

# 低温保存肉制品中液化沙雷氏菌的 分离鉴定与耐药性分析

骆业巧\*, 司波

(宿迁市产品质量监督检验所, 宿迁 223800)

**摘要:** **目的** 分离、鉴定引起低温保存肉制品腐败的液化沙雷氏菌, 并对其耐药性进行分析。**方法** 参考国标 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》进行检测, 采用梅里埃全自动微生物生化鉴定仪 VITEK II 进行生化鉴定分析; 纸片法药敏试验进行耐药性分析。**结果** 生化实验结果显示分离菌株使得三糖铁琼脂底层产酸、斜面产酸, 不产硫化氢, 产气迟缓, 在半固体琼脂中沿穿刺线扩散生长。梅里埃全自动微生物生化鉴定仪 VITEK II 鉴定结果为液化沙雷氏菌。药敏试验结果表明该菌对链霉素、利高霉素、红霉素、盐酸林可霉素、恩诺沙星等常见的抗生素具有一定的耐药性。**结论** 本实验成功的分离并鉴定了低温保存肉制品中液化沙雷氏菌, 为液化沙雷氏菌检测标准的制定提供参考依据。

**关键词:** 液化沙雷氏菌; 分离鉴定; 食品安全风险

## Isolation, identification and drug resistance analysis of *Serratia liquefaciens* in low-temperature preserved meat products

LUO Ye-Qiao\*, SI Bo

(Suqian Product Quality Supervision and Testing Institution, Suqian 223800, China)

**ABSTRACT: Objective** To isolate and identify the *Serratia liquefaciens* causing spoilage in meat products preserved at low temperature, and to analyze its drug resistance. **Methods** Referring GB 4789.4-2016 *National food safety standards-Food microbiology test for Salmonella* for test, Biochemical identification analysis was using Mériex automatic microbial biochemical analyzer VITEKII. Drug resistance analysis was carried out in the paper strip method. **Results** The results of biochemical experiments showed that the isolated strain made the bottom of the trisaccharide iron agar produce acid, the acid produced on the slope, the hydrogen sulfide was not produced, the gas production was slow, and the growth was spread along the puncture line in the semi-solid agar. The identification result of Mériex automatic microbial biochemical identification instrument VITEKII was *Serratia liquefaciens*. The results of drug sensitivity test showed that the bacteria had certain resistance to streptomycin, riomycin, erythromycin, lincomycin hydrochloride, enoxacin and other common antibiotics. **Conclusion** This experiment successfully isolates and identifies the *Serratia liquefaciens* in cryopreserved meat products, and provided references for the development of detection criteria for *Serratia liquefaciens*.

**KEY WORDS:** *Serratia liquefaciens*; separation and identification; food safety risk

\*通讯作者: 骆业巧, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物分析与检测。E-mail: 651996148@qq.com

\*Corresponding author: LUO Ye-Qiao, Master, Engineer, Suqian Product Quality Supervision and Testing Institution, National Liquor Quality Inspection Center on the west side of Development Avenue, Suqian 223800, China. E-mail: 651996148@qq.com

## 1 引言

液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)属于肠杆菌科、沙雷氏菌属,革兰氏阴性菌,好氧,能分解蛋白质,有时能产红色色素。液化沙雷氏菌属于条件致病菌,是与食物中毒相关的最常见菌株,能够引起冷冻蔬菜及肉类制品的腐败<sup>[1]</sup>。以往认为沙雷氏菌对人体危害较小,大多不被人重视。然而近年来,沙雷菌属细菌引起的感染在医院不断增加,它能引起败血症、肺炎、呼吸道感染等一系列病变并且对大多数抗菌药物耐药<sup>[2,3]</sup>。

在0~4℃低温条件下贮藏、销售的低温肉制品能最大程度地保留肉制品的风味又能减少氨基酸、维生素等营养成分损失。因此低温肉制品加工是一种较为科学的加工方式。由于低温肉制品的水分含量较高,肉品中芽孢和部分微生物等未被全部杀死,若原材料、生产过程、运输和贮藏条件把控不严,极易导致低温肉制品的腐败变质<sup>[4]</sup>。

