

# 进口肉类中恶臭假单胞菌的分离与鉴定

陈雨欣<sup>1,2\*</sup>, 苏粉良<sup>1,2</sup>, 鞠慧萍<sup>1,2</sup>, 周雯<sup>1,2</sup>, 臧海竹<sup>1,2</sup>, 周斐<sup>1,2</sup>, 石建华<sup>1</sup>

(1. 苏州出入境检验检疫局检验检疫综合技术中心, 苏州 215104; 2. 苏州世标检测技术有限公司, 苏州 215104)

**摘要:** **目的** 选择具有较高选择性的培养基, 分离与鉴定进口肉类中恶臭假单胞菌。**方法** 参照 GB4789.4-2010《食品安全国家标准食品微生物学沙门氏菌检验》、SN/T2099-2008《进出口食品中绿脓杆菌检测方法》, 根据 VITEK2 显示的结果做生化鉴定。**结果** 在选择性较高的沙门氏菌显色培养基上生长的菌落形态与沙门氏菌极为相似, VITEK2 显示结果为恶臭假单胞菌, 后经生化鉴定, 结果与 VITEK2 一致, 为恶臭假单胞菌。**结论** 沙门氏菌显色培养基难以区分假单胞菌, 但是亚硫酸铋琼脂(bismuth agar, BS)却可以明显区分, 所以在日常检测过程中建议不要省去 BS 平板, 在配制 BS 平板时需严格按照说明进行, 以保证实验效果。**关键词:** 冷冻肉类; 沙门氏菌; 恶臭假单胞菌

## Isolation and identification of *Pseudomonas putida* from imported meat

CHEN Yu-Xin<sup>1,2\*</sup>, SU Fen-Liang<sup>1,2</sup>, JU Hui-Ping<sup>1,2</sup>, ZHOU Wen<sup>1,2</sup>, ZANG Hai-Zhu<sup>1,2</sup>,  
ZHOU Fei<sup>1,2</sup>, SHI Jian-Hua<sup>1</sup>

(1. Comprehensive Technology Center, Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou 215104, China;  
2. Suzhou Word Standard Testing Technology Co., Ltd., Suzhou 215104, China)

**ABSTRACT: Objective** To choose a medium with higher selectivity, and isolate and identify the *Pseudomonas putida* from imported meat. **Methods** According to GB 4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella* and SN/T2099-2008 Determination of *Pseudomonas aeruginosa* in food for import and export, the biochemical identification was based on the results shown in VITEK2. **Results** The fungus which grew on the *Salmonella* culture medium was very similar to *Salmonella* in the detection process, but the identification result was *Pseudomonas putida* by VITEK2, and biochemical identification showed that the result was consistent with VITEK2, which was *Pseudomonas putida*. **Conclusion** *Salmonella* chromogenic medium is difficult to differentiate *Pseudomonas*, but sulfurous acid bismuth agar (BS) can clearly distinguish, so eliminating BS tablet is not recommended in daily inspection, and the preparation of BS tablet should strictly follow the instructions, to ensure the experimental results.

**KEY WORDS:** frozen meat; *Salmonella*; *Pseudomonas putida*

## 1 引言

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)是一种革兰氏阴性杆菌, 有些菌株为卵圆形, 单端丛毛菌, 运动活泼<sup>[1]</sup>。该菌隶属于假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、假单胞菌属

(*Pseudomonas*), 是一种具有腐化作用的细菌, 常常存在于含氧的土壤及水环境中。该菌极易感染粒细胞缺乏症患者和新生儿等免疫功能低下者, 并且还可以引起眼部及耳部感染、伤口感染等<sup>[2]</sup>。假单胞菌在冷藏温度下能迅速生长。在温度是唯一或者主要的限制因素的条件下, 假单胞

