | | | | | | |
|-----------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | B | C | D | E | F | G | H | J |
| 伤寒沙门氏菌 | 1.46×10^6 | 8.13×10^7 | 7.07×10^7 | 2.67×10^7 | <100 | <100 | <100 | <100 |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 2.40×10^7 | 4.10×10^7 | 3.40×10^7 | 3.10×10^7 | 2.10×10^7 | 1.70×10^7 | 3.30×10^7 | 2.50×10^7 |
| 亚利桑那肠沙门氏菌 | <100 | 1.60×10^7 | 1.28×10^8 | 1.30×10^7 | <100 | <100 | <100 | <100 |
| 鸭沙门氏菌 | 1.25×10^8 | 6.00×10^6 | 2.01×10^8 | 9.75×10^5 | 4.70×10^4 | 5.80×10^6 | 2.07×10^6 | 2.00×10^2 |
| 纽波特沙门氏菌 | 1.63×10^7 | 1.09×10^7 | 1.19×10^7 | 1.67×10^7 | 1.44×10^7 | 7.74×10^7 | 7.86×10^7 | 4.05×10^7 |
| 婴儿沙门氏菌 | 6.30×10^6 | 5.99×10^7 | 1.36×10^8 | 5.98×10^7 | 8.10×10^6 | 2.29×10^7 | 1.20×10^7 | 3.90×10^6 |
| 猪霍乱沙门氏菌 | 2.61×10^6 | 1.03×10^7 | 4.95×10^7 | 3.08×10^7 | 4.42×10^6 | 5.35×10^7 | 3.91×10^7 | 7.80×10^6 |
| 布里丹沙门氏菌 | 3.05×10^8 | 2.77×10^8 | 2.84×10^8 | 1.92×10^8 | 3.14×10^8 | 2.43×10^8 | 3.39×10^8 | 3.72×10^7 |
| 科特布斯沙门氏菌 | 4.27×10^6 | 3.48×10^6 | 4.26×10^7 | 2.20×10^7 | 2.10×10^7 | 7.50×10^6 | 2.24×10^8 | 3.00×10^6 |
| 都柏林沙门氏菌 | 2.25×10^8 | 1.35×10^8 | 8.15×10^7 | 6.35×10^7 | 3.41×10^7 | 1.13×10^8 | 1.78×10^8 | 3.40×10^7 |
| 阿贡纳沙门氏菌 | 1.12×10^8 | 2.67×10^8 | 1.49×10^8 | 1.06×10^8 | 1.21×10^8 | 1.83×10^8 | 3.02×10^8 | 5.82×10^7 |

注:结果显示“<100”为 RV 肉汤经 24 h 增菌培养,稀释为 10^{-2} 后未见菌落生长

伤寒沙门氏菌和亚利桑那肠沙门氏菌对 RV 增菌肉汤的质量要求较高,建议将该两株菌株作为

1.2.4 选择性增菌液体培养基目标菌的定量计算

在选择性增菌肉汤中接菌培养 24 h 后,将增菌液稀释至 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 后涂布 TSA 平板,选取菌落数在 20~200 CFU 之间的平板进行计数,再将计数结果乘以稀释倍数计算增菌结果。

为了避免其他因素影响实验结果,如 2.3 实验步骤所示,该实验重复 1~3 次,选取 3 次实验的最好结果作为最终结果。

1.2.5 非目标菌的定量测试

按照 GB 4789.28 的要求,应将非目标菌划线接种平板,计算平板上的 G 值。为提高准确性,本实验改为与 1.2.4 目标菌一致的定量方法进行检测。

2 结果

2.1 选择性增菌液体培养基的目标菌增菌结果

根据 GB 29921—2013 食品中致病菌限量的要求,每 25 g(mL) 样品中不得检出沙门氏菌。按照 GB 4789.4—2016 沙门氏菌检验的标准进行沙门氏菌检验,接种 1 mL 浓度为 20~200 CFU/mL 的沙门氏菌在增菌肉汤中增菌 24 h 后需要增菌液至少达到 10^3 CFU/mL,才能在选择性分离平板上培养出菌落,而为了减少假阴性的产生,增菌肉汤需增菌至 10^4 CFU/mL,才能保证最大概率检出阳性样品。

