

调查研究

郑州市熟肉制品中产气荚膜梭菌污染状况调查

王小慧¹, 魏法山², 赵莉君¹, 牛会敏², 李苗云¹, 柳艳霞¹, 赵改名¹

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002;

2. 河南省产品质量监督检验院, 河南 郑州 450004)

摘要:目的 了解郑州市熟肉制品中产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)的污染状况,为熟肉制品储存过程中产气荚膜梭菌的安全控制提供技术支持。方法 按照 GB 4789.13—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》中的方法分别对11种不同样品进行检测分析,结合 VITEK 鉴定法和分子生物学鉴定法进一步验证。结果 259份样品中,产气荚膜梭菌检出份数为38份,总检出率14.7%,不同样品的检出率范围为0.0%~33.3%,其中盐焗鸡样品检出率最高为33.3%(7/21),卤半片鸭和卤鸡肝样品未检出。烧鸡、烤鸡和卤鸡腿样品的产气荚膜梭菌菌落总数均超过 $5.0 \log_{10}$ CFU/g,其他样品的菌落总数均在 $4 \log_{10}$ ~ $5 \log_{10}$ CFU/g之间。结论 郑州市熟肉制品中的产气荚膜梭菌污染现象较严重,烧鸡、烤鸡和卤鸡腿的菌落总数较高,有引起食物中毒的可能。

关键词:熟肉制品; 污染; 产气荚膜梭菌; VITEK 鉴定法; 分子生物学方法; 郑州市; 食品污染物; 食品安全

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)02-0194-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.02.017

Investigation on *Clostridium perfringens* contamination in cooked meat in ZhengzhouWANG Xiao-hui¹, WEI Fa-shan², ZHAO Li-jun¹, NIU Hui-min², LI Miao-yun¹,
LIU Yan-xia¹, ZHAO Gai-ming¹

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Henan Zhengzhou 450002, China; 2. Product Quality Supervision and Inspection Institute of Henan Province, Henan Zhengzhou 450004, China)

Abstract: Objective To investigate the *Clostridium perfringens* contamination in cooked meat in Zhengzhou, and provide technical support for the safety control of *Clostridium perfringens* during the storage of cooked meat. **Methods** Total 11 kinds of samples were detected in accordance with the GB 4789.13-2012. In addition, VITEK identification method and molecular biology method (PCR molecular biology method) were used for further validation. **Results** In the 259 tested samples, *Clostridium perfringens* were detected in 38 samples. The total detection rate was 14.7%, the detection rate in different foods ranged from 0% to 33.3%, and the detection rate in salt baked chicken was the highest (33.3%, 7/21). However, there was no *Clostridium perfringens* in stewed half duck and stewed chicken liver. The count of *Clostridium perfringens* in barbeque chicken, roasted chicken and stewed chicken leg have reached $5.0 \log_{10}$ CFU/g, and the count of *Clostridium perfringens* in other samples were between $4 \log_{10}$ and $5 \log_{10}$ CFU/g. **Conclusion** The *Clostridium perfringens* contamination in cooked meat in Zhengzhou was serious. Furthermore, there was a higher possibility of food poisoning in barbeque chicken, roasted chicken and stewed chicken leg.

Key words: Cooked meat; contamination; *Clostridium perfringens*; VITEK 2 Compact; molecular biology method; Zhengzhou; food contamination; food safety

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*),革兰阳性直杆菌,在空气、土壤、水、人和动物的肠道中都可

以发现此菌^[1]。产气荚膜梭菌可于20~50℃范围内生长,最适生长温度为45℃^[2]。由产气荚膜梭菌导致的食物中毒多与肉制品相关^[3]。产气荚膜梭菌是美国食物中毒最常见的致病菌之一,调查结果^[4]显示美国1998—2010年由产气荚膜梭菌引起的食物中毒事件中,肉类食品占食品源的92%,其中牛肉制品占46%,禽肉制品占30%,猪肉制品占16%。我国学者近年来也对食品中产气荚膜梭菌污染情况进行调查,

