

论著

金黄色葡萄球菌在草莓上生长模拟试验研究

代晓航^{1,2}, 郭灵安^{1,2}, 魏超^{1,2}, 张富丽^{1,2}

(1. 四川省农业科学院分析测试中心, 四川 成都 610066;

2. 四川省农业科学院 农业部农产品质量安全风险评估实验室(成都), 四川 成都 610066)

摘要:目的 研究模拟试验中回收草莓上金黄色葡萄球菌的最佳方法,为以后的风险评估提供基础研究依据。方法 对草莓进行不同类型的污染处理,于25℃条件下贮存,在不同时间点用不同样品处理方式对金黄色葡萄球菌回收并计数。结果 0.1%蛋白胨水和去离子水作为菌体载体对金黄色葡萄球菌在草莓上的生长影响差异有统计学意义($P < 0.05$),用0.1%蛋白胨水作为菌体载体能更好的模拟真实污染情况并得到更好的回收效果。均质和振荡处理对金黄色葡萄球菌回收效果影响差异无统计学意义($P > 0.05$),不同来源金黄色葡萄球菌的生长情况差异无统计学意义($P > 0.05$)。25℃贮存条件下,草莓上金黄色葡萄球菌在36h内成倍增长。结论 金黄色葡萄球菌在草莓上生长模拟试验发现,载体的选择非常重要。在其他风险评估模拟试验中,也应考虑实际污染的各方面因素来设计方案才能得到最真实的试验结果,为微生物风险评估提供科学依据。

关键词:草莓;金黄色葡萄球菌;模拟;生长;食源性致病菌;食品安全

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)01-0001-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.01.001

Study of simulating growth of *Staphylococcus aureus* on strawberryDAI Xiao-hang^{1,2}, GUO Ling-an^{1,2}, WEI Chao^{1,2}, ZHANG Fu-li^{1,2}

(1. Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 610066, China; 2. Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Security Risk Assessment Laboratory of Ministry of Agriculture (Chengdu), Sichuan Chengdu 610066, China)

Abstract: Objective To find the best methods of recovery and investigate the growth of *Staphylococcus aureus* on strawberry to provide basis for further risk assessment. **Methods** Experiments for validating the efficiency of recovery and enumeration were conducted with different carriers of strains, processing methods and different strains of the same bacterial under 25℃ culture in different time points. **Results** Deionized water and 0.1% aqueous peptone solution showed significant difference on recovery and growth of *Staphylococcus aureus*, and 0.1% aqueous peptone solution presented a better effect. Processing method with homogenizing or shaking and different strains of the same bacteria had less impact on recovery and growth. Under 25℃, *Staphylococcus aureus* on strawberry could multiply within 36 hours. **Conclusion** The carrier's impact was identified. When simulates practical conditions of surface contamination of produce, all factors should be considered for the risk assessment.

Key words: Strawberry; *Staphylococcus aureus*; mimics; growth; foodborne pathogens; food safety

草莓在果品生产中占有重要地位,是当今世界十大水果之一,具有较高的营养、药用及医疗保健价值,无皮无核,可食部分达98%,色泽鲜美,柔嫩多汁,酸甜适口,深受人们喜欢^[1]。草莓无皮保护,

表面凹凸不平,所以是一种极易受到外界直接或间接污染的水果,其中包括生物污染。在以往的报道中就多次从草莓中分离到人类病原菌,同时也提醒应加大致病微生物的监控^[2-4]。金黄色葡萄球菌在食物中毒事件中较为常见,占细菌性食物中毒事件总数的33%^[5],有调查发现果蔬中金黄色葡萄球菌的检出率为10%,并多与环境污染相关^[6]。

不同的产品基质为微生物的生长提供了不同的条件,在农产品微生物风险评估中,需要了解微生物在特定条件下的生长情况,来进一步进行风险分析^[7]。本试验通过8种不同的样品处理方式,对

收稿日期:2016-12-01

基金项目:食用农产品中病虫害残余物和病原微生物污染调查与产品安全性评估(GJFP2016013)