\*通讯作者: 陈雨欣, 工程师, 主要研究方向为食品微生物。E-mail: chen-yuxin126@163.com

\*Corresponding author: CHEN Yu-Xin, Engineer, Comprehensive Technology Center, Suzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.98, Suhui Road, Suzhou 215104, China. E-mail: chen-yuxin126@163.com

表 1 样品分离菌株与沙门氏菌标准菌株菌落性状  
Table 1 Colony characteristics of the sample isolation strain and *Salmonella* standard strain

| 培养基        | 样品分离菌株                       | 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028            |
|------------|------------------------------|------------------------------|
| 沙门氏菌属显色培养基 | 淡紫色, 中心菌落颜色略深                | 淡紫色, 光滑湿润, 菌落颜色较为统一          |
| BS         | 棕黑色菌落, 周围棕黑色沉淀环, 菌落表面金属光泽不明显 | 棕黑色菌落, 周围黑色沉淀环表面金属光泽明显, 光滑湿润 |
| DHL        | 光滑半透明, 湿润, 菌落形态较小            | 无色半透明, 光滑湿润, 菌落有些产硫化氢有些不产    |

菌在冷藏食品中的生长速率比其他污染细菌的生长速率快 30%<sup>[3]</sup>。由于冷却猪肉中有多种不同的腐败菌和致病菌, 在生产、流通、销售、贮藏各环节中, 若温度控制不当, 可能引起假单胞菌的大量繁殖<sup>[4]</sup>。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 样品来源

样品来自于进口肉类口岸送检的冷冻肉类, 包括鸡爪、鸡腿、鸡皮、鸡翅中、猪去骨肩肉、猪带骨中方、猪尾骨、猪小排、猪里脊、猪肘等 77 份送检样。

#### 2.1.2 标准菌株

标准菌株: 恶臭假单胞菌 ATCC17485, 鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028, 均来自环凯微生物科技有限公司

#### 2.1.3 试剂与设备

实验所需培养基包括缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、四硫磺酸盐煌绿增菌液基础(tetrathionate broth base, TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(selenite cystine broth, SC)、亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BS)、胆硫乳琼脂(deoxycholate hydrogen sulfide lactose agar, DHL)、沙门氏菌属显色培养基、氧化酶、乙酰胺、葡萄糖酸盐、精氨酸双水解酶、硝酸盐还原产气、明胶液化、赖氨酸脱羧酶、42℃生长实验, 以上除沙门氏菌属显色培养基外均购自北京陆桥技术有限责任公司。沙门氏菌属显色培养基购自上海欣中生物工程有限公司。

VITEK2 型全自动微生物鉴定仪(法国 BioMerieux 公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 前增菌

根据《GB 4789.4-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验》<sup>[5]</sup>, 将冷冻鸡爪在 4℃左右 5 h 解冻后放入 BPW 中并均质, 于 36℃培养 18 h。

#### 2.2.2 增菌

移取 1 mL 转种于 10 mL TTB 内, 于 42℃培养 24 h。同时, 另外移取 1 mL 于 10 mL SC 内, 于 36℃培养 24 h。

#### 2.2.3 分离、鉴定

取 TTB、SC 增菌液一环分别划线接种于沙门氏菌属显色培养基及 BS 上, 沙门氏菌属显色培养基于 36℃培养

24 h, BS 平板于 36℃培养 48 h。将平板培养出的菌落革兰氏染色镜检, 纯化后采用 VITEK2 鉴定。

#### 2.2.4 生化确认实验

根据 VITEK2 结果显示, 参照 SN/T2099-2008《进出口食品中绿脓杆菌检测方法》<sup>[6]</sup>进行生化实验鉴定, 鉴定过程中同时接种标准菌株作为阳性对照。

## 3 结果与分析

### 3.1 平板分离

在 77 份送检样品分离培养后, 在 3 种培养基上菌落形态与沙门氏菌标准菌株极为相似, 尤其是沙门氏菌属显色培养基和 DHL 上难以辨别, 所以给观察结果带来了难度, 无法及时排除干扰菌株。具体菌落性状见表 1。

