

保健食品中病原微生物的鉴定和溯源分析

郭芯岐, 潘建文*

(常州市食品药品监督管理局, 常州 213000)

摘要: 目的 对抽检的保健食品病原微生物进行鉴定与溯源分析。**方法** 采用显微观察、生化反应、VITEK 2 Compact 鉴定系统、16S rRNA 基因同源性分型, 对从样品和实验环境中分离得到的 11 株菌株进行鉴定和同源性分析。**结果** 由抽检的保健食品中分离的细菌分别被鉴定为恶臭假单胞菌、杀鲑气单胞菌、成团泛菌、奇异变形菌、溶血不动杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、浅绿气球菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、粘质沙雷菌, 其中 8 株为革兰氏阴性菌, 1 株为革兰氏阳性菌; 而由实验环境中分离的 2 株细菌全部为革兰氏阳性菌, 分别是藤黄微球菌和表皮葡萄球菌; 由 16S rRNA 基因同源性分析可知, 从样品中分离得到的 8 株细菌和实验环境中分离得到的 2 株细菌并不在一个系统发育分支, 亲缘关系较远, 不存在相关性。**结论** 保健食品中分离的细菌和实验环境中分离的细菌亲缘关系较远, 不存在相关性, 保健食品的污染源与微生物限量检查的实验环境无关, 样品的污染可能是在加工过程中引入的。

关键词: 保健食品; 病原微生物; 鉴定; 溯源

Identification and traceability analysis of pathogenic microorganism isolated from healthy food

GUO Xin-Qi, PAN Jian-Wen*

(Changzhou Center for Food and Drug Control, Changzhou 213000, China)

ABSTRACT: Objective To identify and trace the pathogenic microorganism of health food. **Methods** Eleven target-bacteria, isolated from healthy food samples and environment, were identified and traced during homology analysis by microscopic observation, biochemical reaction, VITEK 2 Compact system, 16S rRNA gene homology typing. **Results** The strains from healthy food samples were appraised as *Pseudomonas putida*, *Aeromonas salmonicida*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Citrobacter freundii*, *Aerococcus viridians*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, and 8 strains among them were gram negative, and 1 strain was gram positive; 2 strains from environment were appraised as *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* and all of them were gram positive. Eight strains from healthy food samples and 2 strain from environment were traced into different types by the analysis of phylogenetic relationships. It seemed that the source of healthy food contamination would be introduced from process and transportation steps, and it was not related to the inspection environment. **Conclusion** The strains from healthy food samples and the strain from environment are traced into different types and there are not related to the inspection environment. The source of healthy food contamination may be from process and transportation steps.

KEY WORDS: health food; pathogenic microorganism; identification; traceability

*通讯作者: 潘建文, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品及药品安全检测。E-mail: 356051657@qq.com

*Corresponding author: PAN Jian-Wen, Associate Chief Pharmacist, Changzhou Center for Food and Drug Control, No.106, Hehaixi Road, Xinbei District, Changzhou 213000, China. E-mail: 356051657@qq.com

1 引言

近年来,随着收入及消费水平的提高,人们对健康的需求日益强烈,食用保健食品的人群不断扩大,保健食品的卫生质量也倍受关注^[1,2]。保健食品微生物学检验依据 GB 16740-2014《食品安全国家标准 保健食品》^[3],对菌落总数、大肠菌群、霉菌和酵母、金黄色葡萄球菌、沙门菌的限量和检验方法进行了说明。保健食品微生物污染源主要来自样品加工或由实验环境引入这 2 个方面,对于由实验环境引入的病原微生物,如果没有经过污染调查找出,就会影响结果的准确性^[4-6]。许多保健食品在生产时做不到完全与外界隔离,这就会导致保健食品和外界频繁的接触,在接触过程中就会导致食物被污染,如加工、搬运、储存、销售等,这些过程都会使保健食品长时间暴露在外界环境中,由于空气中的水分会给微生物营造生存空间,致使保健食品被病原微生物^[7-9]。污染源微生物限量检查虽能防止问题保健食品流向消费领域,却无法对保健食品检验过程控制,同时无法解决保健食品病原微生物来源问题,也就无法向监管机关提供有效的微生物风险评估和风险管理的信息^[10,11]。因此,在进行保健食品微生物限量检查时,对病原微生物进行鉴定和溯源就显得尤为重要。

本研究结合常州市食品药品监督管理局抽检的不同品种保健食品检验工作,采用多种微生物鉴定和溯源方法(显微观察、生化反应、VITEK 2 Compact、16S rRNA 基因同源性分型)对从不同品牌保健食品中分离得到的 9 株细菌和实验环境中分离得到的 2 株细菌进行鉴定和同源性分析,系统阐述保健食品微生物限度检查中病原微生物鉴定和溯源分析的过程和方法,为保健食品病原微生物追踪溯源提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统、PREVI Color Gram 革兰染色仪(法国生物梅里埃公司); BX43 生物显微镜(日本 Olympus 公司); GHP-9270 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); 细菌微量生化鉴定管(北京路桥技术股份有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样本来源及方法依据

实验样品来源于常州市食品药品监督管理局中心年度抽检计划,对全市的保健食品生产及销售单位随机抽取共 50 批样品,包括辅助降糖类、增强免疫力类、辅助降血脂类和改善睡眠类保健食品。本实验依据 GB 16740-2014《食品安全国家标准 保健食品》^[3]微生物限量检查所列检验方法,对常州市食品药品监督管理局中心抽检的保健食品进行

