

巧克力中沙门氏菌能力验证结果与分析

陈秋菊, 向君毅*

(清远市食品检验中心, 清远 511500)

摘要: **目的** 分析实验室对巧克力中沙门氏菌检测能力验证实验与结果。**方法** 依据 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》对巧克力样品进行沙门氏菌检测。参照能力验证计划参试指导书来进行测定和结果判断。**结果** 通过平板法结合生化鉴定实验结果可知, 编号 CODE:384 有可疑目标菌落检出沙门氏菌阳性菌, CODE:544、CODE:699 的可疑目标菌落均未检出沙门氏菌阳性菌。**结论** 本次实验室对巧克力中沙门氏菌检测能力验证结果合格, 为提高相关微生物实验室的检测能力提供参考。

关键词: 能力验证试验; 巧克力; 沙门氏菌; 分离

Results and analysis of *Salmonella* ability verification in chocolate

CHEN Qiu-Ju, XIANG Jun-Yi*

(Qingyuan Food Inspection Center, Qingyuan 511500, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the ability verification experiments and results of *Salmonella* in chocolate of the laboratory. **Methods** According to GB 4789.4-2016 *National food safety standards-Food microbiology inspection-Salmonella*, the *Salmonella* of chocolate samples were detected. Reference ability verification plan guidance book was used for determination and result judgment. **Results** According to the results of plate method combined with biochemical identification experiment, *Salmonella* positive bacteria were detected in suspicious target colonies in CODE:384, and no *Salmonella* positive bacteria were detected in suspicious target colonies in CODE:544 and CODE:699. **Conclusion** The test results of *Salmonella* in chocolate of the laboratory are qualified, and this provides reference for improving the detection ability of microbiology laboratory.

KEY WORDS: competency verification test; chocolate; *Salmonella*; separation

1 引言

沙门氏菌广泛分布于自然界, 极易污染水源、各种食品以及畜禽产品。然而, 鼠伤寒沙门氏菌病在食品安全事故中风险高且最为常见, 也是人畜共患病之一。在我国, 由沙门氏菌属引发的细菌性中毒事件约占食品中毒事件总数的 70%~80%^[1-3]。由于沙门氏菌生长环境温度与人体健康温度相同, 因此在日常生活中, 食品沙门氏菌污染与人

的生活环境以及人体饮食健康息息相关。所以, 沙门氏菌的检测能力在保障人体饮食健康中起到关键的作用。沙门氏菌的检测在食品安全卫生检验过程中也具有代表性作用。参加能力验证项目, 可以评价一个实验室检测技术能力。

沙门氏菌的能力验证是利用实验室间的比对确定实验室和校准/检测能力或检查机构的检测能力^[4], 对于检测机构, 能力验证实验是评价实验室检测能力和检验技术水平的重要标志。参加能力验证可以总结以往实验室的检验

*通讯作者: 向君毅, 硕士, 工程师, 主要研究方法为食品安全。E-mail: 82254088@qq.com

*Corresponding author: XIANG Jun-Yi, Master, Engineer, Qingyuan Food Inspection Center, Qingyuan 511500, China. E-mail: 82254088@qq.com

方法或发现实验过程中的问题, 从而吸取失败的教训, 总结成功的经验, 确保实验结果的准确性和可靠性。塔里木大学分析测试中心在沙门氏菌能力验证中采用国标法 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[5]进行检测并得到满意的结果。江西省食品药品检验检测研究院^[6]在沙门氏菌能力验证中采用荧光定量 PCR 方法对样品的前增菌液和选择性增菌液进行初筛后, 对出现阳性结果的样品再利用国标法以及 VITEK2、Ribo Printer 全自动核糖体 RNA 指纹技术辅助检测得出结果。可见, 国标法以及借助相关检测仪器进行检测沙门氏菌实验均能获得满意结果^[7,8]。

本实验室对此次巧克力中沙门氏菌能力验证实验结果进行分析总结。通过此次能力验证实验的过程和结果, 总结成功的经验, 为给日常的检验工作提供技术支持。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

GI100TW 高压灭菌锅(致微有限公司); IUL/IUL 均质器(西班牙 IUL 公司); T1000Y 电子天平(德国 G&G 公司); LHS-250SC 恒温恒湿培养箱 35 °C、恒温恒湿培养箱 42 °C(上海一恒公司); BSC-1500IIA2-X 生物安全柜(济南鑫贝西公司)。

鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)、弗氏柠檬酸杆菌(ATCC43864)(广东环凯微生物科技有限公司购买并附有质量控制检测报告)。