本实验室执行低温保存肉制品检测任务过程中,在进行沙门氏菌分离检测时筛选到1株液化沙雷氏菌。同批次抽检的样品在4℃保存条件下出现轻微的涨袋现象、有酸败异味。陈玉真等<sup>[5]</sup>曾报道液化沙雷氏菌引起低温保存的方火腿变质与本实验室检测的样品情况相似,但其对检测过程并未详细列出。液化沙雷氏菌作为一种条件致病菌,它广泛的分布于土壤、水和植物中,在动物以及人类的肠道和呼吸道中也被检出过<sup>[6,7]</sup>。但目前食品中液化沙雷氏菌的检测较少,并无相应的国标检测方法。本实验通过一系列分离鉴定方法对分离到的液化沙雷氏菌进行验证,旨在为液化沙雷氏菌检测标准的制定提供参考。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

1300series A 2 生物安全柜(美国 Thermo 公司); DRP 9272 型生化培养箱(上海森信公司); Yamato SQ 810c 高压灭菌锅(日本 Yamato 公司); VITEKII 全自动微生物生化鉴定仪(法国梅里埃公司); BX 53 奥林巴斯显微镜(日本奥林巴斯公司)。

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)、亚硫酸铋琼脂(bismuth sulfite agar, BS)、HE 琼脂(Hektoen enteric agar, HE)、麦康凯琼脂(Macconkey agar, MAC)、革兰氏染色液、营养琼脂、三糖铁琼脂(triple sugar iron agar, TSI)、赖氨酸脱羧酶试验培养基、尿素试验培养基、半固体琼脂、糖发酵管、水解酪蛋白胨琼脂(Mueller-Hinton agar, MH)、脑心浸液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)培养基(广东环凯微生物科技有限公司); 药敏纸片(中国药品生物制品检定所国家抗菌药物细菌耐药性检测中心)。

质控菌株: 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* ATCC

25922)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC 14028)均购自广东省食品微生物安全工程技术研发中心,菌种保藏中心。

### 2.2 样品来源及检测方法

所检测的样品来源于本地市场上抽检的预包装低温冷藏肉制品,样品检测时均在保质期内。

本实验参照 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》方法<sup>[8]</sup>流程进行检测。

#### 2.2.1 样品处理与增菌实验

以无菌操作称取 25 g 样品至盛有 225 mL BPW 的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打均质后,制成样品匀液,于 36℃ 恒温培养 18 h。

#### 2.2.2 菌株的分离培养及形态观察

分别取上述增菌培养物划线接种到 BS、HE、MAC 平板,于 36℃ 恒温培养 48 h,观察菌落形态。挑取单个特征性菌落接种半固体琼脂观察动力,并按革兰氏染色法染色,镜检观察细菌形态。

#### 2.2.3 分离菌株的生理生化反应

将分离并纯化的单个菌落接种于营养琼脂平板上于 36℃ 培养 24 h; 在无菌条件下将经过营养琼脂纯培养的典型菌落,接种三糖铁琼脂先在斜面划,再于底层穿刺;接种针不要灭菌,直接接种赖氨酸脱羧酶试验培养基、尿素试验管 36℃ 培养 24 h。根据初步生化鉴定结果,从营养琼脂平板上挑取典型菌落,用生理盐水制备成浊度适当的菌悬液,使用全自动微生物生化鉴定仪 VITEKII 进行鉴定。