表 2 结果显示,亚利桑那肠沙门氏菌只有在 C、D、E 3 个品牌的 RV 肉汤中增菌超过 10^4 CFU/mL,其余 5 个品牌的 RV 肉汤均不能增菌至 10^4 CFU/mL。伤寒沙门氏菌在 F、G、H、J 4 个品牌的 RV 肉汤中不能增菌至 10^4 CFU/mL。鸭沙门氏菌在 J 品牌中不能增菌至 10^4 CFU/mL,其他沙门氏菌在 B~J 8 种品牌 RV 增菌肉汤中均可达到增菌范围的要求。

RV 培养基的验收质控菌株。其中 J 品牌 RV 肉汤质量相较其他品牌差,有 3 株菌的增菌计数结果不

能达到标准的要求。

表3结果显示,猪霍乱沙门氏菌和亚利桑那肠沙门氏菌在各品牌TTB肉汤培养基中增菌24h后,均未增菌至 10^4 CFU/mL。都柏林沙门氏菌在D、F、H、I 4个品牌TTB肉汤中未能增菌至 10^4 CFU/mL,伤寒沙

门氏菌在D、H、I三个品牌中未能增菌至 10^4 CFU/mL。鸭沙门氏菌在F、G、I 3个品牌培养基中未能增菌至 10^4 CFU/mL。H和I品牌TTB肉汤不能对科特布斯沙门氏菌进行有效增菌。纽波特沙门氏菌在H品牌TTB肉汤中增菌效果差,未能达到 10^4 CFU/mL。

表3 沙门氏菌用TTB肉汤增菌后菌落计数结果

Table 3 The results of colony count of *Salmonella* after inoculation with TTB broth

| 菌株名称 | 不同品牌TTB肉汤增菌后菌落计数结果/(CFU/mL) | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 3.08×10^7 | 3.40×10^7 | 8.62×10^7 | 8.17×10^7 | 1.76×10^8 | 2.21×10^7 | 6.27×10^7 | 5.00×10^4 | 1.60×10^5 |
| 伤寒沙门氏菌 | 1.31×10^7 | 1.51×10^7 | 2.95×10^7 | 0.00 | 1.03×10^7 | 1.40×10^5 | 1.90×10^5 | <100 | <100 |
| 亚利桑那肠沙门氏菌 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 |
| 猪霍乱沙门氏菌 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 | <100 |
| 鸭沙门氏菌 | 1.03×10^8 | 9.50×10^7 | 9.00×10^7 | 1.75×10^8 | 6.75×10^7 | 0.00 | 0.00 | 1.10×10^5 | 6.00×10^3 |
| 科特布斯沙门氏菌 | 5.76×10^7 | 7.70×10^7 | 1.06×10^8 | 1.38×10^8 | 5.68×10^7 | 6.00×10^6 | 1.90×10^7 | <100 | <100 |
| 都柏林沙门氏菌 | 2.80×10^8 | 1.83×10^8 | 9.00×10^7 | 74.00 | 1.89×10^8 | 8.40×10^3 | 1.65×10^5 | 8.50×10^2 | 3.95×10^3 |
| 纽波特沙门氏菌 | 4.20×10^7 | 5.37×10^7 | 1.15×10^8 | 2.71×10^6 | 2.81×10^7 | 1.70×10^7 | 1.40×10^7 | 100 | 2.30×10^5 |
| 婴儿沙门氏菌 | 1.33×10^7 | 6.73×10^7 | 2.10×10^7 | 6.08×10^7 | 1.95×10^7 | 1.60×10^6 | 3.50×10^5 | 9.00×10^3 | 1.70×10^4 |
| 阿贡纳沙门氏菌 | 8.10×10^7 | 1.04×10^8 | 1.54×10^8 | 1.49×10^7 | 1.60×10^7 | 4.80×10^6 | 6.00×10^6 | 1.10×10^5 | 8.00×10^4 |
| 布里丹沙门氏菌 | 7.50×10^7 | 5.80×10^7 | 1.69×10^8 | 3.44×10^7 | 1.08×10^7 | 1.20×10^7 | 7.00×10^6 | 1.60×10^4 | 1.10×10^6 |

注:结果显示是“0”为TTB增菌肉汤经24h培养,稀释为 10^{-2} 后未见菌落生长。

都柏林沙门氏菌相对其他沙门氏菌对培养基质量要求更高,可作为质控菌株用于BS培养基质量验收。亚利桑那肠沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌很难在TTB肉汤中增菌,可选择作为挑战性菌株用于培养基质量验收。I品牌TTB肉汤不能对6株沙门氏菌进行有效增菌,质量较差。