缓冲蛋白胨水(Buffered Peptone Water, BPW)、四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(Selenite Cystine Broth, SC)、XLD 琼脂平板、亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BS)平板、HE 琼脂平板、沙门氏菌显色琼脂平板、营养琼脂(nutrient agar, NA)斜面(广东环凯微生物科技有限公司); 三糖铁(triple sugar iron, TSI)、蛋白胨水、尿素(分析纯)、氰化钾生长试验管、氰化钾对照管、赖氨酸脱羧酶对照、赖氨酸脱羧酶、甘露醇(分析纯)、山梨醇(分析纯)、 β -半乳糖苷(ONPG)(广东环凯微生物科技有限公司)

本次能力验证本中心微生物能力验证实验室代码为: NIFDC-PT-135, 中国食品药品检定研究院提供序号为 TF0135-0167 共 3 个巧克力样品(CODE:0384、CODE:0544、CODE:0699)。

2.2 实验方法

2.2.1 实验样品接收与样品处理

(1) 样品接收

本实验共接收 3 份巧克力样品。实验样品分别标示不同的样品编号, 每份样品为 1 块瓶装的巧克力, 装量约 10 g, 采用玻璃瓶包装, 样品性状为棕黑色方形巧克力块。

实验样品接收后未能及时进行检验时, 在确认实验样品后及时放入 4 °C 冰箱保存, 并且认真阅读作业指导书, 做好实验前的准备, 保证检验实验样品结果的可靠性^[9]。

(2) 实验样品前处理

准备 90 mL 预热至 45 °C 的灭菌 BPW, 在生物安全柜无菌开启玻璃瓶: 首先取 20 mL 灭菌 BPW 加入检样瓶内, 待巧克力样品融化后加入无菌均质带内。取 20 mL 灭菌 BPW 清洗检样瓶, 将洗液加入均质袋内, 再取 20 mL 加入灭菌均质袋内。取 20 mL 灭菌 BPW 清洗检样瓶, 将洗液加入均质袋内, 再取 20 mL 灭菌 BPW 重复清洗一次, 到最后在均质袋内加入 30 mL 灭菌的 BPW, 混合均匀且制备成 1:10(V:V) 稀释液。按照同样的方法, 对 3 件能力验证的实验样品进行同样前处理。

(3) 传统方法测定沙门氏菌

将上述 90 mL 的 BPW 直接作为前增菌液, 36 °C 环境下静置培养 8~18 h。依据 GB 4789.4-2016 的方法对 CODE:0384、CODE:0544、CODE:0699 实验样品进行沙门氏菌检验。

2.2.2 实验步骤

(1) 前增菌

吸取待检验的测试样品混合原液 25 mL 置于 225 mL 缓冲蛋白胨水(BPW)中, 震荡均匀后置于 36 °C 培养条件下培养 1~18 h^[10]。前增菌液对沙门氏菌不具备选择性, 前增菌培养步骤的主要作用是修复受损伤的沙门氏菌属或让濒临死亡沙门氏菌属恢复活性, 在前增菌的培养时间过长可能会导致杂菌生长过多从而影响分离鉴定结果^[7]。在检验过程中可以根据实际样品培养情况, 估计污染程度, 相应控制前增菌的培养时间。

(2) 增菌

取出培养过后的实验样品培养物并且轻轻摇动混匀后, 用无菌移液管吸取 1 mL 加入制备好的 10 mL TTB 培养基肉汤试管内, 放置于 42 °C 培养箱培养 18~24 h。同时, 用移液管另取 1 mL 加入制备好的 10 mL SC 培养基肉汤试管内, 放置于 36 °C 培养箱培养 18~24 h。SC 肉汤内的亚硒酸盐成分克制细菌的生长, 胱氨酸成分促进细菌的生长, 但适合伤寒沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌生长。TTB 在 42 °C 培养条件下西硫酸钠和煌绿抑制菌的生长, 但适合其他沙门氏菌的生长。SC 肉汤培养基和 TTB 肉汤培养基同时筛选沙门氏菌, 能有效防止沙门氏菌阳性的漏检。

(3) 分离

在沙门氏菌划线分离时, 用接种环各取 1 环 SC、TTB 肉汤划线接种于亚硫酸铋琼脂(BS)平板、XLD 琼脂(XLD)平板、HE 琼脂培养基(HE)平板以及沙门氏菌显色培养基琼脂平板同时置 36 °C 培养箱培养 18~24 h; 亚硫酸铋