### 2.3 分离菌株的药敏试验

本实验采用的是纸片扩散法(K-B 法)进行药敏试验<sup>[9]</sup>。该方法将含有抗菌药物的纸片贴在已接种待检菌的琼脂平板上,纸片中所含的药物吸取琼脂中的水分溶解后会不断地向纸片周围区域扩散,形成递减的梯度浓度,在纸片周围抑菌浓度范围内待检菌的生长被抑制,从而产生透明的抑菌圈。抑菌圈的大小反映检测菌对测定药物的敏感程度,并与该药对待检菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)呈负相关,即抑菌圈愈大, MIC 愈小。具体操作如下:在生物安全柜内从营养琼脂平板挑取纯培养液化沙雷氏菌菌落直接使其悬浮于无菌盐水,制成 0.5 麦氏单位菌悬液,使其含菌量在 10<sup>8</sup> CFU/mL 左右。接着用无菌棉拭子浸入调好的菌悬液中,将多余菌悬液在管壁挤出,在 MH 琼脂平皿上划线,划满整个琼脂表面,旋转平皿 60° 重复划线共 3 次,最后 1 次用拭子涂抹琼脂边缘。置室温下 10 min 后用无菌镊子取药敏纸片,贴于平板表面,并用镊尖轻压一下纸片,使其贴平。每张纸片的间距不小于 24 mm,纸片的中心距平板的边缘不小于 15 mm,90 mm 直径的平板适贴 5 张药敏纸片。最后将贴好纸片的平板置 36℃ 条件下培养 24 h 后,用游标卡尺量取

抑菌圈直径。同时设大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌质控菌株作为对照。

### 3 结果与分析

#### 3.1 菌落形态及特征

培养结果显示在选择性平板 BS 琼脂平板、HE 琼脂平板、MAC 琼脂平板及非选择性平板营养琼脂平板上均能够生长。分离菌株与沙门氏菌在 BS 平板上的菌落特征以及志贺氏菌在 MAC 琼脂上的菌落特征较难以辨认(见表 1), 经革兰氏染色镜检后显示该菌为革兰氏阴性菌, 杆状、边缘光滑、整齐, 形态差异较小(如图 1)。

#### 3.2 分离菌株的生化鉴定结果

生化实验结果显示分离菌株使得三糖铁琼脂底层产酸、斜面产酸, 不产硫化氢, 产气迟缓。在半固体琼脂中沿穿刺线扩散生长。记录梅里埃全自动微生物生化鉴定仪 VITEKII 鉴定结果为: 液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、可信度为非常可信。参考《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[10]</sup>进行比对, 其生理生化特性与液化沙雷氏菌一致(见表 2), 确定该菌为液化沙雷氏菌。

#### 3.3 药敏试验结果

用游标卡尺从平板背面测量抑菌圈直径。抑菌圈的边缘以肉眼见不到细菌生长为限。并将鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希氏菌 2 株菌株设为本次药敏试验的质控菌株。根据中国药品生物制品检定所国家抗菌药物细菌耐药性检测中

心所制定的各抗菌药物纸片说明判定: 分离到的液化沙雷氏菌对丙氟哌酸、阿米卡星、卡那霉素、硫酸丁卡霉素、诺氟沙星、硫酸庆大霉素、氟苯尼考等抗生素高敏。对链霉素、利高霉素、红霉素、盐酸林可霉素、恩诺沙星等常见的抗生素具有一定的耐药性(见表 3)。

表 1 不同琼脂平板上的菌落特征  
Table 1 Colony characteristics on different agar plates

琼脂平板	菌落特征
BS 琼脂	灰褐色, 光滑圆形, 菌落大小 1~2 mm, 菌落周围培养基颜色未出现明显加深
HE 琼脂	黄色, 光滑圆形, 菌落大小 1~2 mm
MAC 琼脂	无色、半透明、圆形、光滑、湿润, 菌落大小 2~3 mm
营养琼脂	淡黄色、圆形、边缘不整齐, 菌落大小 2~3 mm



图 1 分离菌株革兰氏染色结果(1000×)  
Fig.1 Gram staining results of isolated strains (1000×)

表 2 分离菌株生理生化鉴定结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》比较

Table 2 Comparison of physiological and biochemical results of isolated strains with *Bergey's manual of systematic bacteriology*