表4结果显示大部分SC肉汤培养基增菌效果

能够达到 10^4 CFU/mL,能够满足实际检测的需要。但有A、B、C、D、F、H 6个品牌的SC增菌肉汤不能对猪霍乱沙门氏菌进行有效增菌。D品牌培养基不能对伤寒沙门氏菌和鸭沙门氏菌进行有效增菌。

可选择猪霍乱沙门氏菌作为质控菌株验证SC肉汤质量。D品牌SC肉汤不能对3株沙门氏菌进行有效增菌,相比其他品牌质量较差。

表4 沙门氏菌用SC肉汤增菌后菌落计数结果

Table 4 The results of colony count of *Salmonella* after inoculation with SC broth

| 菌株名称 | 不同品牌SC肉汤增菌后菌落计数结果/(CFU/mL) | | | | | | | |
|-----------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H |
| 伤寒沙门氏菌 | 2.76×10^7 | 8.95×10^7 | 2.84×10^7 | 0.00 | 2.98×10^7 | 4.56×10^7 | 5.48×10^7 | 6.50×10^7 |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 7.10×10^7 | 1.09×10^8 | 2.69×10^8 | 6.53×10^7 | 8.41×10^7 | 1.56×10^8 | 1.16×10^9 | 1.50×10^8 |
| 猪霍乱沙门氏菌 | <100 | <100 | <100 | <100 | 1.80×10^4 | <100 | 3.07×10^7 | <100 |
| 鸭沙门氏菌 | 5.10×10^4 | 1.06×10^8 | 2.16×10^7 | <100 | 9.90×10^4 | 1.10×10^4 | 1.47×10^8 | 2.27×10^8 |
| 亚利桑那肠沙门氏菌 | 4.80×10^6 | 2.98×10^7 | 2.88×10^7 | 7.20×10^4 | 2.85×10^8 | 9.33×10^7 | 1.46×10^8 | 9.10×10^6 |
| 纽波特沙门氏菌 | 2.46×10^7 | 1.41×10^8 | 6.08×10^7 | 3.97×10^7 | 3.04×10^7 | 5.54×10^7 | 5.51×10^7 | 1.81×10^8 |
| 婴儿沙门氏菌 | 3.40×10^6 | 1.28×10^8 | 6.60×10^6 | 4.53×10^6 | 2.92×10^6 | 2.90×10^7 | 1.08×10^8 | 1.58×10^8 |
| 布里丹沙门氏菌 | 3.72×10^7 | 2.00×10^8 | 0.99×10^7 | 3.78×10^7 | 6.50×10^7 | 5.45×10^7 | 1.69×10^8 | 2.28×10^8 |
| 科特布斯沙门氏菌 | 1.58×10^7 | 1.44×10^8 | 1.27×10^7 | 2.57×10^7 | 2.31×10^7 | 7.48×10^7 | 1.16×10^8 | 9.41×10^7 |
| 都柏林沙门氏菌 | 2.25×10^7 | 8.08×10^7 | 2.06×10^7 | 1.65×10^7 | 1.99×10^7 | 2.09×10^7 | 2.19×10^7 | 4.72×10^7 |
| 阿贡纳沙门氏菌 | 3.79×10^7 | 1.45×10^8 | 7.02×10^7 | 1.23×10^8 | 5.67×10^7 | 6.52×10^7 | 1.47×10^8 | 1.43×10^8 |

注:结果显示是“0”为SC增菌肉汤经24h培养,稀释为 10^{-2} 后未见菌落生长

2.2 选择性分离固体培养基的目标菌生长率结果

本研究从市场上收集的9家BS培养基结果显示(表5),依据GB4789.28的判定标准,选择性分离固体培养基的目标菌生长率需不小于0.5,只有F品牌培养基,11株菌均能在其上良好生长。亚利桑那肠沙门氏菌在7个品牌BS培养基上生长率结果<0.5,其中A、C、D、G、H、I 6个品牌BS培养基上均未见该菌株生长。布里丹沙门氏菌和都柏林沙门氏菌均有4个品牌BS培养基的生长率结果不符

合标准规定。鸭沙门氏菌和阿贡纳沙门氏菌分别在3个品牌BS培养基上生长率结果<0.5。分别有2个品牌BS培养基上科特布斯沙门氏菌的生长率<0.5。

亚利桑那肠沙门氏菌对BS培养基的质量有更高的要求,可选择该菌株作为质控菌株。I品牌BS培养基质量最差,有7株沙门氏菌生长率未达到GB4789.28的要求,1株菌的菌落形态不符合标准要求。F品牌质量最好,所有沙门氏菌均能在F品

