

调查研究

65株冷冻肠衣分离细菌的鉴定

仇保丰¹, 宋鸿雁², 蔡宝亮³, 邵义祥², 顾炳泉¹, 刘文斌¹, 高逢结¹, 李建¹(1. 南通出入境检验检疫局, 江苏南通 226004; 2. 南通大学实验动物中心, 江苏南通 226001;
3. 江苏出入境检验检疫局, 江苏南京 210001)

摘要:目的 调查冷冻肠衣携带细菌的情况。方法 用16S rDNA PCR序列扩增和分析技术对2010—2012年从南通地区肠衣生产、加工企业的冷冻肠衣中分离的65株细菌进行鉴定。结果 这些细菌包含了来自13个属的20种细菌, 其中奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是比较明显的优势种群。另外, 许多细菌在一定条件下可引起人和动物发生疾病。结论 冷冻肠衣可以携带多种细菌, 应该进一步加强监测和研究。

关键词: 冷冻肠衣; 16S rDNA; 食源性致病菌

中图分类号: R155.55; TS251.92 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2013)05-0458-04

Identification of 65 strains of bacteria isolated from frozen intestines

QIU Bao-feng, SONG Hong-yan, CAI Bao-liang, SHAO Yi-xiang,
GU Bing-quan, LIU Wen-bin, GAO Feng-jie, LI Jian

(Nantong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiangsu Nantong 226004, China)

Abstract: Objective To study the bacteria contamination in frozen intestines. **Methods** Sixty-five strains of bacteria isolated from frozen intestines, which collected in Nantong casings manufacturing and processing enterprises between 2010 and 2012, were identified by 16S rDNA PCR amplification and sequence analysis. **Results** It showed that 20 species of bacteria belonging to 13 genera were identified, and the main bacterial species were *Proteus mirabilis*, *Enterococcus hirae* and *Enterococcus faecalis*. In addition, some of them may cause disease in humans and animals under certain conditions.

Conclusion A variety of bacteria may be carried by frozen intestines, the relevant supervision and study should be further strengthened.

Key words: Frozen intestines; 16S rDNA; food-borne pathogen

肠衣(casings)是猪、羊等家畜的新鲜肠管经加工处理, 除去肠内外多种不需要的组织后所剩下的一层坚韧、半透明的薄膜, 它是加工灌肠类食品的重要原料之一。我国作为世界肠衣出口大国, 不仅有大批量的成品肠衣出口, 来料加工和进料加工的进境冷冻原肠数量也十分巨大。肠衣产业为解决我国农畜产品出口创汇、农民增收和增加就业等问题发挥了很大作用。但肠衣易携带多种微生物, 特别是去粪、清洗后未经盐渍的冷冻肠衣, 更容易携带和传播包括沙门菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 等致病菌在内的多种微生物^[1-3]。给我国公共卫生、食品安全和畜牧业发展带来了很大的隐患。目

前对于冷冻肠衣具体携带哪些种类的细菌, 国外尚未见详细报道, 国内更是处于空白状态。本研究通过对2010—2012年从冷冻肠衣中分离的65株细菌进行鉴定, 旨在弄清冷冻肠衣携带细菌情况, 为我国制定肠衣监管制度、提高进出口肠衣的质量和维持公共卫生安全提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2010—2012年从南通地区肠衣生产、加工企业采集4份冷冻肠衣样品, 约500g/份。

1.1.2 试剂

酵母浸提物、胰蛋白胨(OXOID公司), pGEM-T easy vector (Promega公司), dNTPs (10 mmol/L each)、rTaq DNA聚合酶(5 U/ μ l)、DL2000 Marker、DNA胶回收试剂盒、16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (均购自TaKaRa公司), 氨苄

收稿日期: 2013-06-18

基金项目: 南通市科技项目(BK2012091); 江苏检验检疫局科研项目(2010KJ35)

作者简介: 仇保丰 男 兽医师 研究方向为动物及动物产品微生物的检测及研究 E-mail: baofengqiu2008@163.com

青霉素、琼脂糖 (Amresco 公司),其他化学试剂为国产分析纯试剂。所有试剂盒、培养基均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离

分别将每份样品用高压灭菌处理过的剪刀和镊子充分剪碎混匀,取 25 g 加入灭菌处理过的 225 ml 生理盐水内,在振荡器内震荡处理 2 min,然后吸取 1 ml 依次用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,选取 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 三个稀释度菌液 1 ml 分别接种营养琼脂平板和巧克力琼脂平板,37 °C 培养 24 h。从 4 份肠衣样品中随机挑取单菌落合计 65 个,分别接种至 6 ml LB 液体培养基内,37 °C 震荡培养过夜。

