

食品中金黄色葡萄球菌定量检测方法比较研究

曹建平¹, 韩丹², 王健² (1. 宁波市鄞州区食品检测中心, 浙江宁波 315100; 2. 衢州市质量技术监督检测中心, 浙江衢州 324000)

摘要 [目的] 探求一种适应食品微生物实验室检验要求的快速准确的方法。[方法] 比较研究 Baird-Parker 平板法、MPN 法、科玛嘉金黄色葡萄球菌显色培养基法和 Petrifilm™ 测试片法这 4 种定量方法对金黄色葡萄球菌的选择性、灵敏度和在食品中的应用。[结果] 试验显示, 4 种方法检测金黄色葡萄球菌选择性良好; MPN 法、显色培养基法和纸片法灵敏度比 Baird-Parker 平板法稍高; 4 种方法应用在食品检测中, 金黄色葡萄球菌检出率无显著差异。因此可选择显色培养基和 Petrifilm™ 测试纸片法作为日常检验的辅助手段, 以提高检测灵敏度、缩短检验周期。[结论] 研究可为食品检测方法的研究及应用积累一定的经验, 为今后金黄色葡萄球菌的检测工作提供一定参考。

关键词 金黄色葡萄球菌; 定量检测方法; 比较研究

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)08-242-02

A Comparative Study on Quantitative Detection of *Staphylococcus aureus* in Food

CAO Jian-ping¹, HAN Dan², WANG Jian² (1. Ningbo Yinzhou Food Testing Center, Ningbo, Zhejiang 315100; 2. Quzhou Measurement and Testing Center for Quality and Technique Supervising, Quzhou, Zhejiang 324000)

Abstract [Objective] To explore a rapid and accurate method for detection requirements of food microbiology laboratory. [Method] The four methods Baird-Parker plate, MPN, *Staphylococcus aureus* CHROMagar chromogenic media and Petrifilm™ test paper method were compared in quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in food. [Result] The results showed that all the four methods exhibited high selectivity for *S. aureus*. Although the MPN, chromogenic media and Petrifilm™ test paper methods were slightly more sensitive than Baird-Parker plate. The detection rates of the four methods showed no significant difference in *S. aureus*. It is suggested that chromogenic medium and Petrifilm™ test paper method may be an auxiliary means for daily inspection of *S. aureus* in order to improve detective sensitivity and shorter testing time. [Conclusion] The study can accumulate experience for research and application of food detection method, provide a certain reference for detection work of *Staphylococcus aureus* in the future.

Key words *Staphylococcus aureus*; Quantitative detection; Comparative study

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)属于葡萄球菌属,是一种重要的病原菌,是典型的革兰氏阳性菌,有较强的抵抗力。金黄色葡萄球菌营养要求不高,且有高度的耐盐性,容易污染肉类、水产品、乳品等食品,在世界各个国家中,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒在细菌性食物中毒中均占较大比例^[1-2],金黄色葡萄球菌引起的食物中毒已成为世界性的公共卫生问题。

目前关于食品中金黄色葡萄球菌的定量检测方法主要有 Baird-Parker 平板计数法^[3]、MPN 计数法^[3]、测试纸片法^[4]、显色培养基计数法等。其中 Baird-Parker 平板计数法和 MPN 计数法为国标法的第二法和第三法,但两者都存在耗时、工作量大的缺陷,很难适应现在快速检验要求;测试纸片法、显色培养基计数法检测周期短、工作量小,已经得到了很多机构的认可。笔者比较研究了这 4 种定量方法对金黄色葡萄球菌的选择性、灵敏度和在食品中的应用,以 Baird-Parker 平板计数法为基准,将结果进行比较分析研究,旨在探求一种适应食品微生物实验室检验要求的快速准确的方法,为食品检测方法的研究及应用积累一定的经验,为今后金黄色葡萄球菌的检测工作提供一定参考。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及培养基。平板计数琼脂、营养肉汤、BHI 肉汤、Baird-Parker 琼脂基础、卵黄亚碲酸钾增菌剂、冻干血浆,青岛海博生物技术有限公司;革兰氏染色液,北京陆桥;

科玛嘉金黄色葡萄球菌显色培养基,法国科玛嘉公司;Petrifilm™6491 金黄色葡萄球菌测试片、Petrifilm™6493 金黄色葡萄球菌确认反应片,美国 3M 公司。

1.1.2 试验菌株。金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希氏菌(ATCC25922)、表皮葡萄球菌(ATCC29069),宁波市鄞州区食品检测中心提供。