### 3.2 革兰氏染色

77 株样品菌株的革兰氏染色镜检结果均为革兰氏阴性, 短杆状。染色结果无显著差异。

### 3.3 VITEK2 结果

选取一株样品分离菌经 VITEK2 鉴定结果为恶臭假单胞菌, 鉴定卡片 0017611565566610。

### 3.4 生化确认实验

表 2 结果表明, 样品分离菌株与恶臭假单胞菌 ATCC17485 的 13 项生化指标均符合恶臭假单胞菌的特征。

表 2 样品分离菌株与恶臭假单胞菌标准菌株生化结果  
Table 2 Biochemical results of sample isolation strain and *Pseudomonas* standard strain

| 名称      | 样品分离菌株 | 恶臭假单胞菌 ATCC17485 |
|---------|--------|------------------|
| 氧化酶     | -      | -                |
| 乙酰胺     | -      | -                |
| 葡萄糖酸盐   | -      | -                |
| 精氨酸双水解酶 | +      | +                |
| 硝酸盐还原产气 | -      | -                |
| 明胶液化    | -      | -                |
| 赖氨酸脱羧酶  | -      | -                |
| 42℃生长   | -      | -                |

注: - : 阴性; + : 阳性。

## 4 结 论

在假单胞菌属中,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas Aeruginosa*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)已经被确认为条件致病性病原菌<sup>[7-9]</sup>,然而,假单胞菌属的其他菌种也可能是严重的条件致病菌。此次在70余批常规送检的冷冻肉类中均发现恶臭假单胞菌的存在,在有氧冷藏条件下,假单胞菌可导致一些高蛋白含量食品的腐败,例如肉及肉制品、乳制品、水产品等,影响产品品质和货架期,造成经济损失<sup>[10,11]</sup>,而冷冻肉正是这样一种食品。并且有水产相关的研究表明,恶臭假单胞菌也可感染杂交鲇,为鱼类的一种病原菌,常从腐败的鱼类中检出<sup>[12]</sup>,有较强的致病性。由此表明在目前高密度人工养殖条件下,恶臭假单胞菌正在逐渐获得感染水生动物的能力,也可能演变为一种潜在的水产条件致病菌<sup>[2]</sup>。在耐药性方面有实验显示,某株广泛耐药恶臭假单胞菌的耐药机制十分复杂,包括携带 *blaVIM-2*、*blaIMP-4* 和 *armA* 等多种不同类型的耐药基因,因此,应当合理使用抗菌药物,并采取行之有效的措施预防和控制其传播<sup>[13]</sup>。

从选择性平板上可以发现,恶臭假单胞菌菌落特征在沙门氏菌属显色培养基上与沙门氏菌属极为相似,较难区分,尤其干扰性很强,在日常检测过程中难以在分离培养这一步骤中将可疑菌落排除,增加后续鉴定工作量,并且误判的可能性很大。因此在工作中一定要结合BS平板观察,BS平板对于假单胞菌的筛选效果很好。在配制选择性培养基BS时,不宜过分加热,以免降低其选择性,应在临用前一天配制,保存在暗处,48 h后选择性易降低,如果发现培养基颜色明显变浅则表明已经开始减效,应谨慎使用。

随着我国进口肉类的批次、种类等不断增多,越来越多的进口肉出现在百姓餐桌上,与此同时,食品安全问题则显得尤为重要。在购买进口肉类时,一要选择正规商家,可以保证产品来源和运输、贮藏条件;二要仔细查看进口肉类食品的外包装有没有中文标签和检疫证明。购买回来的肉类及其制品要在短时间内食用,温度对于微生物延滞期的影响,有相关文献表明<sup>[14]</sup>,延滞期随着温度升高而缩短。另外,本文通过对冷冻肉中恶臭假单胞菌的检测,以期监管部门对食品中尤其肉类中恶臭假单胞菌的监督提供参考<sup>[15]</sup>。