1.2.2 细菌 16S rDNA 的扩增

细菌总 DNA 采用氯仿/异戊醇法进行提取^[4],并作为模板,分别对每株细菌的 16S rDNA 进行扩增,具体操作方法参照试剂盒的说明书。循环反应完毕后,向扩增反应物中加入 5 μ l 上样缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,结束后在紫外灯下观察结果。

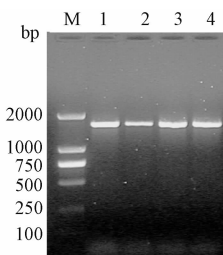
1.2.3 细菌 16S rDNA 的序列测定及比对

对每株细菌 PCR 扩增出的目的条带分别进行胶回收并克隆入 pGEM-T easy vector,转化 DH5 α 后提取质粒,用 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 鉴定阳性克隆送上海生工进行序列测定,最后将所得测序结果输入 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 进行网上比对,寻找 16S rDNA 同源性最高的且高于 97% 的已知细菌,即可确定待检肠衣分离细菌的种类。

2 结果与分析

2.1 细菌 16S rDNA 的扩增

将 65 株冷冻肠衣分离细菌提取总 DNA 后,用 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 分别对每株细菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳结果显示,65 株细菌均扩增出了约为 1 700 bp 的条带,与预期大小基本一致(见图 1)。



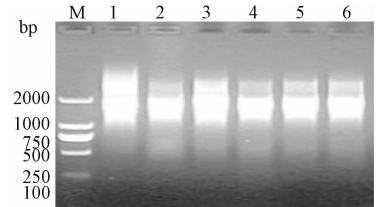
注:M 为 DL2000 Marker;1~4 分别为细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

图 1 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification of 16S rDNA from bacteria

2.2 细菌 16S rDNA 的克隆和鉴定

将 65 株细菌 PCR 扩增出的目的条带分别进行胶回收并克隆入 pGEM-T easy vector,转化 DH5 α 后用 PCR 鉴定出阳性克隆(见图 2),结果表明,65 株细菌的 16S rDNA 均成功克隆入 T 载体。分别挑选阳性克隆送上海生工进行 DNA 序列测定。



注:M 为 DL2000 Marker(bp);1~6 分别为重组质粒的 PCR 扩增产物

图 2 重组质粒的 PCR 鉴定结果

Figure 2 Identification of recombinant plasmids by PCR

2.3 冷冻肠衣携带细菌的分析

65 株冷冻肠衣携带细菌的 16S rDNA 序列测定结果与 GenBank 已收录序列进行比对,寻找与待检细菌 16S rDNA 同源性最高的且高于 97% 的已知细菌,从而确定待检肠衣分离细菌的种类。经过分析发现,本研究鉴定的 65 株细菌共包含 20 种细菌,分别来自 13 个属(见表 1):肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希菌属(*Escherichia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)、肥杆菌属(*Obesumbacterium*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、哈夫尼属(*Hafnia*)、普罗菲登斯菌属(*Providencia*)、志贺属(*Shigella*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)、类香菌属(*Myroides*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)。其中许多细菌如奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌和邦戈尔沙门菌等在一定条件下可引起人和动物发生疾病。

表 1 肠衣细菌分离结果

Table 1 Result of bacteria isolated from casings

菌株名称	菌株数量/株	菌株名称	菌株数量/株
粪肠球菌	7	弗劳地枸橼酸杆菌	2
屎肠球菌	3	奇异变形杆菌	14
海氏肠球菌	10	变形肥杆菌	2
蒙氏肠球菌	2	邦戈尔沙门菌	1
<i>Enterococcus termitis</i>	1	蜂房哈夫尼菌	1
艾博替埃希菌	2	拉氏普罗菲登斯菌	3
费格森埃希菌	4	福氏志贺菌	1
阴沟肠杆菌	2	<i>Vagococcus carniphilus</i>	3
梨形肠杆菌	1	<i>Myroides forundi</i>	3
莫林枸橼酸杆菌	2	<i>Bacillus nealsonii</i>	1

注:名称未见中文翻译的菌种用拉丁名表示

3 讨论

由动物肠管加工成的肠衣携带肠内或外源微

生物是无法避免的^[5-6]。国外已有研究表明,冷冻肠衣携带的细菌量可达到 $10^4 \sim 10^7$ cfu/g^[2,6-8]。许多在公共卫生方面具有重要意义的细菌,如链球菌、肠杆菌、亚硫酸盐还原梭状芽胞杆菌等也包括在内^[9]。欧洲天然肠衣协会(ENSCA)也将大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌等7种细菌,列为肠衣生产中可对食品安全产生威胁的细菌并要求严格控制。国内,仇保丰等人^[10]也在冷冻肠衣中检测出肠出血性大肠杆菌 O157:H7。目前,国外的研究报道主要集中在用人工添加特定细菌的方法,研究氯化钠^[2,7,11]、臭氧^[1]和辐射^[3,5-6]等手段对肠衣携带细菌的杀灭效果上,但是对冷冻肠衣携带细菌的多样性研究非常少。这主要是因为我国出口的绝大多数肠衣是已经加工为成品的盐渍肠衣,而国外的大量研究表明,绝大多数细菌在盐渍肠衣的这种高渗环境下经过一段时间就会被杀灭^[2,12];再加之出口到国外的肠衣除了要经过长时间的海上运输外,到达国外还需要再次加工和蒸煮才供食用,因此,出口成品肠衣携带细菌的生物安全风险要大大降低。