牌上良好生长。A 品牌 BS 培养基有 6 株沙门氏菌生长率未达到标准要求,BS 培养基质量较其他品牌存在差距。

表 5 不同品牌 BS 培养基沙门氏菌的生长率(P_R值)结果

Table 5 Growth rate (P_R value) of *Salmonella* in different brands of BS medium

| 菌株名称 | 不同品牌 BS 培养基的 P _R 值 | | | | | | | | |
|-----------|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| 伤寒沙门氏菌 | 0.94 | 1.14 | 1.05 | 0.07 | 0.94 | 0.99 | 0.92 | 0.62 | 1.04 |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 0.68 | 0.78 | 0.81 | 0.00 | 0.97 | 0.87 | 0.88 | 0.98 | 0.76 |
| 亚利桑那肠沙门氏菌 | 0.00 | 0.99 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.89 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 布里丹沙门氏菌 | 0.01 | 0.02 | 1.07 | 0.00 | 1.18 | 0.99 | 0.90 | 1.11* | 0.00 |
| 都柏林沙门氏菌 | 0.01 | 0.13 | 0.85 | 0.00 | 0.92 | 0.88 | 0.94 | 0.81 | 0.01 |
| 鸭沙门氏菌 | 0.00 | 1.40 | 0.55 | 0.98 | 0.55 | 0.98 | 0.00 | 0.94 | 0.00 |
| 阿贡纳沙门氏菌 | 0.01 | 0.52 | 0.76 | 0.00 | 0.96 | 0.91 | 0.87 | 0.80 | 0.42 |
| 猪霍乱沙门氏菌 | 0.03 | 0.75 | 1.14 | 0.14 | 1.21 | 1.06 | 0.93 | 1.01 | 0.00 |
| 科特布斯沙门氏菌 | 0.99 | 0.88 | 0.82 | 0.85 | 0.79 | 0.98 | 0.87 | 0.00 | 0.00 |
| 婴儿沙门氏菌 | 0.97 | 0.78 | 1.06 | 0.82 | 0.96 | 0.77 | 0.96 | 0.90 | 0.72* |
| 纽波特沙门氏菌 | 0.73 | 1.09 | 1.16 | 0.00 | 1.15 | 1.02 | 0.93 | 1.02 | 1.11 |

注: *为该品牌培养基虽然有菌落生长,但菌落颜色与标准菌落颜色有差异;“0.00”为该平皿未见菌落生长

各品牌 HE 培养基表现良好(表 6),其中 12 种菌株均能在 A、B 品牌 HE 培养基上良好生长。但亚利桑那肠沙门氏菌在 5 个品牌上生长率不能达到标准最低要求,福氏志贺氏菌在 4 个品牌上生长率不能达到标准要求。亚利桑那肠沙门氏菌对 HE 培养基的质量有更高的要求,可将亚利桑那肠沙门氏菌作为质控菌株进行 HE 培养基的验证。

12 株沙门氏菌在 XLD 培养基上的生长情况好于 BS 培养基(表 7),其中伤寒沙门氏菌 P_R 值均符合 GB 4789.28 的要求,但除 G 品牌外,其余各品牌菌落形态均不是标准要求的典型菌落形态;猪霍乱沙门氏菌在各品牌 XLD 培养基上的菌落形态也均不符合标准要求。亚利桑那肠沙门氏菌只有在 B 和 D 品牌培养基上生长率符合标准要求,该菌对 XLD 培养基质量要求较严苛,可以作为质控菌株验证培养基质量。