名称	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	$\beta$ -半乳糖苷酶	蔗糖	葡萄糖	硫化氢	阿拉伯醇	山梨醇	甘露醇	侧金盏花醇	柠檬酸盐	丙二酸盐	尿素
标准反应	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—
分离菌株	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+	—	—

注: “+”: 阳性反应; “—”: 阴性反应。

表 3 药敏试验结果  
Table 3 Susceptibility test result

药物	液化沙雷氏菌 ( <i>Serratia liquefaciens</i> ) 抑菌圈直径/mm	大肠埃希氏菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 抑菌圈直径/mm	鼠伤寒沙门氏菌 ( <i>Salmonella typhimurium</i> ) 抑菌圈直径/mm
丙氟哌酸	23.58	34.20	33.18
阿米卡星	22.26	21.55	22.02
卡那霉素	21.40	25.26	19.27
链霉素	17.50	22.40	18.33
硫酸丁卡霉素	21.23	27.50	21.44
利高霉素	18.86	18.99	18.79
硫酸庆大霉素	29.23	30.26	31.60

续表 3

药物	液化沙雷氏菌 ( <i>Serratia liquefaciens</i> ) 抑菌圈直径/mm	大肠埃希氏菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 抑菌圈直径/mm	鼠伤寒沙门氏菌 ( <i>Salmonella typhimurium</i> ) 抑菌圈直径/mm
红霉素	11.26	16.38	11.30
盐酸林可霉素	13.55	15.26	12.69
氟苯尼考	21.56	29.30	26.77
诺氟沙星	25.60	31.00	27.59
恩诺沙星	19.20	20.30	19.51

## 4 结 论

低温保存肉制品能够延长产品的货架期, 最大程度保留营养和风味, 而受到消费者青睐, 但存在微生物容易污染的情况, 给产品造成危害<sup>[11]</sup>。竺尚武<sup>[12]</sup>报道在 4 °C 低温时液化沙雷氏菌都能生长, 而普通的腐败微生物只有少数菌株能够生长。陈历水等<sup>[13]</sup>报到了从低温保存肉制品中分离到 1 株沙雷氏菌, 并引起肉制品的腐败变质。由于杀菌不彻底肉制品中残存的腐败微生物能够利用其中的丰富的营养成分急剧增殖, 液化沙雷氏菌作为一种低温条件下能够引起肉制品腐败的微生物应引起食品生产企业的重视, 有针对性的目标微生物检测, 能够为低温保存肉制品杀菌问题提供参考, 使得生产企业能更好的提高低温肉制品的产品质量, 满足人们的生活需要。

张红伟等<sup>[14]</sup>报道了沙雷氏菌可导致小鼠死亡、精神状态发生不同程度的变化, 说明沙雷氏菌具有一定的致病性。随着免疫抑制剂和大量广谱抗生素的应用, 耐药沙雷氏菌引起的感染发病率逐渐增多, 给临床治疗带来很大的困难<sup>[15]</sup>。实验室药敏分析结果可为致病微生物引起的食源性合理选用抗菌药物, 防止病原菌的扩散与传播提供参考依据。

微生物引起的食源性疾病是食品安全头号杀手, 纵观近年来爆发的数例食源性疾病事件, 究其根源, 主要都是与基本卫生要求的缺失有关<sup>[16]</sup>。液化沙雷氏菌作为一种条件致病菌, 能够引起食品的腐败变质。由于目前并无相应的国家标准检测方法, 本实验通过一系列分离和鉴定方法对分离到的液化沙雷氏菌进行验证, 为食品监管部门分析可能发生的食品安全风险隐患提供参考依据。