收稿日期:2017-01-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31571856)

作者简介:王小慧 女 硕士 研究方向为畜产品加工与质量控制

E-mail:1543030151@qq.com

通信作者:李苗云 女 教授 研究方向为肉品加工与安全控制

E-mail:limy7476@126.com

冉陆等^[5]对 140 份市售食品样品进行产气荚膜梭菌污染情况调查,其中有 32 份样品为阳性,在阳性样品中,肉、禽类及其制品占 93.75%,夏季肉类食品的阳性率高于冬季,一些熟肉食品产气荚膜梭菌的污染量甚至超过 5.0log₁₀ CFU/g。当食入产气荚膜梭菌含菌量 5.0log₁₀ CFU/g 以上的污染食品时,即可引起食物中毒^[6]。王艳红等^[7]对 231 份肉类熟食进行产气荚膜梭菌检测,总检出率为 38.96%,不同样品的检出率范围为 13.33%~53.33%,其中猪肉制品最高,鱼类制品最低。王捷^[8]从变质罐头中检测出有产气荚膜梭菌,李爱军^[9]分析了一起产气荚膜梭菌引起的食物中毒,其含菌量达到 6.72log₁₀ CFU/g。基于国内外的研究现状,产气荚膜梭菌仍然是引起食物中毒的重要食源性致病菌,河南省作为我国肉制品生产和加工的主要省份之一,急需对熟肉制品中产气荚膜梭菌的污染状况进行评估,以确保熟肉制品的质量安全。为了解河南省郑州市熟肉制品中产气荚膜梭菌的污染状况,本研究对 11 种 259 份样品进行检测,并使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统和 PCR 分子生物学方法进一步鉴定,为预防产气荚膜梭菌食物中毒提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与菌株来源

2016 年 5~6 月自河南省郑州市的 5 个超市中采集 11 种共 259 份样品,其中盐焗鸡 21 份、盐焗鸭 11 份、麻辣鸡上腿 20 份、卤猪脸 33 份、烧鸡 71 份、烤鸡 18 份、卤鸡腿 32 份、卤琵琶腿 22 份、可乐鸡腿 11 份、卤半片鸭 10 份和卤鸡肝 10 份,所有样品均为超市当天生产、在 4℃ 下储存的散装熟肉制品。

产气荚膜梭菌标准阳性菌株(ATCC 13124),购自美国模式培养物保藏所。

1.1.2 主要仪器与试剂

3730XL 型测序仪、2720 thermal cycler 型 PCR 仪均购自美国 Applied Biosystems, VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统(法国梅里埃),FR980 型凝胶成像仪(上海复日科技仪器有限公司),DYY-5 型稳压电泳仪(北京六一仪器厂),蒸汽压力灭菌锅,ST/35 型真空包装机,恒温水浴锅,生化培养箱,洁净工作台,厌氧培养罐,均质器,DNA 电泳槽,电热恒温水槽,冷冻高速离心机,SP10-1000 型 Surf 系列精密单道可调移液器。

胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸(TSC)琼脂、液体硫乙醇酸盐培养基(FTG)、缓冲动力-硝酸盐培养基、乳糖-明胶培养基、含铁牛乳培养基均购自北京陆桥

技术股份有限公司,胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,北京奥博星生物技术有限责任公司),厌氧菌及棒状杆菌鉴定卡 ANC TEST KIT(美国 bioMerieux. Inc 公司),Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 样品采集及处理

将购买的 11 种散装熟食样品在无菌操作台中装袋,然后进行真空包装,贴好标签,置于 46℃ 培养箱中 48~72 h,直至有胀袋现象出现,进行检测。

1.2.2 样品检测

国标鉴定法:参考 GB 4789.13—2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验》^[10]中的方法,从每个胀袋样品中取 25 g 样品放入含有 225 ml 0.1% 蛋白胨水的均质袋中,均质 100 s 制成 1:10 稀释液,梯度稀释制备 10⁻²~10⁻⁵ 的系列稀释液,吸取各种稀释液 1 ml 加入无菌平皿内,每个稀释度做 2 个平行,每个胀袋样品做 3 个平行。每个平皿倾注 15 ml TSC 琼脂,充分混匀,凝固后再加 10 ml TSC 琼脂均匀覆盖平板表层,待琼脂凝固后,37℃ 条件下厌氧培养 20~24 h。典型的产气荚膜梭菌在 TSC 琼脂平板上为黑色菌落,从单个平板上任选 5 个(小于 5 个全选)黑色菌落做确证试验,标准菌株(ATCC 13124)作阳性对照。