平板(BS)置于 36 °C 培养 40~48 h。培养后每天观察各个平板上生长的菌落形态直到能挑去可疑目标菌进行下一步实验^[4,11]。

(4) 微量生化管实验

挑取可疑目标菌在三糖铁琼脂先在斜面划线,再于底层穿刺^[7];在尿素微量生化管加入 1 mL 无菌水并且挑取可疑菌落接种。将可疑菌落制备成 0.5 McFarland 浊度的菌悬液备用,进行以下实验^[12],如表 1。

表 1 沙门氏菌微量生化实验
Table 1 Microchemical test of *Salmonella*

生化管实验	培养时间/h	方法
三糖铁琼脂	24	取可疑目标菌穿刺,再斜面“Z”字形接种
蛋白胨水	24	加入 3 滴备用菌悬液,培养后加靛基质试剂 3 滴,观察记录结果
尿素	12~24	取可疑目标菌加入生化管中,36 °C 培养,观察结果
氰化钾	24~48	增加对照实验。并加入 3 滴备用菌悬液培养观察结果
赖氨酸脱羧酶	18~24	加入对照实验。在实验管和对照管加入 3 滴备用菌悬液后再加入无菌液体石蜡直至覆盖培养基表面。培养 18~24 h,未见阳性结果,延迟培养时间至 4 d ^[12] 。
甘露醇、山梨醇	18~24	加入 3 滴备用菌悬液培养观察结果
β -半乳糖苷(ONPG)	18~24	加入 3 滴备用菌悬液培养观察结果

3 结果与分析

3.1 菌落特征

沙门氏菌特征菌落以及实验样品 CODE:384、CODE:544、CODE:699 的菌落形态在 BS、XLD、HE、沙门氏菌显色培养基琼脂平板上的情况如表 2。从培养后的实验结果看,在 BS 平板上沙门氏菌的菌落形态最为明显,对沙门氏菌的选择性也最强,延长培养时间可以免沙门氏菌生长亦被抑制;采用 BS 搭配 XLD/HE/沙门氏菌显色培养基,互补防止对实验样品沙门氏菌的漏检。

3.2 生化鉴定

CODE:0384、CODE:0544、CODE:0699 及阳性阴性对照生化鉴定实验情况如表 3。CODE:0384 检出沙门氏菌阳性菌(鼠伤寒沙门氏菌)以及沙门氏菌个体变异菌;CODE:0544、CODE:0699 的可疑目标菌落通过微量生化管鉴定实验鉴定,未检出沙门氏菌阳性菌,此次巧克力中沙门氏菌能力验证考核结果为满意。

表 2 沙门氏菌在不同培养基上的菌落特征
Table 2 Colony characteristics of *Salmonella* in different culture mediums

选择性琼脂平板	CODE:0384	CODE:0544	CODE:0699
BS 琼脂	黑色菌落有金属光泽	灰绿色、棕褐色菌落	灰色到透明菌落
HE 琼脂	蓝绿色菌落	黑色菌落带浑浊带	黑色菌落带浑浊带
XLD 琼脂	黑色菌落、黑色菌落带有透明圈	黑色菌落、黑色菌落周围有浑浊带	黄色菌落、粉红色菌落、黑色菌落带有透明圈
显色培养基	紫红色菌落	无色菌落、绿-蓝绿色的菌落	绿-蓝绿色的菌落、无色菌落

表 3 沙门氏菌生化鉴定特征
Table 3 Characteristics of biochemical identification of *Salmonella* samples

试剂名称	0384	0384	0544	0699	阳性对照	阴性对照
三糖铁琼脂	产 H ₂ S	产 H ₂ S	产 H ₂ S	产 H ₂ S	产 H ₂ S	产 H ₂ S
蛋白胨水	-	-	-	-	-	-
尿素	+	-	+	+	-	-
氰化钾	-	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+(-)	-	-	-	+	+
甘露醇	+(-)	+	-	-	+	+
山梨醇	+	+	-	-	+	+
β -半乳糖苷(ONPG)	-	-	-	-	-	+

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

4 结论与讨论

通过能力验证实验,对检测步骤加以总结,得出以下经验:

样品处理关键:能力样品的制备应该充分考虑均匀性和抽样的稳定性及在传运和处置检测样品时样品的均匀性和稳定性^[13]。此次能力验证样品为巧克力,常温下成固体块状并且粘度高。对样品做前处理时,样品均匀性难保证。关键是制备样品时,采用高压灭菌后冷至 45 °C 左右的增菌液(BPW),并且分部分充分溶解样品。

分离划线平板选择:不同或同一种沙门氏菌在不同琼脂培养基上的生长形态不同,选择多种琼脂培养基做沙门氏菌划线分离,能较好地分离单个菌落,方便快速准确得到可疑目标菌落形态。在实验过程中的平板划线分离,对可疑沙门氏菌筛查凭个人经验是不够,实验过程中需要借助质控菌种做相应的阴性和阳性对照。

