

肉制品检验中未被 0.001% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色菌落的研究

白雯静*, 王月玲, 徐雪梅, 周斌, 王艳炜, 周君

(兰州市食品药品检验所, 兰州 730050)

摘要: **目的** 鉴定 1 批肉制品样品中不能被 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色菌落的菌落。**方法** 依照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物检验 菌落总数测定》和 GB 29921-2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》对样品前处理后进行分离纯化, 采用 VITEK 2 以及基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪进行检测鉴定。**结果** 经 VITEK 2 和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪鉴定, 肉制品样品中不能够被 0.001%TTC 染色的菌落分别为鲁氏不动杆菌和奇异变形杆菌。**结论** 在出现 TTC 无法染色的情况下, 应该采用适当的菌种鉴定方法对样品的颗粒和菌落进行详细区分, 进而防止漏检和误检。

关键词: 肉制品; 菌落总数; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色; 鲁氏不动杆菌; 奇异变形杆菌

Study on colonies not stained with 0.001% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in meat products

BAI Wen-Jing*, WANG Yue-Ling, XU Xue-Mei, ZHOU Bin, WANG Yang-Wei, ZHOU Jun

(Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: Objective To identify the bacteria that could not be detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) in the 1 batch of meat samples. **Methods** According to GB 4789.2-2016 National Food Safety Standard-Food Microbial Testing Total Colony-Detection of Aerobic Bacterial Count and GB 29921-2013 National Food Safety Standard-Limit Pathogenic Bacteria in Food, the samples were separated and purified after pre-treatment, and then detected and identified by VITEK 2 and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer. **Results** Identified by VITEK 2 and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, the colonies that could not be stained by 0.001% TTC in meat samples were *Acinetobacter rutarum* and *Proteus mirabilis*. **Conclusion** In the case of the particles and colonies of the sample can not be stained by TTC, the appropriate method of strain identification should be used to distinguish in detail, so as to prevent missed detection and false detection.

KEY WORDS: meat products; aerobic bacterial count; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining; *Acinetobacter Iwoffii*; *Proteus mirabilis*

*通讯作者: 白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品致病菌研究。E-mail: yd08joy@163.com

*Corresponding author: BAI Wen-Jing, Master, Chief Pharmacist, Lanzhou Institute for Food and Drug Control, No. 988 Pengjiaping, Qilihe District, Lanzhou 730050, China. E-mail: yd08joy@163.com

1 引言

食品安全关系民生,而食品微生物污染也越来越被重视。现有的研究大多数主要集中在致病菌的研究方面,诸如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)等等,在菌落总数计数方面的研究较少。而一旦食物中的菌落总数超过限量,很有可能会导致人出现腹泻、呕吐以至更加严重的症状,威胁食用者的健康。

菌落总数计数时常会使用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl-2h-tetrazolium chloride, TTC)进行染色, TTC 是脂溶性光敏感复合物,溶于水中形成无色溶液,但还原后即生成红色而不溶于水的三苯甲脒(trityl guanidine, TPF), TPF 比较稳定,不会被空气中的氧自动氧化。嗜中温性需氧菌在其新陈代谢过程中产生的琥珀酸脱氢酶可以使无色的 TTC 还原为红色的 TPF,因此可以将 TTC 作为细菌生长的指示剂^[1]。在 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[2]并未提到加 TTC 或者据此提供其所添加的浓度,但是在 2015 年版《中华人民共和国国家标准 化妆品安全技术规范》^[3]第 5 章菌落总数检验方法中提到为区别化妆品中的颗粒与菌落,可在每 100 mL 卵磷脂吐温 80 营养琼脂中加入 1 mL 0.5%的 TTC 溶液,如有细菌存在,培养后菌落呈红色,而化妆品颗粒颜色无变化。此外还要其他相关的研究,例如马国善^[4]对 110 份样品分别采用平板菌落计数法、菌落总数测定法和 TTC 培养基法 3 种方法进行检验,不合格率结果比对在统计学上没有差异;刘胜桃等^[5]分别采用国标法和 TTC 法对 25 组人工污染的乳以及乳制品进行菌落总数测定,其结果数据无显著差异,添加的菌种中金黄色葡萄球菌对 TTC 最为敏感,平板计数琼脂中 TTC 的终浓度在 0.0002%~0.0020%范围内微生物生长良好,超过 0.004%会对金黄色葡萄球菌的生长产生抑制。TTC 平板计数琼脂终浓度在 0.001%~0.002%时能够使菌落显色,且与不添加 TTC 的对照组对比结果一致。刘晓颖等^[6]通过实验证明在食品菌落总数计数时, TTC 的浓度范围应选在 0.0008%~0.0040%这一范围之内。