值得关注的是,我国已成为世界肠衣类产品的生产、加工的重要集散地之一。一方面,由于我国畜牧养殖业产业化、规模化、标准化程度不高,散养猪(羊)、小规模养殖(1 000头以下)占绝对多数。国产肠衣的原料为尚未经盐渍处理的冷冻肠衣,绝大多数来源于没有受控的小型饲养场或千家万户饲养的动物,冷冻肠衣的收购也往往是跨地区甚至跨省份且经过多次流通以后才能汇集到肠衣加工厂,因此,在国内屠宰场和肠衣企业间大批量、远距离的运输来自全国各地的冷冻肠衣,存在着传播动物疫病和危害公共卫生安全的巨大隐患。另一方面,由于劳动力成本低廉,我国还是世界上重要的肠衣来料和进料加工大国,每年有来自不同国家和地区的大量肠衣涌入我国,很容易将国外的动物疫病带入国内,对我国畜牧养殖业和肠衣从业人员的健康带来威胁。但截止到目前,我国对冷冻肠衣携带细菌尚缺乏系统、全面的研究。

在微生物分类鉴定中,传统的方法是通过描述其形态差异和其表型的不同而界定的。随着分子生物学技术的不断发展,PCR技术的日益完善,单独利用传统的表型分类和生理生化鉴定已经不能准确的表明细菌的遗传关系,基于16S rRNA具有功能和进化上的同源性以及它们序列进化变异频率缓慢,在整体结构上极端保守,并且16S rRNA分子大小适中,携带有充分的生物信息可以用来进行系统进化分析等特征,细菌分类鉴定亦从传统的表型分类进入各种基因型分类水平^[13]。16S rDNA指的是原核生物基因组中编码核糖

体16S rRNA分子对应的DNA序列,即16S rRNA^[14]的编码基因。目前,细菌16S rRNA序列分析作为微生物分类系统的主要依据已得到了广泛的认同,随着微生物核糖体数据库的日益完善,该技术已成为细菌分类和鉴定的一个有力工具^[13-15]。本研究选择使用细菌16S rDNA序列扩增和分析技术对细菌进行鉴定,一方面此方法鉴定结果可靠、重复性好,且操作简单,可以节约工作时间。另一方面,使用细菌16S rDNA序列分析法对细菌进行鉴定,可以用同一方法鉴定不同种类的细菌,克服了传统方法依据细菌的形态学、代谢产物、酶活性和表面抗原等表型特征对进行细菌鉴定时,需要对不同种细菌分别选择特征性的培养和生理生化试验的不足,尤其是面对大量未知细菌的分类鉴定时,前者的这一优越性就更能凸显。

本研究通过对65株冷冻肠衣分离细菌的16S rDNA进行PCR扩增、序列测定和分析,发现这些细菌包含了来自13个属的20种细菌,其中许多细菌如奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、弗氏志贺菌、邦戈尔沙门菌等在一定条件下可引起人和动物发生疾病,对公共卫生和食品安全产生的影响已引起社会的广泛关注。相信随着监测力度的加大和监测手段的提高,冷冻肠衣中携带细菌的检出种类将会大幅攀升,致病菌的检出种类也将进一步增加。因此,应该对冷冻原肠携带细菌等微生物的情况加以重视,加大调查和研究的投入,从而为探索消除肠衣携带致病菌的手段、保障公共卫生安全和推动肠衣行业健康发展打下基础。

参考文献

- [1] Benli H, Hafley B S, Keeton J T, et al. Biomechanical and microbiological changes in natural hog casings treated with ozone [J]. *Meat Sci*, 2008, 79: 155-162.
- [2] Gabis D A, Silliker J H. Salmonella in natural animal casings [J]. *Appl Environ Microb*, 1974, 27(1): 66-71.
- [3] Jo C, Lee J W, Cho K H, et al. Quality properties of sausage made with gamma irradiated natural casing from intestine of pork or lamb [J]. *Radiat Phys Chem*, 2002, 63: 365-367.
- [4] 张喆, 吕淑霞, 祝儒刚, 等. 单增李斯特菌基因组 DNA 提取方法比较 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(2): 67-69.
- [5] Trigo M J, Fraqueza M J. Effect of gamma radiation on microbial population of natural casings [J]. *Radiat Phys Chem*, 1998, 52(6): 125-128.
- [6] Byun M W, Lee J W, Jo C, et al. Quality properties of sausage made with gamma-irradiated natural pork and lamb casing [J]. *Meat Sci*, 2001, 59: 223-228.
- [7] Hammou F B, Skali S N, Idaomar M, et al. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6 °C [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(8): 1190-1195.
- [8] Bakker W A M, Houben J H, Koolmees P A, et al. Effect of initial