分离划线平板制备: 灭菌后的琼脂培养基, 自然冷却至 35 °C 倾注平板。制备平板不易过热, 防止培养皿内外温差而形成水珠或培养基凝固后平板表面水分过多而影响划线。

分离单个菌落: 挑去一环培养物, 轻轻触碰培养器皿的内壁去除多余液体后, 在平板内用四区划线法划线, 每条线不易太接近。

可疑菌落筛选: 挑去可疑目标菌的关键: 对照阳性菌和目标菌落形态的积累经验, 挑去可疑目标菌做生化鉴定。

传统的划线分离检验方法可以得到沙门氏菌的纯培养物, 可重复操作性强, 准确高, 但检验步骤繁多, 检验程序较为复杂, 而且整个实验耗时比较长, 一般 5~8 d。从整个能力验证实验过程与实验结果中可以发现^[12], 沙门氏菌在沙门氏菌显色培养基较为简单快速的筛选出可疑目标菌落。多种培养基同时划线分离检测可以提高可疑目标菌的准确筛选, 确保实验样品检验结果准确可靠。本次能力验证 3 个样品均出现背景菌, 关键在于划线分离分出单个菌落, 认识并准确地筛选可疑目标菌落。

参考文献

- [1] 章海通, 邢家溧, 傅晓, 等. 食品能力验证中沙门氏菌的分离鉴定和分型[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(20): 166-171.
Zhang HT, Xing JL, Fu X, et al. Separation and identification of *Salmonella* in food ability verification [J]. Food Res Dev, 2018, 39(20): 166-171.
- [2] 李毅. 全球化背景下的食品安全: 制度构建与国际合作[D]. 上海: 复旦大学, 2009.
Li Y. Food safety in the context of globalization: Institutional construction and international cooperation [D]. Shanghai: Fudan University, 2009.
- [3] 杨晋, 曾庆梅, 张笛, 等. 添加扩增内标的沙门氏菌 PCR 检测方法[J]. 生物技术通报, 2014, (7): 54-59.
Yang J, Zeng QM, Zhang D, et al. The PCR method for the detection of *Salmonella* was added [J]. Biotechnol Bull, 2014, (7): 54-59.
- [4] 王丽君, 韩爱芝, 杨玲, 等. 2017 年沙门氏菌能力验证的结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1529-1533.
Wang LJ, Han AZ, Yang L, et al. Results and analysis of *Salmonella* ability verification in 2017 [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(7): 1529-1533.
- [5] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiology examination-*Salmonella* [S].
- [6] 翟平平, 吴鑫, 刘德, 等. 奶粉样品中沙门氏菌检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1518-1523.
Zhai PP, Wu X, Liu D, et al. Test results and analysis of *Salmonella* in milk powder samples [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(7): 1518-1523.
- [7] 张红莉, 欧露真. 能力验证试验中沙门氏菌的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4996-4999.
Zhang HL, Ou LZ. Isolation and identification of *Salmonella* in ability verification test [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(12): 4996-4999.
- [8] 唐爱明, 王辉, 夏延斌, 等. 食品微生物 CNAS 检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(3): 222-225.
Tang AM, Wang H, Xia YB, et al. Verification results and analysis of food microorganism CNAS detection capabilities [J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(3): 222-225.
- [9] 巧克力沙门氏菌能力验证作业指导书[Z].
Chocolate *Salmonella* competence verification practice guide [Z].
- [10] 食品安全国家标准 食品微生物学检验标准汇编 GB 4789 系列 2010 版[S].
Food safety national standard-Food microbiology test standard compilation GB 4789 series 2010 edition [S].
- [11] 新型微量沙门氏菌鉴定生化管说明书[S].
Specification for identification of new trace amounts of *Salmonella* [S].
- [12] 曹文博, 倪长鹏, 董伟峰, 等. 沙门氏菌能力验证样品制备[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 134-139.
Cao WB, Ni CP, Dong WF, et al. Preparation of *Salmonella* samples for proficiency testing [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(1): 134-139.
- [13] 骆海朋, 陈怡文, 权亚茹, 等. 沙门氏菌质控样的研制及其在能力验证中的应用[J]. 中国药事, 2014, (9): 995-1000.
Luo HP, Chen YW, Quan YR, et al. The studies of the quality control samples of *Salmonella* and the application in the proficiency test [J]. China Pharm Aff, 2014, (9): 995-1000.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



陈秋菊, 硕士, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: 2267591368@qq.com



向君毅, 硕士, 质量工程师, 主要研究方法为食品安全。

E-mail: 82254088@qq.com