## 参考文献

- 印琳, 刘芳, 郭长城, 等. 胃黏膜组织中恶臭假单胞菌临床意义的探讨[J]. 中国人畜共患病学报, 2016, 32(12): 1102-1107.  
Yin L, Liu F, Guo CC, et al. Investigation of clinical significance of *Pseudomonas putida* isolated from gastric biopsies [J]. Chin J Zoonoses, 2016, 32(12): 1102-1107.
- 段亚佼, 黄小丽, 詹晓然, 等. 杂交鲇恶臭假单胞菌的分离鉴定及其病理损伤研究[J]. 水生生物学报, 2017, 41(2): 371-378.  
Duan YJ, Huang XL, Zhan GR, et al. The separation and identification of

*pseudomonas* and its pathological damage study [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2017, 41(2): 371-378.

- Gill CO, Newton KG. The development of aerobic spoilage on meat stored at chill temperatures [J]. J Appl Bacteriol, 1977, 43: 189-195.
- 唐晓阳, 赵勇, 孙晓红, 等. 冷却猪肉中假单胞菌生长预测模型的建立与验证[J]. 湖南农业科学, 2010, (1): 128-131.  
Tang XY, Zhao Y, Sun XH, et al. Establishment and validation of predictive model of *pseudomonas* spp. from chilled pork [J]. Hunan Agric Sci, 2010, (1): 128-131.
- GB 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学沙门氏菌检验[S].  
GB 4789.4-2010 National food safety standard-Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- SN/T2099-2008 进出口食品中绿脓杆菌检测方法[S].  
SN/T2099-2008 Determination of *Pseudomonas aeruginosa* in food for import and export [S].
- Shiose J, Wakabayashi H, Egusa S, et al. A report on a disease of cultured carp due to a capsulated *Pseudomonas* [J]. Fish Pathol (Japan), 1974, 9(1): 79-83
- Alderman DJ, Polglase JL, Holdich DM, et al. Pathogens, parasites and commensals [J]. Freshwater Crayfish Biol Manag Exploit, 1988, 1(1): 167-212.
- Angelini NM, Seigneur GN. Disease of the fins of *Rhamdia sapo*. Isolation of the etiological agents and experimental infection [J]. Rev Argent Microbiol, 1987, 20(1): 37-48.
- Widders PR, Coates KJ, Warner S, et al. Controlling microbial contamination on beef and lamb meat during processing [J]. Aust Vet J, 1995, 72: 208-211.
- Coates KJ, Beattie JC, Morgan IR, et al. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork [J]. Food Microbiol, 1995, 12: 49-54.
- 赵虎, 张鹏, 陈玖华, 等. 大鲇恶臭假单胞菌的分离及鉴定[J]. 河南水产, 2008, 77(4): 40-41.  
Zhao H, Zhang P, Chen JH, et al. Appearance of stench the separation and identification of *Pseudomonas* [J]. Henan Fish, 2008, 77(4): 40-41.
- 李军, 邹明祥, 王海晨, 等. 一株广泛耐药恶臭假单胞菌耐药机制研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(1): 1-5.  
Li J, Zou MX, Wang HC, et al. Mechanism of drug resistance of a strain of extensively drug resistant *Pseudomonas putida* [J]. Chin J Microcol, 2016, 28(1): 1-5.
- Augustin JC, Carlier V. Mathematical modeling the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes* [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 56: 29-51.
- 陈雨欣, 石建华. 水产品中粪肠球菌的分离与鉴定[J]. 农产品加工(学刊), 2014, (15): 46-47.  
Chen YX, Shi JH. Isolation and Identification of *Enterococcus faecalis* from aquatic products [J]. Acad Period Farm Prod Process, 2014, (15): 46-47

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



陈雨欣, 工程师, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: chen-yuxin126@163.com