1.1.3 样品。采集宁波市农贸市场及超市的食品 50 份,其中生肉类 10 份、熟肉制品 10 份、生牛奶 10 份、豆制品 10 份、糕点 10 份。

1.2 试验方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌的检验。Baird-Parker 平板计数法:按 GB 4789.10-2010 第二法检验。MPN 法:按 GB 4789.10-2010 第三法检验。科玛嘉金黄色葡萄球菌显色培养基平板法:每个稀释度分别吸取 1 ml 样品匀液以 0.3、0.3、0.4 ml 接种量分别加入 3 块显色培养基平板上,然后用无菌 L 棒涂布整个平板,注意不要触及平板边缘,按说明书判读。Petrifilm™测试片计数法:取 1 ml 稀释好的菌液接入测试片,静置测试片 1 min, (36 ± 1) °C 培养 24 h,按说明书判读,有可疑菌落时,用确认反应片做补充试验。

1.2.2 选择性鉴定试验。将 3 株试验菌株分别划线接种于 Baird-Parker 平板和显色培养基平板;MPN 法的鉴定同 Baird-Parker 平板;以生理盐水作 10 倍系列稀释,取 1 ml 接种 Petrifilm™测试片(使菌液终浓度在 100 ~ 1 000 CFU/ml);36 °C 培养 24 ~ 48 h,观察各菌株的典型生长情况,并进行特异性比较。

1.2.3 灵敏度试验。在 4 种培养基上加入不同菌浓度的金

作者简介 曹建平(1982-),女,浙江宁波人,工程师,硕士,从事微生物检验研究。

收稿日期 2015-01-30

黄色葡萄球菌菌悬液,每个测试作 2 个平行,按“1.2.1”方法培养,判读,计数,同时以平板计数琼脂倾注法计算菌浓度作对照,评价 4 种试验方法的检测灵敏度。

1.2.4 食品中检测应用 无菌生理盐水作 10 倍系列稀释同一样品后,选择适当的稀释度分别按“1.2.1”方法检测,结果用 SPSS 18.0 软件以 χ^2 检验分析。

2 结果与分析

2.1 选择性试验比较 3 株试验菌株中,金葡菌在 4 种培养基中生长良好(MPN 法最终也是用 BP 平板筛选),特征菌落

明显,表皮葡萄球菌在 4 种培养基中虽然有生长,但无典型特征性菌落,大肠埃希氏菌在 4 种培养基中均不生长,结果见表 1。分析结果得出,各种培养基对金葡菌的选择性都良好,符合计数培养基的选择性要求。

2.2 灵敏性试验 用 4 种检测方法分别对金葡菌进行计数,MPN 法、显色培养基法和 Petrifilm™ 测试片法灵敏度比 Baird-Parker 平板法稍高一个数量级,但均能满足计数要求,结果见表 2。

表 1 选择性鉴定试验对比结果

菌名	Baird-Parker 平板			MPN 法			显色培养基			Petrifilm™ 测试片		
	生长	菌落颜色	沉淀环	生长	菌落颜色	沉淀环	生长	菌落颜色	沉淀环	生长	菌落颜色	沉淀环
金黄色葡萄球菌	+	黑色	有	+	黑色	有	+	紫红色菌落	有	+	紫红色	粉红色晕圈
表皮葡萄球菌	+	黑色	无	+	黑色	无	+	白色	无	+	黑色	无粉红色晕圈
大肠埃希氏菌	-	/	-	-	/	-	-	/	/	-	/	/

注:“+”表示有菌落生长,“-”表示无菌落生长。

2.3 食品中金黄色葡萄球菌检出结果分析 50 批样品中金葡菌的检出率如表 3 所示。显色培养基法、MPN 法和纸片法检出率分别为 24%、22% 和 22%,结果差不多,检出率比 Baird-Parker 平板法的稍高。但通过 SPSS 统计分析表明,MPN 法、显色培养基法、纸片法和 Baird-Parker 平板法无显著差异($\chi^2 = 2.64 < \chi_{0.05,12}^2, P > 0.05$)。

表 2 灵敏性试验对比结果

菌液稀释度	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Baird-Parker	+	+	+	-	-
MPN	+	+	+	+	-
显色培养基	+	+	+	+	-
纸片法	+	+	+	+	-