2.3 非目标菌的半定量测试结果

依据 GB4789.28 对非目标菌的检验要求,选择性增菌肉汤加入 1 000~5 000 CFU/mL 非目标菌后,

表 6 不同品牌 HE 培养基沙门氏菌的生长率(P_R值)结果

Table 6 Growth rate (P_R value) of *Salmonella* in different brands of HE medium

| 菌株名称 | 不同品牌 HE 培养基的 P _R 值 | | | | | | |
|-----------|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 0.59 | 0.90 | 0.61 | 0.59 | 0.61 | 0.82 | 0.70 |
| 福氏志贺氏菌 | 0.65 | 0.58 | 0.45 | 0.35 | 0.48 | 0.72 | 0.46 |
| 亚利桑那肠沙门氏菌 | 0.69 | 0.79 | 0.35 | 0.48 | 0.48 | 0.49 | 0.16 |
| 纽波特沙门氏菌 | 0.96 | 0.95 | 0.99 | 0.84 | 0.86 | 1.00 | 0.89 |
| 婴儿沙门氏菌 | 0.79 | 0.94 | 0.79 | 0.96 | 1.39 | 0.79 | 0.88 |
| 猪霍乱沙门氏菌 | 1.16 | 1.00 | 1.34 | 0.91 | 1.28 | 1.16 | 1.13 |
| 布里丹沙门氏菌 | 0.80 | 0.93 | 0.93 | 0.72 | 0.97 | 0.88 | 0.77 |
| 科特布斯沙门氏菌 | 1.13 | 1.14 | 1.02 | 1.05 | 1.16 | 0.99 | 1.11 |
| 都柏林沙门氏菌 | 1.03 | 1.05 | 0.98 | 1.05 | 0.91 | 0.99 | 0.88 |
| 阿贡纳沙门氏菌 | 0.83 | 1.05 | 1.03 | 0.97 | 0.89 | 1.13 | 0.80 |
| 鸭沙门氏菌 | 0.90 | 0.85 | 0.88 | 0.85 | 0.93 | 0.95 | 1.00 |
| 伤寒沙门氏菌 | 1.02 | 0.99 | 0.85 | 0.88 | 0.89 | 1.07 | 0.78 |

表 7 不同品牌 XLD 培养基沙门氏菌的生长率(P_R值)结果

Table 7 Growth rate (P_R value) of *Salmonella* in different brands of XLD medium

| 菌株名称 | 不同品牌 XLD 培养基的 P _R 值 | | | | | | | |
|-----------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H |
| 鼠伤寒沙门氏菌 | 0.60 | 1.50 | 0.75 | 0.98 | 0.97 | 0.31 | 0.76 | 0.60 |
| 福氏志贺氏菌 | 0.56 | 0.75 | 0.62 | 0.80 | 1.02 | 0.21 | 0.65 | 0.36 |
| 伤寒沙门氏菌 | 0.59* | 0.90* | 0.92* | 0.95* | 0.71* | 0.61* | 0.79 | 0.80* |
| 亚利桑那肠沙门氏菌 | 0.00 | 1.07 | 0.33 | 0.97 | 0.00 | 0.00 | 0.41 | 0.00 |
| 猪霍乱沙门氏菌 | 0.63* | 0.98* | 0.73* | 0.90* | 0.61* | 0.52* | 0.65* | 0.7* |
| 布里丹沙门氏菌 | 0.83 | 0.96 | 0.90 | 0.83 | 0.43 | 0.59 | 0.62 | 0.59 |
| 婴儿沙门氏菌 | 0.69 | 0.90 | 0.83 | 0.84 | 0.57 | 0.46 | 0.53 | 0.55 |
| 纽波特沙门氏菌 | 0.70 | 0.86 | 0.86 | 0.93 | 0.60 | 0.52 | 0.57 | 0.64 |
| 科特布斯沙门氏菌 | 0.90 | 0.97 | 0.76 | 0.92 | 0.63 | 0.63 | 0.50 | 0.64 |
| 都柏林沙门氏菌 | 0.85 | 0.98 | 0.98 | 0.98 | 0.79 | 0.82 | 0.75 | 0.80 |
| 阿贡纳沙门氏菌 | 0.87 | 0.94 | 0.76 | 0.92 | 0.63 | 0.63 | 0.50 | 0.64 |
| 鸭沙门氏菌 | 0.70 | 0.96 | 0.80 | 0.93 | 0.50 | 0.55 | 0.50 | 0.56 |

注: *为该品牌培养基虽然有菌落生长,但菌落颜色与标准菌落颜色有差异;“0.00”为该平皿未见菌落生长

增菌后用 10 μL 的接种环划线接种非选择性平板,增菌数量<100 CFU,即培养基需抑制非目标菌生长菌落数不超过 10⁴ CFU/mL,才能保证不影响阳性样品的检出。

表 8 显示 H 品牌的 SC 肉汤不能有效抑制大肠埃希氏菌和粪肠球菌。B、C、H 3 个品牌的 RV 肉汤不能有效抑制大肠埃希氏菌。表 9 显示各品牌固体选择培养基均能有效抑制非目标菌的生长。