因此,综合 2015 年版《中华人民共和国国家标准 化妆品安全技术规范》^[3]当中关于添加 TTC 的目的和剂量的规定以及近年来食品微生物菌落总数测定对于 TTC 是否添加以及添加浓度范围的文献研究表明^[4-6];当 TTC 的终浓度选择在 0.001%时,由于菌落颜色在培养后颜色发生变化,既便于区分样品颗粒和菌落以及培养基,又不会对细菌的生长产生过大的抑制作用。其计数结果具有较大的可信性。

但化妆品和食品分属不同产品种类,其中污染或者由此增殖的细菌种类有很大的不同,因此食品中可能会存在某些无法被一定浓度的 TTC 染色的菌种。此外近年来

关于食品微生物检验当中是否使用 TTC 的研究主要针对的是个别菌种例如金黄色葡萄球菌等,具有代表性但是却不能排除其他菌种无法染色或者该浓度范围无法染色的问题^[4-6]。

2019 年上半年,兰州市食品药品检验所微生物检验相关实验室共承接酱卤肉制品 300 余批次,在菌落总数计数这一项目中仅发现一例某企业生产的凤爪中出现 0.001%的 TTC 无法染色的情况^[7]。针对不能被 0.001%的 TTC 染色的肉制品样品中的菌落,本研究采用传统方法结合仪器分析方法对菌种进行分离鉴定,探究不能染色的原因,避免同类实验出现误检漏检的情况,为相关研究提供参考。

2 材料与方法

2.1 样品

样品为监督抽检提供,为某企业生产的凤爪,产品为预包装食品。

2.2 试剂与仪器

平板计数琼脂(plate count agar, PCA, 北京陆桥技术股份有限公司);营养琼脂(nutrient agar, NA, 北京陆桥技术股份有限公司);红四氮唑(tetrazolium red, 阿拉丁试剂(上海)有限公司);VITEK2 革兰氏阴性、阳性细菌鉴定卡(法国生物梅里埃公司)。

VITEK2 Compact 全自动微生物生化鉴定仪(法国生物梅里埃公司);AC2-6S1 二级生物安全柜(艺斯高(上海)商贸有限公司);MALDI-Biotyper 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(美国布鲁克公司)。

2.3 检测方法

参照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[2]和 GB 29921-2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》^[8]的方法选取 5 份样品,分别称取 25.0 g 样品置于盛有 225 mL 已灭菌生理盐水的无菌均质袋内,用均质器拍打均匀,制成 1:10(m/V)的样品匀液,并依次进行梯度稀释。在进行 10 倍递增稀释时,吸取 1.0 mL 样品匀液于无菌平皿内,每个稀释度做 2 个平皿。同时,分别吸取 1.0 mL 空白稀释液加入 2 个无菌平皿内作为空白对照。及时将 15~20 mL 冷却至 46 °C 的平板计数琼脂培养基(每 100 mL 平板计数琼脂培养基加 1.0 mL 0.1%的 TTC 溶液, TTC 的终浓度为 0.001%)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后,进行翻转,36 °C 培养 48 h。

培养 48 h 的平板按照菌落大小、形态等分别在营养琼脂上纯化培养(36 °C 培养 24 h),纯化的菌落分别进行染色镜检、VITEK 2^[2]以及基质辅助激光解析飞行时间质谱仪(基质辅助激光解析飞行时间质谱仪的操作参照仪器说

