

自制兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基检测食品中金黄色葡萄球菌的效果观察

赵贵明 刘沛 边凌淳 张旭

(中国进出口商品检验技术研究所,北京 100025)

摘要:为提高食品中金黄色葡萄球菌的检测效率,用自制兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基(RPF琼脂培养基,在Baird-Parker琼脂培养基中添加兔血浆纤维蛋白原)与Baird-Parker琼脂检测了25份从市场上挑选的食品,部分样品人工添加了金黄色葡萄球菌,比较了二者的检测结果。在定性试验中,添加了金黄色葡萄球菌的1~15号样品,二者均为阳性结果,在10份自然样品中兔血浆纤维蛋白原琼脂检出3例,Baird-Park琼脂检出2例,定量试验结果表明,二者相关系数为 $r = 0.98$,使用RPF琼脂可以节省 $2/3$ 检测时间。基于兔血浆纤维蛋白原琼脂技术的准确性和高效率,建议推广使用。

关键词:纤维蛋白原;葡萄球菌,金黄色;微生物学技术;食品

Evaluation of rabbit plasma fibrinogen agar for detection of *Staphylococcus aureus* in foods

Zhao Guiming, Liu Pei, Bian Lingchun, Zhang Xu

(China Import and Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing 100025, China)

Abstract: The effect of self-produced rabbit plasma fibrinogen agar was compared with Baird-Parker agar for detection of *Staphylococcus aureus* in 25 food samples selected from market. The results indicate that the self-produced rabbit plasma fibrinogen agar and Baird-Parker agar were equally effective in 15 artificial test samples. Three of 10 natural test samples were positive by use of rabbit plasma fibrinogen agar and 2 were positive by use of Baird-Parker agar in qualitative test. The correlation coefficient in quantitative test between the self-produced rabbit plasma fibrinogen agar and Baird-Parker agar was 0.98. Two thirds of time could be saved in the test by use of rabbit plasma fibrinogen agar. The result suggest that rabbit plasma fibrinogen agar technique is suitable for popularisation to detect *Staphylococcus aureus* in foods due to its accuracy and efficiency.

Key Words: Gbrinogen; *Staphylococcus aureus*; Microbiological Techniques; Food

金黄色葡萄球菌是食品微生物常规检验项目。检测金黄色葡萄球菌的培养基有十多种,其中Baird-Parker培养基是应用较广泛的培养基,我国食品微生物检验标准和出口食品微生物检验行业标准就使用该种培养基,^[1,2]但该培养基在发现可疑菌落后还需要用肉汤培养基增菌后进行凝固酶证实实验,共需要6d时间,目前已有金黄色葡萄球菌的多种快速检测方法。^[3]1999年国际标准化组织颁布了应用琼脂技术检测食品和动物饲料中凝固酶阳性葡萄球菌计数方法,^[5]我们参照ISO 6888研制了兔血浆纤维蛋白原琼脂培养基(RPF琼脂培养基,在Baird-Parker琼脂培养基中添加兔血浆纤维蛋白原),并用制备的RPF琼脂和Baird-Parker培养基检测了25份食物样品,并进行了比较,部分样品还与

卵黄甘露醇高盐琼脂检测结果进行了比较,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 试验菌株 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 26112、189、26113,其中26112、189菌株血浆凝固酶为阳性,26113菌株血浆凝固酶为阴性,均购自中国药品生物制品检定所。试验菌株均于胰酪胨大豆肉汤中35℃培养24h,比浊法计数约 10^8 CFU/ml,用灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)进行10倍稀释至 10^{-3} 。

1.2 试剂 Baird-Parker培养基基础,冻干卵黄,高盐甘露醇琼脂基础,北京陆桥技术公司生产。胰酶抑制剂,sigma;亚碲酸钾,北京市中联特化工有限公司。

1.2.1 RPF琼脂增补剂制备 牛纤维蛋白原^[4]无

作者简介:赵贵明 男 高级工程师

菌采集新鲜牛血,加入抗凝剂(4%枸橼酸钠溶液与血液比例为1:9),4 2500 r/min离心10min,去除血球,收集血浆,用0.01 N HCl或0.01 N NaOH调整pH值至7.2,预冷至-3℃(用氯化钙、碎冰块调节温度),在该温度下冷乙醇至8%,边滴加边搅拌,静置10 min,4 5000 r/min离心15 min,收集沉淀,加入生理盐水和适量的稳定剂(每克蛋白质用0.16 mmol辛酸钠),分装,冻干,以上程序可参照《冻干人纤维蛋白原制造及检定规程》和《人血白蛋白(低温乙醇法)制造及检定规程》。兔血浆制备:心脏采血,参照SN 0172—1992标准。^[2]