VITEK 鉴定法:选取 2 株经国标法鉴定为产气荚膜梭菌的菌株(标号为 S413-1 和 S413-2,分别来自不同的样品)进一步验证,标准菌株(ATCC 13124)作对照。按照 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统规定的操作配成菌悬液,填充鉴定卡并上机检测。

分子生物学鉴定法:将选取的可疑菌 S413-1 和 S413-2 按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒的操作步骤进行检测,细菌 16S rDNA 菌种鉴定,提取 DNA,用特定引物 27-F (AGTTTGATCMTGGCT CAG) 和 1492-R (GGTTACCTTGTTACGACTT) 进行 PCR 扩增(约 1 500 bp),PCR 产物纯化测序,将得到的 16S rDNA 序列在核糖体数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)上比对[在生物工程(上海)股份有限公司完成]。

1.2.3 典型菌落计数

按照 GB 4789.13—2012^[10] 选取典型菌落数在 20~200 CFU 之间的平板,计算典型菌落数。计算公式为:

$$T = \sum \left(A \frac{B}{C} \right) / (n_1 + 0.1n_2) d$$

其中: T 为样品中产气荚膜梭菌的菌落数, CFU/g; A 为单个平板上典型菌落(黑色菌落)数,

CFU; B 为单个平板上经确证试验为产气荚膜梭菌的菌落数, CFU; C 为单个平板上用于确证试验的菌落数, CFU; n_1 为第一稀释度(低稀释倍数)经确证试验有产气荚膜梭菌的平板个数; n_2 为第二稀释度(高稀释倍数)经确证试验有产气荚膜梭菌的平板个数; 0.1 为稀释系数; d 为稀释因子(第一稀释度)。

1.3 统计学分析

采用 Excel 分别计算每份样品中产气荚膜梭菌的菌落数。计算公式为:

$$A = \bar{X} + \log_n (SD^2/2)$$

其中, A 为每份样品产气荚膜梭菌平均值的估计值, CFU/g; \bar{X} 为每份样品产气荚膜梭菌菌落计数结果取对数值后的平均值, CFU/g; n 为每份样品中产气荚膜梭菌菌落计数取平均值后的对数值, CFU/g; SD 为标准差。

各指标数据采用 Origin 8.0 软件分析作图。

2 结果与分析

2.1 鉴定结果

2.1.1 生化鉴定结果

可疑菌在 TSC 平板上有黑色较大圆形菌落生成, 从单个平板上任选 5 个(小于 5 个全选)黑色菌落, 分别接种到 FTG 培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h, 在 FTG 液体培养基中有絮状物和气泡产生, 取生长旺盛的 FTG 培养液 1 ml 接种于含铁牛乳培养基, 46 °C 水浴培养 2 h 后呈现“暴烈发酵”现象, 但培养基不变黑; 用接种环取 FTG 培养液穿刺接种缓冲动力-硝酸盐培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h, 菌株无动力, 只沿穿刺线生长, 滴加 0.5 ml 硝酸盐还原试剂甲和 0.2 ml 试剂乙立即出现红色, 表明菌株能将硝酸盐还原为亚硝酸盐; 用接种环取 FTG 培养液穿刺接种乳糖-明胶培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h, 培养基由红变黄, 表明乳糖被发酵并产酸, 且明胶液化, 这与标准菌株(ATCC 13124)的试验现象一致。