- mild curing, with additives, of hog and sheep sausage casings on their microbial quality and mechanical properties after storage at difference temperatures[J]. *Meat Sci*,1999,51:163-174.
- [9] Chawla S P, Chander R, Sharma A. Safe and shelf-stable natural casing using hurdle technology[J]. *Food Control*,2006,17:127-131.
- [10] 仇保丰,蔡宝亮,宋鸿雁,等. 冷冻原肠中肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的研究[J]. *中国人兽共患病学报*,2012,28(2):191-192.
- [11] Houben J H. A Survey of dry-salted natural casings for the presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing *Clostridium* spores[J]. *Food Microbiol*,2005,22:221-225.
- [12] Wijnker J J, Koop G, Lipman L J A. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings[J]. *Food Microbiol*,2006,23:657-662.
- [13] 郭海勇,吴静,许磊,等. 16S rRNA 基因序列在动物消化道细菌鉴定中的应用研究[J]. *安徽农业科学*,2008,36(17):7152-7154.
- [14] 周琳,张杰. 群落分析中的 16S rRNA 及其基因 16S rDNA 优化扩增[J]. *微生物学报*,2010,51(1):7-14.
- [15] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*,1991,173(2):697-703.

调查研究

大连地区水产企业加工用水肠球菌检测和分析

田卓¹,麻丽丹²,陈晓东²,崔妍¹,闫平平¹

(1. 大连出入境检验检疫局,辽宁 大连 116000;2. 丹东出入境检验检疫局,辽宁 丹东 118000)

摘要:目的 对大连地区水产企业生产加工用水进行肠球菌检测,判断其卫生状况。方法 根据水质检测 ISO 标准(ISO 7899—2:2000)薄膜过滤法,进行肠球菌分离培养和生化反应鉴定,并根据肠球菌的高度保守的特异性 *tuf* 基因,合成了特异性引物进行 PCR 扩增。结果 在 41 份检测样品中,两种方法的肠球菌检出率均为 14.6%,主要为群 II 菌株。结论 本地区加工用水卫生状况不理想,应采取行之有效的措施,加强预防和治理。

关键词:肠球菌;大连地区;加工用水;食品安全;水产品

中图分类号:R123.1;TS201.6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2013)05-0461-04

The detection and analysis of *Enterococcus* in processing water for seafood enterprises in Dalian

TIAN Zhuo, MA Li-dan, CHEN Xiao-dong, CUI Yan, YAN Ping-ping

(Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian Qingdao 116000, China)

Abstract: Objective The aim of the study was to investigate the hygiene and sanitation of seafood enterprises according to *Enterococcus* in processing water. **Methods** According to the method of ISO7899-2:2000 (Water quality-Detection and enumeration of *Enterococcus*-Part 2: Membrane filtration method), *Enterococcus* was isolated and identified. Primers and probes were designed and synthesized targeting *tuf* gene. **Results** The results showed that 14.6% of the 41 isolates were *Enterococcus* positive. Most of them were Group II strains. **Conclusion** We should take effective measures of prevention and control because the health status was not satisfying.

Key words: *Enterococcus*; Dalian; processing water; food safety; aquatic products

在细菌学分类上,肠球菌(*Enterococcus*)属原归属于链球菌属。1989年,依据 Facklam 和 Collins 的分类,划分出肠球菌,该属共有 12 个种和 1 个变异株,包括寄生于人类、牛及其他反刍动物的粪肠球菌以及寄生于人类、牛及其他反刍动物、家禽和猪中的屎肠球菌等。

肠球菌通常寄生于各种温血和冷血动物的腔

肠,也是健康人体的上呼吸道、口腔或肠道的常居菌,其在宿主组织寄生,导致宿主非特异及免疫防御机制紊乱,并引起病理改变,能导致感染,可以引起宿主心内膜炎、胆囊炎、脑膜炎、尿路感染及伤口感染等多种疾病^[1]。此属细菌极易污染食品、生活和加工用水,易传播疾病。并且由于肠球菌具有天然耐药和获得性耐药的征^[2-4],使所致感染治疗困难^[5],因此,肠球菌成为食品、水质、加工设备卫生和生产环境卫生状况的评估指标。我国国家标准对饮用水中肠球菌无明确限量要求,欧盟饮用水