说明书进行分离)进行上机鉴定。

3 结果与分析

5 份样品有 3 份样品有菌落生长(稀释度分别为 1:100; 1:1000; 1:10000, V:V), 2 份样品无菌落生长(稀释度分别为 1:100; 1:1000; 1:10000, V:V), 有菌落生长的 3 个稀释度共 6 个平板生长的菌落均未被染色, 菌落形态均与平板计数琼脂颜色相近, 难以通过肉眼判断为样品颗粒还是菌落, 于此同时, 实验所涉及的 2 个空白对照平板均无菌落生长。

3.1 纯化

在纯化时, 由于稀释度为 1:100 和 1:1000(V:V)生长菌落较多, 难以分离。因此均选择 1:10000(V:V)的稀释度进行纯化, 纯化时将平板上未着色的所有菌落分别进行分离纯化, 平板计数琼脂培养基上的菌落类似物按照其形态大概区分为 2 类; (1) 为米白色较大的圆形菌落, 编号为 A; (2) 为米白色较小的圆形菌落, 编号为 B。分别使用营养琼脂进行纯化培养, 培养温度为 36 °C, 培养时间为 24 h。纯化培养后的营养琼脂平板上均有菌落生长, 其形态与平板计数琼脂培养基上的相似。

3.2 染色镜检结果

通过对纯化培养后的所有细菌进行革兰氏染色, 并按照前期观察到的菌落形态进行大致划分, 结果显示 A、B 两类均为革兰氏阴性杆菌。

3.3 VITEK 2 鉴定结果

VITEK 2 为光电技术, 是电脑技术和细菌八进制数码鉴定技术相结合的鉴定方法。它所使用的鉴定卡中含有 64 项生化反应。通过对纯化培养后的细菌按照操作规程进行 VITEK 2 上机实验, 综合前期菌落形态结果如表 1 所示。

表 1 VITEK 2 结果
Table 1 Results by VITEK2

组别	VITEK 2 鉴定结果
A	鲁氏不动杆菌; 99% 概率
B	奇异变形杆菌; 98% 概率

3.4 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪上机结果

基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱技术。通过对纯化培养后的细菌按照操作规程进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪上机实验, 结果如表 2 所示。

MALDI-Biotyper 的结果是通过菌种与数据库中标准菌株质谱图的打分来表示, 分值愈高, 说明待测菌种与标

准菌株的谱图越相似(包括峰高和质量), 当分值在 2.000~2.299 之间, 可基本确认菌种的鉴定结果。

表 2 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪测定结果
Table 2 Results of matrix assisted laser analytical ionization time-of-flight mass spectrometry

组别	分值	鉴定的菌种
A	2.258	鲁氏不动杆菌 <i>Acinetobacter Iwoffii</i> DSM 2403T DSM
B	2.270	奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i> 13210-1 CHB

4 结论与讨论

VITEK 2 与基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪检测结果一致, 即 A 为鲁氏不动杆菌, B 为奇异变形杆菌。通过查阅《伯杰氏系统细菌学手册》(第九版)^[9]; 鲁氏不动杆菌为奈瑟氏球菌科(*Neisseriaceae*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*), 为专属好氧菌。奇异变形杆菌为肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、变形菌属(*Proteus*)。

奇异变形杆菌比较容易污染肉制品, 并由此可能引发食物中毒, 而且还较易感染伤口^[10-13]。虽然不动杆菌属在肉制品中的存在和流行的相关研究比较稀少, 但是他们确实存在于肉类食品当中, 并且对人类的健康产生很大的威胁^[14]。根据 TTC 的染色原理, 嗜中温性需氧菌在其新陈代谢过程中产生的琥珀酸脱氢酶可以使无色的 TTC 还原为红色的 TPF。而奇异变形杆菌为兼性厌氧杆菌, 厌氧菌和需氧菌在 TTC 有关的代谢途径上可能有所不同, 进而导致 TTC 无法染色。鲁氏不动杆菌为专属好氧菌, 且为嗜冷菌的一种^[15,16], 可能由于该种菌代谢途径的不同, 导致终浓度为 0.001% 的 TTC 未能染色。也可能是因为 TTC 的浓度不够高而导致无法染色, 实验室已经将 2 种菌种进行冻存, 有待于下一步进行进一步的研究和探讨。