1.2.2 培养基制备 Baird-Parker培养基、卵黄甘露醇高盐琼脂配制按厂家说明书使用。RPF琼脂配制在符合GB 4789.28中4.6规定的Baird-Parker基础上,加入规定量90%的蒸馏水,加热溶解,121℃高压15 min,晾至50℃时,每100 ml Baird-Parker基础添加10 ml RPF增补剂(增补剂含纤维蛋白原0.5 g、兔血浆5 ml、亚硫酸钾2.5 mg、胰酶抑制剂2.5 mg,用10%体积培养基的无菌水溶解),轻轻摇匀,倾注直径90 mm平皿,每块约15 ml,室温凝固后备用,培养基为浅黄色半透明固体。

1.3 试验样品 按照各国要求检验金黄色葡萄球菌项目的食品种类随机从超市购买,其中生肉类7份,肉类制品5份,豆制品3份,水产品3份,调味品2份,乳制品1份,其它食品4份(包括罐头、薯片、冷冻饭团、玉米羹),共25份。称取25 g固体试样(液体试样吸取25 ml),加入225 ml灭菌生理盐水均质,制成混悬液,参照GB 4789.10—1994。在1~5号试样中各添加 10^{-2} 培养物稀释液0.1 ml,6~10号试样中各添加 10^{-3} 培养物稀释液0.1 ml,11~15号试样各添加 10^{-4} 培养物稀释液0.1 ml,混合均匀,16~25号试样为自然样品。

1.4 定性实验 吸取1 ml 10试样混悬液5 ml,接种于50 ml胰酪胨大豆肉汤中,36℃培养24 h,分别划线接种于RPF琼脂、Baird-Parker琼脂平板,部分试样接种了卵黄甘露醇高盐琼脂,于36℃培养24~48 h,观察结果,在RPF琼脂上呈黑色菌落,带有3 mm大小的纤维蛋白沉淀圈的菌落为金黄色葡萄球菌典型菌落。对Baird-Parker琼脂平板和卵黄甘露醇高盐琼脂上生长的典型菌落则按国标方法进一步通过血浆凝固酶试验确证,每份试样统计阴性和阳性结果。

1.5 定量实验 吸取1 ml 10试样稀释液滴加于3块RPF琼脂、Baird-Parker琼脂平板,部分试样接种了卵黄甘露醇高盐琼脂平板,用L棒涂布均匀,于36℃培养24~48 h,在RPF琼脂上统计黑色并带有

3 mm大小的纤维蛋白沉淀圈的金黄色葡萄球菌典型菌落,Baird-Parker琼脂平板和卵黄甘露醇高盐琼脂平板上典型菌落再进行确证实验,计数,为便于比较,将结果换算成以10为底的对数单位。

2 结果

2.1 定性实验 在25份样品中,RPF琼脂培养基共检出18例阳性,Baird-Parker琼脂检出17例,卵黄甘露醇高盐琼脂检测结果基本一致,其中添加了金黄色葡萄球菌的1~15号样品,RPF琼脂和Baird-Park琼脂均为阳性结果,在10份自然试样中RPF琼脂检出3例,样品编号21、23、25,Baird-Park琼脂检出2例,样品编号21、23(结果见表1)。

2.2 定量实验 在15份添加了金黄色葡萄球菌样品中,1~5号样品含150~250 CFU/ml,6~10号样品含10~50 CFU/ml,11~15号样品含1~10 CFU/ml。RPF琼脂和Baird-Parker琼脂检测结果一致,具有很好的相关性(见图1),但也有区别,在对数值2以下(菌落数100 CFU/g),RPF琼脂生长的菌落数多于Baird-Parker培养基,分析结果见表2。卵黄甘露醇高盐琼脂检测结果与二者差异无明显性。

表1 定性实验结果

序号	样品名称	培养基		
		RPF agar	Baird-Parker	MSEY
1	牛肉干	+	+	+
2	猪肉松	+	+	+
3	臭豆腐	+	+	/
4	金枪鱼罐头	+	+	/
5	香肠	+	+	/
6	火腿	+	+	+
7	豆腐卷	+	+	/
8	奶酪	+	+	+
9	番茄酱	+	+	/
10	沙拉酱	+	+	/
11	日本豆腐	+	+	+
12	曼鱼饭团	+	+	+
13	薯片	+	+	+
14	瘦猪肉馅	+	+	/
15	扇贝	+	+	/
16	安康鱼	-	-	/
17	鸡胗	-	-	+
18	蟹肉棒	-	-	-
19	牛肉馅	-	-	-
20	玉米羹	-	-	-
21	五香小肚	+	+	+
22	猪肝	-	-	-
23	羊肉串	+	+	/
24	羊肉馅	-	-	-
25	羊肉串	+	-	/