注:“+”表示有菌落生长,“-”表示无菌落生长。

表 3 不同种检测方法金黄色葡萄球菌检出结果

样品名称	样品量	Baird-Parker 法		显色培养基		MPN 法		Petrifilm™ 测试片	
		检出量	检出率//%	检出量	检出率//%	检出量	检出率//%	检出量	检出率//%
熟肉制品	10	1	10	2	20	2	20	2	20
豆制品	10	0	0	1	10	1	10	1	10
生肉	10	3	80	5	50	4	50	4	50
生牛奶	10	2	60	4	40	4	40	3	30
糕点	10	0	0	0	0	0	0	0	0
合计	50	6	12	12	24	11	22	10	22

2.4 金黄色葡萄球菌各种定量检验方法比较 对检测金黄色葡萄球菌几种方法指标的评价见表 4。Baird-Parker 法需涂布后观察然后挑去可疑菌落转接 BHI 肉汤后,再做血浆凝固酶进行证实试验,耗时 3~4 d。MPN 法更是需要对样品先进行增菌,然后再接种观察培养验证,耗时更长,步骤更是繁琐、量大。显色培养基、测试片法是基于微生物自身代谢产生的酶与相应显色底物反应显色的原理,显色培养基临用前加热煮沸溶解即可使用,接种后 24 h 观察结果,无需证实试验;纸片法只需培养后对可疑菌落加确认反应片验证即可对最终结果进行判定。在实际检验运用中,显色培养基、测试片法较传统培养基有工作量少、使用简便、灵敏度高、周期短的优点,但显色培养基和测试片成本要比 Baird-Parker 法和 MPN 法高。

表 4 金黄色葡萄球菌各种定量检验方法比较

检测方法	可操作性	灵敏度	工作量	检测时间	成本
BP 法	繁琐	一般	多	3~4 d	低
MPN 法	繁琐	高	多	4~5 d	低
显色培养基	简便	高	少	24 h	高
Petrifilm™ 测试片	简便	高	少	24~27 h	高

3 结论与讨论

金黄色葡萄球菌其菌落有典型的金黄色特征,是食源性致病菌的一种,但在日常检测过程中,常会造成金黄色色素不典型的现象,若单纯使用传统 Baird-Parker 平板和血平板,容易造成误判,张琳从 BP 平板上随机挑取典型菌落做血浆凝固酶验证试验,结果检出率为 66%^[5],这一结果与一文献

2 结果与分析

2.1 标准曲线及线性关系 用该试验方法即改进的钼蓝分光光度法和国标法同时做磷标准曲线系列,其比对测定结果见表 1。

表 1 2 种方法所测的标准系列比对

试验 编号	改进的钼蓝分光光度法		国标法	
	浓度 $c//\mu\text{g}$	吸光度 (A)	浓度 $c//\mu\text{g}$	吸光度 (A)
1	0.00	0.000	0.00	0.000
2	2.00	0.043	2.00	0.006
3	4.00	0.091	4.00	0.009
4	6.00	0.137	6.00	0.012
5	8.00	0.179	8.00	0.015
6	10.00	0.224	10.00	0.018
7	15.00	0.334	20.00	0.039
8	20.00	0.434	30.00	0.053
9	25.00	0.534	40.00	0.074
10	30.00	0.656	50.00	0.091

注:改进的钼蓝分光光度法的 $r=0.9997$; 国标法中,磷含量在磷 $0\sim 10\ \mu\text{g}$ 的标准系列, $r=0.9897$; 磷含量在 $10\sim 50\ \mu\text{g}$ 的标准系列, $r=0.9991$ 。

由表 1 可以发现,国标法磷含量在磷 $0\sim 10\ \mu\text{g}$ 的标准系列得到的吸光度低,而且不时出现“跳管”现象,线性关系差,不能满足测量需要^[4-5];改进的钼蓝分光光度法磷含量在 $0\sim 30\ \mu\text{g}$ 范围时符合比尔定律,具有良好的线性关系,其相关系数 $r=0.9997$,回归方程为改进后的方法标准曲线显色明显,吸光大,灵敏度高。

2.2 准确度试验 分别称取国家标准参考物质大米 (GWB10010)、苹果 (GWB10019),按照改进的钼蓝分光光度法进行样品检测,6 次测定的平均值均与标准参考值相符,结果见表 2。

表 2 标准物质中磷元素的测定结果 ($n=6$) %

标准物质	参考值	测定范围	平均值	标准偏差 S	RSD
大米 (GWB10010)	0.136	0.130~0.142	0.137	0.002	1.36
苹果 (GWB10019)	0.066	0.062~0.070	0.064	0.002	2.89