在参照国标方法进行菌落总数计数实验时, 通过添加一定的适宜浓度的 TTC 可以在对菌不产生或者较弱抑制作用的前提下, 便于观察和计数。但是, 需要引起注意的是, 由于代谢途径的不同, 或者其它各种原因, 可能会导致菌落无法被适宜浓度的 TTC 染色, 进而可能被误认为是样品残渣, 最后导致漏检和误检。为了避免该种问题的出现, 实验室在菌落计数时必须十分慎重, 遇到无法区分是否为菌落的情况时, 应该运用菌种鉴定技术(包括革兰氏染色、传统生化反应、VITEK2、MALDI-TOF-MS 以及 PCR 等多种方法)进行菌种鉴定, 进而得出最终科学有效的计数结果。

参考文献

[1] 刘睿哲. 食品菌落总数测定中 TTC 做显色剂的探索[J]. 产业与科技论

- 坛, 2011, 10(20): 64-65.
- Liu RZ. Exploration of TTC as color reagent in determination of food colony total amount [J]. *Estat Sci Trib*, 2011, 10(20): 64-65.
- [2] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
- GB 4789.2-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Aerobic plate count [S].
- [3] 化妆品安全技术规范(2015版)[Z].
- Safety and technical standards for cosmetics (2015 Edition) [Z].
- [4] 马国善. 食品微生物检验菌落总数测定方法的效果观察[J]. *中国医药指南*, 2018, 16(20): 47-48.
- Ma GS. Observation on the effect of determination method of total number of food microorganism [J]. *Guid Chin Med*, 2018, 16(20): 47-48.
- [5] 刘胜桃, 秦思文, 鲍晓凤, 等. TTC在乳及乳制品菌落总数检测中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(24): 135-139.
- Liu ST, Qin SW, Bao XF, *et al.* The application of TTC in the detection of colonies number of milk and dairy products [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(24): 135-139.
- [6] 刘晓颖, 冯二凯, 吴洪超, 等. 细菌菌落计数培养基 TTC浓度的筛选研究[J]. *特产研究*, 2015, (2): 1-4.
- Liu XY, Feng EK, Wu HC, *et al.* Study on the screening of TTC concentration for bacterial colony counting culture medium [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*, 2015, (2): 1-4.
- [7] 兰州市食品药品检验所 LIMS 实验系统[Z].
- LIMS experimental system of Lanzhou food and drug inspection institute [Z].
- [8] GB 29921-2013 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S].
- GB 29921-2013 National food safety standard-Limit of pathogenic bacteria in food [S].
- [9] 伯杰氏系统细菌学手册(第九版)[Z].
- Bergey's manual of systematic bacteriology (9th edition) [Z].
- [10] Mohammad A, Nossair, Kamal K, *et al.* Detection of some enteric pathogens in retailed meat [J]. *Alexand J Vet Sci*, 2014, (44): 67-73.
- [11] Kim SH, Wei CI, An HJ. Molecular characterization of multidrug-resistant proteusmirabilis isolates from retail meat products [J]. *J Food Prot*, 2005, 7(68): 1408-1413.
- [12] Wong MHY, Wan HY, Chen S. Characterization of multidrug-resistant Proteus mirabilis isolated from chicken carcasses [J]. *Foodborne Pathogens Dis*, 2012, (10): 177-181.
- [13] Jiang XB, Yu T, Liu L, *et al.* Examination of quaternary ammonium compound resistance in proteus mirabilis isolated from cooked meat products in China [J]. *Front Microbiol*, 2017, 12(8): 1-8.
- [14] Carvalheira A, Casquete R, Silva J, *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter spp. isolated from meat [J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, (243): 58-63.
- [15] Machado SG, Bazzolli DMS, Vanetti MCD. Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk [J]. *Int Dairy J*, 2013, 29(1): 8-14.
- [16] 吕元. 原料奶中嗜冷菌的快速检测[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- Lv Y. A rapid method of detecting psychrophilic microorganisms in raw milk [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

白雯静, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品致病菌研究。
E-mail: yd08joy@163.com