2.1.2 VITEK 鉴定结果

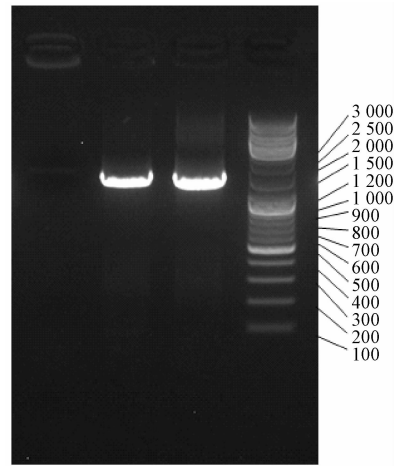
标准菌株(ATCC 13124)的 VITEK 鉴定率 99.9%, 菌株 S413-1 和 S413-2 的 VITEK 鉴定率分别为 98% 和 96%, 鉴定结果是产气荚膜梭菌。

2.1.3 分子生物学鉴定结果

菌株 S413-1 和 S413-2 的分子生物学鉴定结果见图 1。将得到的 16S rDNA 序列在核糖体数据库上比对, 结果表明是产气荚膜梭菌。

2.2 不同食品检出率

259 份样品中有 38 份样品检出产气荚膜梭菌, 总检出率为 14.7%, 其中盐焗鸡和可乐鸡腿样品的



阴性 S413-1 S413-2 MK

注: MK 为 Maker。

图 1 产气荚膜梭菌 S413-1 和 S413-2 的 PCR 结果

Figure 1 PCR results of *Clostridium perfringens* strains(S413-1 and S413-2)

污染情况比较严重, 检出率分别为 33.3% 和 27.3%, 见表 1。

表 1 不同样品产气荚膜梭菌的检出率

Table 1 Detection rate of *Clostridium perfringens* in different samples

食品种类	检出率/%
盐焗鸡	33.3(7/21)
盐焗鸭	18.2(2/11)
麻辣鸡上腿	20.0(4/20)
卤猪脸	12.1(4/33)
烧鸡	12.7(9/71)
烤鸡	11.1(2/18)
卤半片鸭	0.0(0/10)
卤鸡腿	15.6(5/32)
卤琵琶腿	9.1(2/22)
卤鸡肝	0.0(0/10)
可乐鸡腿	27.3(3/11)
合计	14.7(38/259)

2.3 不同食品中产气荚膜梭菌菌落总数

检测的 259 份样品中, 大部分样品菌落总数检测值较高, 当食入产气荚膜梭菌含菌量达 $5.0 \log_{10}$ CFU/g 以上的污染食品时, 即可引起食物中毒^[6], 烧鸡、烤鸡和卤鸡腿样品的菌落总数分别达到 $5.2 \log_{10}$ 、 $5.5 \log_{10}$ 和 $5.2 \log_{10}$ CFU/g, 有引起食物中毒的可能, 其他样品的菌落总数均在 $4.0 \log_{10} \sim 5.0 \log_{10}$ CFU/g 之间, 见图 2。

3 讨论

本研究了解了河南省郑州市熟肉制品中产气荚膜梭菌的污染状况, 为熟肉制品中产气荚膜梭菌的控制提供一定的依据。所检测的 259 份熟肉样品中, 盐焗鸡和可乐鸡腿样品的污染情况较为严重, 烤鸡样品的菌落总数检测值较高 ($5.5 \log_{10}$ CFU/g),