作者简介:代晓航 女 副研究员 研究方向为食品和农产品微生物检测及风险评估 E-mail:1016836084@qq.com

通信作者:郭灵安 男 副研究员 研究方向为农产品风险评估 E-mail:gla028@163.com

金黄色葡萄球菌在草莓上生长模拟试验得到最佳回收效果做出研究,并探究金黄色葡萄球菌在草莓上的生长情况,旨在为草莓的微生物风险评估工作的开展提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和样品

试验菌株为两株金黄色葡萄球菌,一株分离自草莓样品,不产肠毒素;另一株分离自食物中毒样品,产肠毒素,均在本实验室分离。草莓样品采自成都草莓生产基地。

1.1.2 主要仪器与试剂

HY-5A 回旋振荡器, MJX 生化培养箱, 均质器。0.1% 蛋白胨水、贝尔德帕克琼脂平板(BP 平板)、血浆凝固酶、0.85% 生理盐水均购自北京陆桥技术股份有限公司,所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 制备试验菌液

为了模拟果蔬表面污染的实际环境,分别使用

两种载体,一种不含有有机质(去离子水),另一种含有有机质(0.1% 蛋白胨水),从而了解载体营养物质对金黄色葡萄球菌生存与生长的影响^[8]。用两种载体调菌液浓度至 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 备用。

1.2.2 样品处理和贮存

采用点植接种对样品进行人工污染,每份样品加入 100 μ l 制备的试验菌液,于 25 $^{\circ}$ C 条件下贮存。因为草莓上市季节中最高温度在 25 $^{\circ}$ C 左右,按照风险最大化原则,采取该温度作为试验温度。草莓在该温度下的正常贮存时间为 2 d,设置 6 个监测时间点,从金黄色葡萄球菌被接种到草莓上开始第一次监测,连续监测 2 d,共监测 6 次。

1.2.3 检测方法

参照 GB 4789.10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[9] 第二法平板计数法,检测过程中调整样品稀释液 pH 至中性。为减少样品不均匀带来的误差,每个样品做 3 个平行,结果取平均值。此次试验一共设定 8 组不同处理方式,编号 A~H,详见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌回收测试中样品处理方法

Table 1 Methods used to prepare sample to analyze for populations of *Staphylococcus aureus*

样品编号	取样量/g	菌体载体	稀释液	体积/ml	处理方法	时间/min	菌株来源	是否产毒
A	15	去离子水	0.85% 生理盐水	135	均质	1	草莓样品	否
B	16	去离子水	0.85% 生理盐水	144	均质	1	食物中毒样品	是
C	16	去离子水	0.85% 生理盐水	144	振荡	20	草莓样品	否
D	14	去离子水	0.85% 生理盐水	126	振荡	20	食物中毒样品	是
E	17	0.1% 蛋白胨水	0.85% 生理盐水	153	均质	1	草莓样品	否
F	18	0.1% 蛋白胨水	0.85% 生理盐水	162	均质	1	食物中毒样品	是
G	19	0.1% 蛋白胨水	0.85% 生理盐水	171	振荡	20	草莓样品	否
H	20	0.1% 蛋白胨水	0.85% 生理盐水	180	振荡	20	食物中毒样品	是

1.3 统计学分析

采用 Excel 与 SPSS 20.0 软件对试验数据进行差异性分析,同时绘制生长曲线图^[10]。

2 结果与分析

2.1 金黄色葡萄球菌计数结果

表 2 显示了 8 种不同处理方式下金黄色葡萄球菌计数结果,每种处理方式采用 3 个平行,8 种处理方式的最终结果以 3 个平行结果的平均值计。采用两种不同载体的金黄色葡萄球菌生长情况差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 金黄色葡萄球菌生长测试结果

8 种不同处理方式下金黄色葡萄球菌的生长曲线如图 1 所示。由图 1 可以观察到,模拟污染试验中,不同载体对金黄色葡萄球菌的生长影响较大。E~H 组处理方式为采用 0.1% 蛋白胨水作为菌体载体污染草莓,4 h 内金黄色葡萄球菌生长可能处