(上接第 243 页)

中报道的相符合^[6],这漏检往往会导致食品安全事故。Baird-Parker 法涂布时受人员熟练程度等人为因素影响,菌落有时分布不均匀而难以计数。当样品中金葡萄球菌浓度低时,Barid-Parker 法和 MPN 法结果没有显著差异,但 Baird-Parker 法更接近理论值,一般不选择 MPN 法^[7]。科玛嘉金黄色葡萄球菌显色培养基可直观上对几种葡萄球菌进行有效区分,避免了漏检和误判,节省了检测时间。PetriFilm™ 测试片,操作步骤标准化,人为误差较小,携带方便尤其适合现场取样检验。但测试片法计数时,黑色或蓝绿色的可疑菌落较多,而紫红色菌落相对较少,加确认片反应后,也只有少量菌落有粉红色晕圈。因此使用测试片法计数时,如杂菌过多,则将会影响结果,建议同时多做几个稀释度。通过比较,虽然显色培养基法及测试片法成本较高,但金黄色葡萄球菌的检出率与传统国标法即 Baird-Parker 平板法和 MPN 法相比无显著差异,却极大地缩短了检测时间,且操作简便。在实际

由表 2 可以看出,用改进的钼蓝分光光度法测定食品中磷的含量^[6],2 种国家标准物质的测定平均值均在其标准参考值范围内,测定值的相对标准偏差在 $1.36\%\sim 2.89\%$ 。表明改进的钼蓝分光光度法具有良好的准确度,样品分析结果准确可靠。

2.3 加标回收试验 选择上述 2 个已知本底的标准物质作为样品,每份样品中添加低、高 2 个不同含量的磷标准溶液,按改进的钼蓝分光光度法分别测定 2 次其含量并计算回收率,结果见表 3。由表 3 看出,平均回收率在 $95\%\sim 97\%$,符合分析方法要求。

表 3 样品加标回收率试验

标准物质	取样量	本底值	加标	样品加标测	回收率
		%	μg	定值//%	%
大米	0.302 6 × 5.0/100	0.136	50	0.152	96
(GWB10010)	0.301 9 × 2.5/100		300	0.233	97
苹果	0.328 4 × 5.0/100	0.066	50	0.079	97
(GWB10019)	0.304 1 × 2.5/100		300	0.159	95

3 结论

改进后的钼蓝比色法具有可在显色前预先调节消解液酸度,加入较稳定显色剂和曲线线性较好的优点,与国标法 (钼蓝比色法) 相比,操作方便,重现性和准确度较好,仪器设备简单,普通实验室均能配置,故而适用于食品中磷的测定。

参考文献

- [1] 吴坤. 营养与食品卫生学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 39-41.
- [2] 卫敏, 刘钟栋. 食品中磷的检测方法 [J]. 中国科学: 化学, 2010, 40(7): 914-921.
- [3] 向晓黎, 罗力力, 李红敏. 肉及肉制品中复合磷酸盐检测方法的研究及改进 [J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 51-53.
- [4] 陈澍, 向仕学, 宋建莉. 食物中磷测定方法的改进 [J]. 现代预防医学, 2004, 31(5): 796-797.
- [5] 罗颂华. 分光光度法测定食品中磷酸盐的标准曲线选择 [J]. 计量与测试技术, 2007, 34(10): 54-55.
- [6] 王光亚, 曲宁, 涂晓明, 等. GB/T5009.87-2003 食品中磷的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

检测工作中,可将选择显色培养基和 PetriFilm™ 测试纸片法作为日常检验的辅助手段,在实验室检验中推广应用。

参考文献

- [1] 李自然, 施春雷, 宋明辉, 等. 上海市食源性金黄色葡萄球菌分布状况 [J]. 食品科学, 2013, 34(1): 268-271.
- [2] 陈广全, 张惠媛, 曾静. 食品安全检测培训教材 微生物检验 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 351-352.
- [3] 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
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1895-2007 食品中金黄色葡萄球菌的快速计数法 PetriFilm™ 测试片法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [5] 张琳. 食品中金黄色葡萄球菌检测方法的比较研究 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 166-169.
- [6] SCHOELLER N P, LINGHAM S C. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M™ PetriFilm rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Microbiol, 2001, 18: 581-587.
- [7] 陆岚, 张勇, 张勇琪, 等. 金黄色葡萄球菌定量检验方法研究 [J]. 大家健康, 2011, 5(11): 39-40.