表 8 不同品牌的三种肉汤增菌培养基非目标菌的计数结果

Table 8 Counting results of non-target bacteria in three broth culture media of different brands

| 培养基名称 | 菌株名称 | 不同品牌培养基的计数结果(CFU/mL) | | | | | | | | |
|-------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|------|------|------|------|----------------------|-------|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| TTB | 大肠埃希氏菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 150 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 粪肠球菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 970 | 0.00 | 0.00 |
| SC | 大肠埃希氏菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 多 | 3 050 |
| | 粪肠球菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 多 | 0.00 |
| RV | 大肠埃希氏菌 | 0.00 | 3.03×10 ⁵ | 8.40×10 ⁶ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.08×10 ⁵ | 0.00 |
| | 粪肠球菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

注:“多”为该平皿上菌落多不可计;“0.00”为该平皿未见菌落生长

表9 不同品牌的三种固体选择培养基非目标菌的计数结果

Table 9 Counting results of three different brands of solid selective media for non-target bacteria

| 培养基名称 | 菌株名称 | 不同品牌培养基的计数结果(CFU/mL) | | | | | | | | |
|-------|---------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | A | B | C | D | E | F | G | H | I |
| BS | 大肠埃希氏菌 | 0.00 | 0.00 | 200 | 0.00 | 0.00 | 424 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | 粪肠球菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| HE | 大肠埃希氏菌 | 384 | 364 | 0.00 | 424 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | — | — |
| | 粪肠球菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 544 | 0.00 | 0.00 | — | — |
| XLD | 大肠埃希氏菌 | 0.00 | 888 | 0.00 | 816 | 976 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | — |
| | 金黄色葡萄球菌 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 544 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | — |

注：“0.00”为该平皿未见菌落生长；“—”为未采购到该品牌培养基

3 讨论

本研究仅对检测沙门氏菌常用6种选择性增菌和选择性分离培养基进行了验证,研究发现不同品牌培养基间存在很大差异,且同一生产厂家的培养基也存在质量不一致的情况,例如A品牌的HE培养基质量优于其他品牌,但BS培养基质量则低于其他品牌。国内、外培养基品牌均有不合格培养基存在,如I品牌为国外品牌培养基,其BS和TTB培养基质量均低于其他品牌。建议在选择使用培养基时不要盲目信赖同一品牌,要以真实的验证结果为准。

经验证三种选择性肉汤结果显示,TTB肉汤对亚利桑那肠沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌增菌效果均表现较差,亚利桑那肠沙门氏菌肉汤对SC肉汤的质量要求较低,大部分品牌培养基可以检出,但猪霍乱沙门氏菌对SC肉汤的增菌效果要求同样较高,部分培养基不能达到标准要求。而RV肉汤对猪霍乱沙门氏菌增菌效果较好,但只有高质量的培养基才能对亚利桑那肠沙门氏菌进行有效增菌。GB 4789.4—2016中联用SC肉汤和TTB肉汤作为沙门氏菌检测用增菌肉汤,在不增加培养基验收菌株类型的情况下,容易漏检猪霍乱沙门氏菌,建议在标准中增加RV肉汤,或选择RV肉汤和SC肉汤作为沙门氏菌检测用增菌肉汤。同时增加伤寒沙门氏菌和亚利桑那沙门氏菌验收RV增菌肉汤培养基,增加猪霍乱沙门氏菌验收SC增菌肉汤培养基。

固体选择性分离培养基结果显示,分离亚利桑那肠沙门氏菌对XLD、BS和HE三种固体选择分离培养基的质量有较高的要求。由于该三种培养基品牌选择广,价格较沙门显色培养基低廉,被大部分企业和实验室主要用于分离沙门氏菌使用,但这三种培养基对检验该菌的漏检率极高,建议生产企业增加亚利桑那肠沙门氏菌作为质控菌株,对出厂培养基进行质控。同时,沙门氏菌检测用不同培养基可以根据其特点,选用不同的验收菌株进行验证,而不用所有沙门氏菌检测培养基使用同样的质控菌株。