于延滞期,菌落总数略有降低,15 h 后,菌落总数开始呈增长趋势,最终达到 10 000 CFU/g 左右,较初始污染量增加了 2.5 倍。A~D 组处理方式为采用去离子水作为菌体载体污染草莓,0~4 h 内金黄色葡萄球菌快速消亡,直到 15 h 后,菌落总数开始呈缓慢消亡趋势,最终达到 150 CFU/g 左右,较初始污染量减少了 27 倍,即 1.5 个对数单位。因此,0.1% 蛋白胨水作为成分明确的有机载体为金黄色葡萄球菌的生长提供了营养条件,同时也更好的模拟了实际污染。而去离子水不能为菌体提供营养条件,不符合实际污染情况,没有载体营养支持的金黄色葡萄球菌仅依靠草莓本身提供的营养条件,不能较好生长,呈逐渐消亡趋势。

2.3 均质和振荡处理对金黄色葡萄球菌回收效果的影响

将所有采用均质处理的试验结果(包括产肠毒素和不产肠毒素菌株)与所有采用振荡处理的试验

表2 金黄色葡萄球菌计数结果

Table 2 Results of enumeration of *Staphylococcus aureus*

样品 编号	菌落总数/(CFU/g)					
	0 h	4 h	15 h	21 h	30 h	36 h
A-1	3 850	1 173	310	500	360	140
A-2	3 630	1 020	198	430	486	130
A-3	3 910	988	164	386	420	185
B-1	3 666	1 030	162	366	380	102
B-2	4 010	1 052	302	484	394	128
B-3	3 780	1 880	193	600	582	160
C-1	3 850	936	258	288	220	138
C-2	3 900	1 012	266	326	286	142
C-3	3 620	853	212	260	160	90
D-1	3 800	962	152	292	322	80
D-2	3 626	1 018	186	318	280	120
D-3	4 010	1 113	130	330	270	150
E-1	4 100	1 667	3 853	8 920	8 940	9 200
E-2	4 012	1 750	3 820	8 728	9 200	9 018
E-3	3 980	1 560	3 788	9 100	8 788	9 388
F-1	4 600	2 853	4 073	8 004	9 387	11 987
F-2	4 568	3 024	4 182	7 898	9 106	12 098
F-3	4 320	1 688	3 982	8 202	9 520	10 026
G-1	3 020	2 447	3 130	9 580	9 460	10 096
G-2	3 280	2 289	3 026	9 888	9 220	9 980
G-3	3 890	2 562	3 860	9 782	9 610	11 220
H-1	3 140	2 813	4 960	7 400	10 920	8 973
H-2	3 018	3 020	5 020	7 800	9 860	9 822
H-3	3 880	2 678	4 869	7 100	12 040	8 898

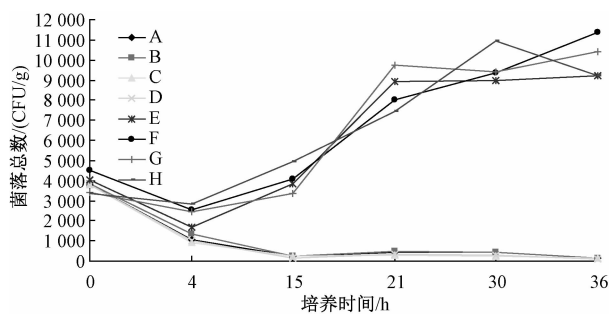
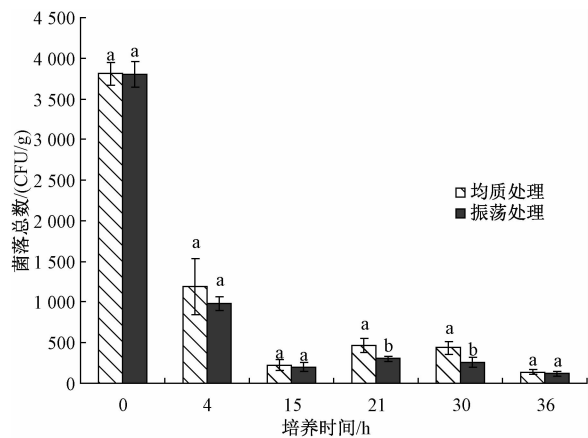