## 参考文献

- Mahlen SD. *Serratia* infection from military experiments to current practice [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24(4): 755-791.
- Momose T, Masutani S, Oshima A, et al. First pediatric case of infective endocarditis caused by *Serratia liquefaciens* [J]. *Int Heart J*, 2018, 59(6): 1485-1487.
- 姜岩, 苏维奇, 孔繁荣, 等. 沙雷菌属细菌医院感染的分布特点及耐药性分析[J]. *中国实验诊断学*, 2008, 12(10): 1301-1303.
- Jiang Y, Su WQ, Kong FR, et al. Distribution characteristics and drug resistance analysis of nosocomial infection in *Serratia* [J]. *Chin Lab Diag*, 2008, 12(10): 1301-1303.
- 王文静, 韩月杰, 王立钊. 低温肉制品微生物污染风险及防控关键技术[J]. *当代畜禽养殖业*, 2018, 11: 40.
- Wang WJ, Han YJ, Wang LZ. Key technologies of microbial contamination and prevention and control of low temperature meat products [J]. *Contemp Livest Poult Farm*, 2018, 11: 40.
- 陈玉真, 陈敏, 杨非, 等. 液化沙雷菌引起的火腿变质[J]. *中国卫生检验杂志*, 2002, 12(3): 317.
- Chen YZ, Chen M, Yang F, et al. Deterioration of ham caused by liquefied *Serratia* [J]. *Chin J Health Inspect*, 2002, 12(3): 317.
- 袁昕慧. NGS 技术用于引起奶牛乳房炎的液化沙雷菌的耐药基因的筛选[D]. 延吉: 延边大学, 2018.
- Yuan XH. Screening of drug resistance genes of liquefied *Serratia marcescens* caused by NGS technology in dairy cow mastitis [D]. Yanji: Yanbian University, 2018.
- Kazuo S, Ryo K, Akihiro K, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding chitinase ChiA from *Xanthomonas* sp. cstrain AK and some properties of ChiA [J]. *J Ferment Bioeng*, 1998, 86(6): 527-533.
- 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 microbiological examination test of *Salmonella* [S].
- 谭瑶, 赵清, 舒为群, 等. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(20): 2290-2291.
- Tan Y, Zhao Q, Shu WQ, et al. K-B paper diffusion method drug sensitivity test [J]. *Lab Med Clin Med*, 2010, 7(20): 2290-2291.
- Holt J. *Bergey's manual of systematic bacteriology* [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- 赵爽. 低温肉制品保鲜新技术研究进展及展望[J]. *现代化农业*, 2018, (4): 51-54.
- Zhao S. Research progress and prospects of new technology for cryopreservation of meat products [J]. *Mod Agric*, 2018, (4): 51-54.
- 竺尚武. 干腌火腿中致腐败微生物的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(8): 93-96.
- Zhu SW. Research progress on spoilage microorganisms in dried cured ham [J]. *Food Ferment Ind*, 2006, 32(8): 93-96.
- 陈历水, 刘松玲, 倪军, 等. 1 株来源于腐败肉制品的沙雷氏菌的分离鉴定与特性研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(10): 235-239.
- Chen LS, Liu SL, Ni J, et al. Isolation, identification and characterization

- of a *Serratia* isolated from corrupted meat products [J]. Chin J Food Sci, 2014, 14(10): 235–239.
- [14] 张红伟, 董文龙, 王羽, 等. 不同来源沙雷氏菌的分离鉴定及其耐药性分析[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(5): 616–622.
- Zhang HW, Dong WL, Wang Y, *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of different sources of *Serratia* [J]. Chin Vet Sci, 2016, 46(5): 616–622.
- [15] 于清华. 沙雷氏菌医院感染特点及对常用抗菌药物的耐药性分析[J]. 医学理论与实践, 2009, 22(5): 613–614.
- Yu QH. Characteristics of nosocomial infection of *Serratia* and its resistance to commonly used antibiotics [J]. Med Theor Pract, 2009, 22(5): 613–614.
- [16] 苏涛, 毛永杨, 田金兰, 等. 食品安全标准中微生物检验指标的问题分析及建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2801–2807.

Su T, Mao YY, Tian JL, *et al.* Analysis and suggestions on problems of microbiological test indicators in food safety standards [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(9): 2801–2807.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



骆业巧, 硕士, 工程师, 主要从事微生物实验室的日常检验和管理工作。

E-mail: 651996148@qq.com