目前GB 4789.28检测培养基所用的菌株参考

了ISO的培养基检测标准,大部分使用了ATCC的菌株,增加了检验机构和企业的购买难度和成本。现行标准中规定所用的质控菌株最好分离自食品或水中,所以建议生产企业和实验室在验证培养基时可以增加分离自食品或水中的菌株作为质控菌株,使得质控菌株更具有代表性,国内的菌株也更好获得。另外选取的菌株应具有相对严苛的生长条件要求,这一类菌株对培养基的质量有较高要求,能够提高培养基质量。经过对国内、外各培养基生产企业所使用的质控菌株的研究发现,大型培养基生产企业会使用不容易在培养基上生长的菌株作为质控菌株,以提高培养基的质量^[13]。建议生产企业在验收报告中增加标准之外的质控菌株验收信息,供使用者参考,也可降低使用者验收成本,同时在GB 4789.28标准修订中,考虑增加国产菌株,应以食品中分离的真实菌株且在不同品牌培养基上生长存在差异为佳。

本文并未对GB 4789.4—2016中使用的BPW和沙门氏菌显色培养基进行研究,主要考虑到BPW培养基为非选择性的增菌培养基,只要求细菌能在其中良好生长,不具备分离沙门氏菌的能力,成分较为单一,质量相对稳定。沙门氏菌显色培养基虽然未标准中规定使用的培养基,但生产品牌相对较少,且由于价格昂贵,部分厂家和实验室不会作为常规培养基使用,虽然本文并未深入研究该两种培养基,但建议生产企业和使用者在使用培养基前同样对其质量进行验证。

本文通过研究沙门氏菌的选择性增菌和分离培养基为培养基生产企业及实验室验收工作提供了筛选培养基质控菌株的思路,同时研究数据为今后GB 4789.28的修订工作提供了实验思路和有效的数据参考。研究旨在提高生产企业及实验室使用者加强培养基质量控制的关注,提高食品检验中沙门氏菌的检出率。

参考文献

- [1] IBARRA J A, STEELE-MORTIMER O. Salmonella: the ultimate

- insider. *Salmonella virulence* factors that modulate intracellular survival [J]. *Cellular Microbiology*, 2009, 11(11): 1579-1586.
- [2] KIDGELL C, REICHARD U, WAIN J, et al. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2002, 2(1): 39-45.
- [3] ALFOUZAN W, BULACH D, IZUMIYA H, et al. Carbuncle due to *Salmonella enteritidis*: a novel presentation [J]. *Gut Pathogens*, 2017, 9: 51.
- [4] SUNDBOM P, SUUTARI A M, ABDULHADI K, et al. *Salmonella enteritidis* causing myocarditis in a previously healthy 22-year-old male [J]. *Oxford Medical Case Reports*, 2018, 2018(12): omy106.
- [5] GHAFFAR A, HUSSAIN M H, MOHAN R. Prosthetic knee joint infection due to *Salmonella* species: a case report [J]. *Cureus*, 2020, 12(6): e8519.
- [6] IKEJIRI K, SUZUKI K, ITO A, et al. Invasive *Salmonella enteritidis* infection complicated by bacterial meningitis and vertebral osteomyelitis shortly after influenza A infection in an immunocompetent young adult [J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 26(2): 269-273.
- [7] CDC. *Salmonella* [EB/OL]. [2021-01-27]. <https://www.cdc.gov/salmonella/>.
- [8] WANG L, HUO X T, QI W Z, et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium using nickel nanowire bridge for electrochemical impedance amplification [J]. *Talanta*, 2020, 211: 120715.
- [9] 林黎, 周玉锦, 张誉, 等. 2015—2020年四川省食源性疾病哨点医院监测结果分析 [J]. *预防医学情报杂志*, 2021, 37(6): 792-797.
- LIN L, ZHOU Y J, ZHANG Y, et al. Analysis of surveillance results for foodborne disease in sentinel hospitals of Sichuan Province from 2015 to 2020 [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2021, 37(6): 792-797.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration, National food safety standard Food microbiological examination: Aerobic plate count test GB 4789.2—2016 [S]. Beijing: China standard press, 2017.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求: GB 4789.28—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration, Microbiological examination of food hygiene—Statning methods, culture mediums and reagents GB 4789.28—2013 [S]. Beijing: China standard press, 2014.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 食品中致病菌限量 GB29921-2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration, National Standard of Food Safety The Limited Quantity of Pathogenic Bacterium in Food. GB 4789.28—2013 [S]. Beijing: China standard press, 2014.
- [13] ZIMBRO M, POWER D. *Difco™ & BBL™ Manual* [M]. Sparks, Becton, Dickinson and Company, 2009.