图1 8种处理方式下金黄色葡萄球菌生长曲线

Figure 1 Growth curve of *Staphylococcus aureus* under eight ways

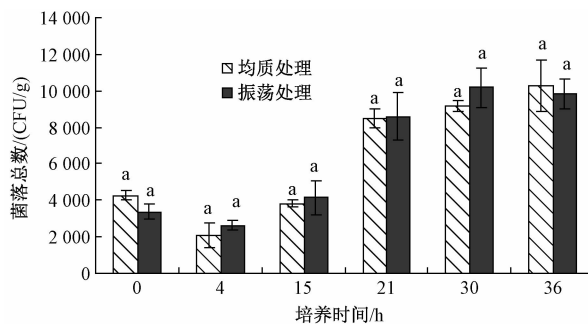
结果(包括产肠毒素和不产肠毒素菌株)用 SPSS 软件分析。图 2 和图 3 分别为用去离子水、0.1% 蛋白胨水作为载体,对各培养时间点金黄色葡萄球菌回收的数据分析结果。均质能使草莓组织完全破坏,组织内外都可以检测到金黄色葡萄球菌,但同时也会使表面微生物暴露于低 pH 值或是组织液相关的胁迫条件,而酚类、有机酸类物质对金黄色葡萄球菌都具有抑制作用^[11]。振荡的方式能保持草莓的完整,但由于草莓表面凹凸不平,且有一些细菌已经内化,不易在表面清洗过程中完全去除,所以两种方法各有优缺点。

此次试验结果由图 2 和图 3 可以看出,调整样



注:同一时间点柱状图上误差线上均为字母 a,表示差异无统计学意义($P > 0.05$),若为 a 和 b,则表示差异有统计学意义($P < 0.05$)

图2 样品均质和振荡处理对金黄色葡萄球菌回收的比较(去离子水载体)

Figure 2 Retrieval comparison of *Staphylococcus aureus* between stomach and shake(deionized)

注:a 表示差异无统计学意义($P > 0.05$)

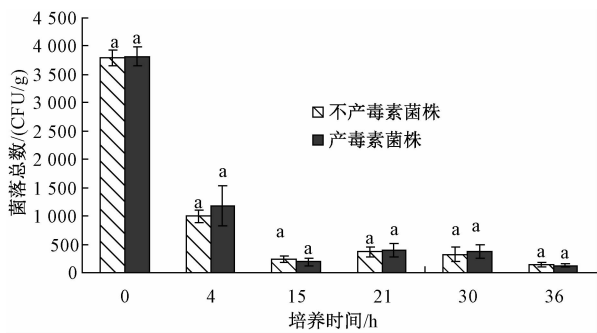
图3 样品均质和振荡处理对金黄色葡萄球菌回收的比较(0.1% 蛋白胨水载体)

Figure 3 Retrieval comparison of *Staphylococcus aureus* between stomach and shake(0.1% aqueous peptone solution)

品液 pH 至中性后,两种处理方式对结果的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。所以认为均质和振荡都可以适用于草莓上金黄色葡萄球菌的回收。图 2 中 21、30 h 时均质较振荡方式能回收到更多金黄色葡萄球菌,可能是因为随着草莓表面某些对金黄色葡萄球菌有抑制作用的菌体的消亡,使均质处理后的金黄色葡萄球菌更多的被检测到,但到了 36 h,菌落总数已很少,不足以体现出差异性。但在图 3 中,因为载体提供了更为良好稳定的生长环境,无论金黄色葡萄球菌还是与之相关的细菌都能保持稳定的生长,所以图 3 所监测的数据差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 不同来源金黄色葡萄球菌菌株生长结果