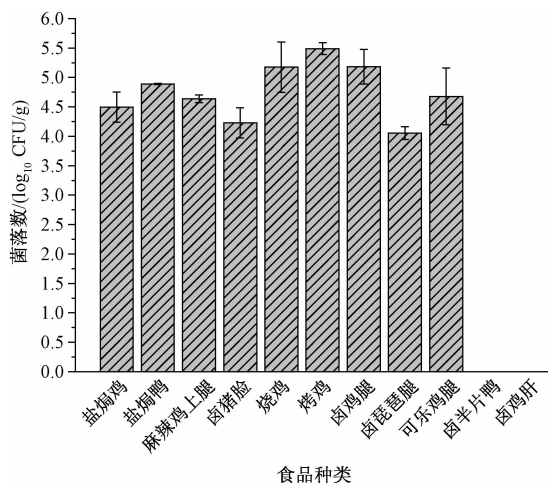


图2 不同样品中产气荚膜梭菌菌落总数

Figure 2 Count of *Clostridium perfringens* in different samples

卤琵琶腿样品的菌落总数检测值较低($4.1\log_{10}$ CFU/g)。烧鸡、烤鸡和卤鸡腿含菌量均达到 $5.0\log_{10}$ CFU/g以上,有可能引起食物中毒,应当引起重视。多数调查结果^[4-5,7]表明,肉类及其制品是产气荚膜梭菌的高危食品,应加强食品生产及销售的卫生监督管理,预防和控制食源性疾病的暴发。我国石家庄市疾病预防控制中心证实的一起产气荚膜梭菌食物中毒是由熏肘花引起的^[6],而产气荚膜梭菌引起的疾病主要是食品烹饪后处理不恰当导致的^[11]。NIETO-LOZANO等^[12]发现,真空包装的煮制火鸡样品在贮藏过程中,从 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 移至 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境温度中贮藏12 h后,样品中产气荚膜梭菌的量从 $2.0\log_{10}\sim 2.5\log_{10}$ CFU/g增至 $6.0\log_{10}$ CFU/g;因此,熟食熟制后的储藏及快速冷却过程是控制产气荚膜梭菌增长的重要阶段,但熟制后的肉制品缺乏合适的冷却处理策略,不恰当的冷却处理可能激活产气荚膜梭菌芽胞,在食品贮存的过程中可能萌发成繁殖体。如果原料肉中存在产气荚膜梭菌的孢子,肉类行业所采用的传统热处理措施不能将其杀死,在后续的冷却过程中,特别是没有遵循适当的冷却速率或当产品未妥善冷藏时,热激活的孢子会生长和繁殖,形成潜在的公共健康风险;另外,一些门店在销售过程中并没有将熟肉制品放入冰柜中冷藏,失去了低温的保存环境,这些不规范的操作都会对产品卫生状况产生影响^[13]。

目前,鲜有关于熟肉制品较为完善、具体的卫

生检验标准。构建熟肉制品中产气荚膜梭菌动态预测模型,基于动态预测模型计算出其相对生长量的概率,研究合适的冷却控制策略,对于保障消费者的健康和利益,改善我国的食物安全状况具有重要的意义。

参考文献

- [1] CRAVEN S E. Growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in foods[J]. Food Technology, 1980, 34(4):80.
- [2] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 8版. 北京:科学出版社,1984:776.
- [3] MIWA N, NISHINA T, KUBO S, et al. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 1997, 59(7):557-560.
- [4] GRASS J E, GOULD L H, MAHON B E. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(2):131-136.
- [5] 冉陆,刘宏道. 食品中产气荚膜梭菌污染情况的调查[J]. 卫生研究, 1987(5):32-34.
- [6] 郭玉梅,秦丽云,徐保红,等. 中毒食品中首次检出产气荚膜梭菌的检测报告[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3):669-670.
- [7] 王艳红,李昊宇,韩立君,等. 肉类熟食中产气荚膜梭菌污染及耐药状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20):2993-2994.
- [8] 王捷. 从变质肉罐头中检出产气荚膜梭菌[J]. 广西预防医学, 2001, 7(2):125.
- [9] 李爱军. 一起产气荚膜梭菌引起的食物中毒报告[J]. 河南预防医学杂志, 2010, 21(4):324-325.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验:GB 4789.13—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [11] BLANKENSHIP L C, CRAVEN S E, LEFFLER R G, et al. Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chili during cooling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(5):1104-1108.
- [12] NIETO-LOZANO J C, REGUERA-USEROS J I, PELÁEZ-MARTÍNEZ M D C, et al. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters [J]. Food Control, 2010, 21(5):679-685.
- [13] 张琦,王禹鑫,陈曦. 浅谈我国卤制熟食安全问题及解决方案[J]. 肉类工业, 2014(9):36-38.