注:“+”为阳性,“-”为阴性,“/”为未进行试验。RPF agar为兔血浆纤维蛋白原琼脂;MSEY为卵黄甘露醇高盐琼脂。

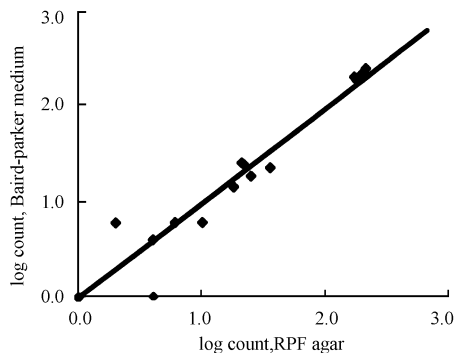


图1 兔血浆纤维蛋白原琼脂和 Baird-parker 培养基检测 25 份食品中金黄色葡萄球菌的相关性 ($r=0.98$)。

表2 RPF 琼脂和 Baird-Parker 培养基检测结果区别

	菌落数对数值			样品总数
	0.09~1.00	1.00~2.00	>2.00	
Npf < Nbp	2	2	3	7
Npf > Nbp	3	3	1	7
Npf = Nbp	10	0	1	11

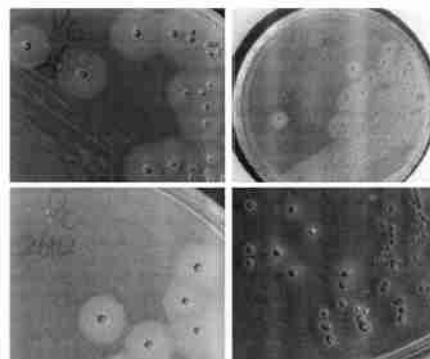
3 讨论

3.1 Baird-parker 是检测食品中金黄色葡萄球菌最常用的培养基,其优点表现在对食品加工过程中受到损伤的金黄色葡萄球菌具有较高的回收率,^[6]但不能检测出对卵黄反应阴性的金黄色葡萄球菌,典型菌落需要进一步增菌后用凝固酶实验确证,多花费 2 d 时间。

3.2 金黄色葡萄球菌在自制的 RPF 琼脂生长后,还原亚砷酸钾呈黑色菌落,通过凝固酶的作用,水溶性纤维蛋白原成为不溶性纤维蛋白,在菌落周围形成沉淀,出现 3 mm 大小的白色圈,菌落特征明显,无论定性和定量检测实验,自制的 RPF 琼脂与 Baird-parker 具有很好的一致性和相关性,说明自制的兔血浆纤维蛋白原增补剂达到了实验要求。实验中金黄色葡萄球菌产生的白色沉淀圈大小不均一,这主要取决于细菌产生凝固酶的强弱,本实验中金黄色葡萄球菌菌株 26112 沉淀圈大于 189(结果见图 2),而 26113 则无沉淀圈,结果与试管凝集法的结果一致(分别为 4 个加号、2 个加号和不凝集)。

3.3 在特异性方面,本文虽未进行试验,但据文献报道,^[8]RPF 琼脂检测金黄色葡萄球菌的假阳性率仅为 1%,主要来自中间葡萄球菌,自然界中中间葡萄球菌仅占葡萄球菌属的 1%;假阴性率为 2%,主

要是金黄色葡萄球菌并非 100%都产生凝固酶,而且强弱不同。



左上、左下为 26112 菌株 2 次实验结果,右上和左下为同一块平板,右下为 189 菌株。

图2 金黄色葡萄球菌在 RPF 琼脂上 36-48 h 生长情况

3.4 利用 RPF 琼脂技术检测肉及肉制品、豆制品、水产品等食品中金黄色葡萄球菌,直接计数法和定性检测分别在 24 h 和 48 h 内得出结果,基于其准确性和高效率(节省三分之二时间),应尽快推广应用。

参考文献:

- [1] GB 4789.10—1994.金黄色葡萄球菌检验[Z].
- [2] SN 0172—1992.出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法[Z].
- [3] 王晶,王林,黄小蓉,主编,食品中有害微生物快速检测方法[A].见:食品安全快速检测技术[C].北京:化学工业出版社,2002,150—153.
- [4] 卢锦汉,章以浩,赵铠.人血浆蛋白分离纯化技术[A].见:医学生物制品学[C].北京:人民卫生出版社,1995.
- [5] ISO 6888. Microbiology of food and animal feeding stuff - Horizontal method for the numeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) [Z].
- [6] Rayman M K. CMSF method studies. X. An international comparative study of four media for the numeration of *Staphylococcus aureus* in foods [J]. Can J Microbiol, 1978, 24: 274—281.
- [7] Sawhney D. The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1986, 61: 149—155.
- [8] Beckers H L. Evaluation of a pour-plate system with rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the numeration of *Staphylococcus aureus* in food [J]. Can J Microbiol. 1984, 30: 470—474.

[收稿日期:2004-06-22]

中图分类号:R15;R117 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2004)06-0501-03