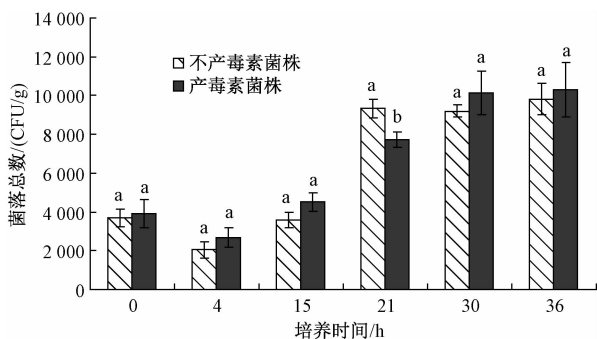
将所有不产毒素菌株试验结果(包括均质和振荡)与所有产毒素菌株试验结果(包括均质和振荡)用 SPSS 软件分析。图 4、5 分别为用去离子水、0.1% 蛋白胨水作为载体,对各培养时间点金黄色葡萄球菌回收的数据分析结果。结果表明两种不同来源菌株



注: a 表示差异无统计学意义 ($P > 0.05$)

图4 对不同来源金黄色葡萄球菌的回收比较 (去离子水载体)

Figure 4 Retrieval comparison of *Staphylococcus aureus* from different sources (deionized)



注: 同一时间点柱状图上误差线上均为字母 a, 表示差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 若为 a 和 b, 则表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

图5 对不同来源金黄色葡萄球菌的回收比较 (0.1% 蛋白胨水载体)

Figure 5 Retrieval comparison of *Staphylococcus aureus* from different sources (0.1% aqueous peptone solution)

的生长回收差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

从果蔬中回收病原微生物的最佳试验方法应根据分析对象来设定, 可能是果蔬表面, 也可能是果蔬组织, 或是同时分析表面与组织。可以采用洗涤、摩擦、混合、均质等多种方法来进行前增菌、增菌或稀释。同时应考虑果蔬中可能存在的受胁迫或损伤的微生物细胞, 以及微生物之间的相互作用。另外, 果蔬表面农药残留等化学因素也可使微

生物细胞受损, 如果要对这些细胞进行检测和计数, 那么细胞修复是非常重要的。对于高酸性果蔬, 应调整 pH 以保护微生物细胞在样品制备过程中免受致死条件的作用。

本次试验中, 对载体、样品处理方式和不同来源菌株的回收效果进行了比较, 发现这 3 种因素中载体对最终回收结果的影响较大。实际环境中, 除了草莓自身会为微生物生长提供营养外, 其他与之接触的环境、食物等都会为其提供营养, 发生交叉污染, 对微生物的生长产生促进或抑制作用。因此, 在该类生长模拟试验中, 不考虑载体因素而对样品进行完全独立测试不能很好的模拟现实情况。

总之, 微生物生长模拟试验需要根据样品及目标菌的不同性质, 以及样品的消费模式来设计试验方案, 才能更好的为风险评估工作提供科学有效的技术支撑。

参考文献

- [1] 雷世俊, 赵兰英. 草莓种好不难 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 1-2.
- [2] 魏超, 郭灵安, 胡莉, 等. 草莓表面农药残留检测及其对微生物群落影响 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(6): 2534-2538.
- [3] 李玲, 高景红, 肖志勇, 等. 设施草莓质量安全风险调查与剖析 [J]. 农产品质量与安全, 2014(5): 56-60.
- [4] 于艳丽, 殷如意. 草莓生产过程中 HACCP 原理的应用 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5717-5719.
- [5] 戴诗皎, 李睿. 金黄色葡萄球菌感染现状及其肠毒素检测研究 [J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(1): 26-30.
- [6] 于宏伟, 郭润芳, 贾英民. 食品中金黄色葡萄球菌的分布及相关毒力基因的表达研究 [J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(1): 87-93.
- [7] Forsythe S J. The microbiological risk assessment of food [J]. Blackwell Science, 2002, 23(6): 1351-1355.
- [8] Sapers G M, Gorny J R, Yousef A E. Microbiology of fruits and vegetables [M]. Boca Raton: CRC Press, 2006: 550-551.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.10—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] 丁雪梅, 徐向红, 邢沈阳, 等. SPSS 数据分析及 Excel 作图在毕业论文中的应用 [J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(3): 122-128.
- [11] 陈燕, 孙晓红, 曹奕, 等. 蓝莓抑菌活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(5): 716-721.