微生物限量检查,共分离筛选到 9 株细菌;同时,在检验过程中,为了确定该次微生物限量检查是否存在交叉污染,对常州市食品药品监督管理局中心洁净室环境进行监控,包括对百级净化台及万级背景区进行沉降菌采集,最终收集到 2 株环境菌。抽检样品信息及检出菌见表 1。

表 1 样品和环境检出菌
Table 1 Bacteria isolated from healthy food samples and environment

菌株编号	来源	生产厂家
Y1	氨糖软骨素维生素 D 钙片	A 公司
Y2	大豆磷脂软胶囊	B 公司
Y3	大豆磷脂软胶囊	B 公司
Y4	阿胶浆	C 公司
Y5	康富来洋参含片	D 公司
Y6	新大泽牌螺旋藻片	E 公司
Y7	钙镁片	F 公司
Y8	钙镁片	F 公司
Y9	三勒浆饮品	G 公司
H1	万级沉降菌	/
H2	万级沉降菌	/

2.2.2 细菌鉴定方法

(1) 显微观察法

对分离得到的菌株进行革兰氏染色,先在载玻片上滴一滴无菌水,再用接种环取少量新鲜菌体,涂在载玻片上,使其薄而均匀,让菌膜朝上,通过火焰 2~3 次固定,将固定好的载玻片放入 PREVI Color Gram 革兰染色仪中染色,再将染色好的载玻片在显微镜下观察菌体的形态特征。

(2) 生化鉴定及 VITEK 2 Compact 全自动鉴定系统

采用细菌微量生化鉴定管对菌株进行生化鉴定,并根据镜检结果,选择适宜细菌鉴定卡(GN 卡或 GP 卡),通过 VITEK 2 Compact 全自动鉴定系统对检出菌进行精确鉴定。

(3) 基因同源性分型

根据全自动鉴定系统的鉴定结果,在 GenBank 查找并确定相应菌株的 16S rRNA 基因序列,所选取的菌株序号及基因登录(genne id)号见表 2。采用 CLASTAL X 进行序列比对,然后用 MEGA 10.0.5 软件经 Nergbor-joining 法构建 16S rRNA 基因同源性关系图。

3 结果与分析

3.1 细菌鉴定结果

通过显微观察、生化鉴定及 VITEK 2 Compact 全自动鉴定系统对 11 株细菌进行分析,鉴定结果见表 3。由表 3

中数据可以看出, 从保健食品中分离的细菌多数为革兰氏阴性菌, 而从环境中分离的细菌为革兰氏阳性菌; 环境中分离到的细菌并未在样品中发现, 说明实验环境对保健食品微生物限量检查未造成干扰。

表 2 菌株序号和 gene id
Table 2 The name of bacteria and gene id

菌株	标准菌株号	基因登陆号
恶臭假单胞菌	fabG	31684528
杀鲑气单胞菌	mobC	934912
成团泛菌	uraH	39508875
奇异变形菌	blc	7011595
溶血不动杆菌	fadB	39464010
弗氏柠檬酸杆菌	mucA	1055624
浅绿气球菌	pseC	32030699
洋葱伯克霍尔德氏菌	pYS10080	13919542
粘质沙雷菌	trhV	2654004
藤黄微球菌	pMLU1p01	3233657
表皮葡萄球菌	mob	13918566

表 3 细菌鉴定结果
Table 3 Identification results of tested bacteria

菌株编号	革兰氏染色	显微形态	鉴定结果
Y1	G ⁻	杆状	<i>Pseudomonas putida</i> (恶臭假单胞菌)
Y2	G ⁻	短杆状	<i>Aeromonas salmonicida</i> (杀鲑气单胞菌)
Y3	G ⁻	杆状	<i>Pantoea agglomerans</i> (成团泛菌)
Y4	G ⁻	杆状	<i>Proteus mirabidis</i> (奇异变形菌)
Y5	G ⁻	杆状	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (溶血不动杆菌)
Y6	G ⁻	杆状	<i>Citrobacter freundii</i> (弗氏柠檬酸杆菌)
Y7	G ⁺	球形	<i>Aerococcus viridans</i> (浅绿气球菌)
Y8	G ⁻	杆状	<i>Burkholderia cepacia</i> (洋葱伯克霍尔德氏菌)
Y9	G ⁻	短杆状	<i>Serratia marcescens</i> (粘质沙雷菌)
H1	G ⁺	球形	<i>Micrococcus luteus</i> (藤黄微球菌)
H2	G ⁺	球形	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (表皮葡萄球菌)

3.2 16S rRNA 基因同源性分型结果

根据 MEGA 10.0.5 软件经 Nergbor-Joining 算法对从保健食品中分离得到的 9 株细菌和实验环境中分离得到的 2 株细菌进行同源性分析, 并构建了系统发育树, 见图 1。从图 1 可以看出, 从实验环境中分离得到的细菌 H1、H2 除了与从样品中分离得到的细菌 Y7 亲缘关系较近外, 与其他 8 株细菌亲缘关系都较远, 不存在相关性, 说明实验

环境与保健食品间不存在交叉污染, 污染源可能是样品在加工过程中引入的。

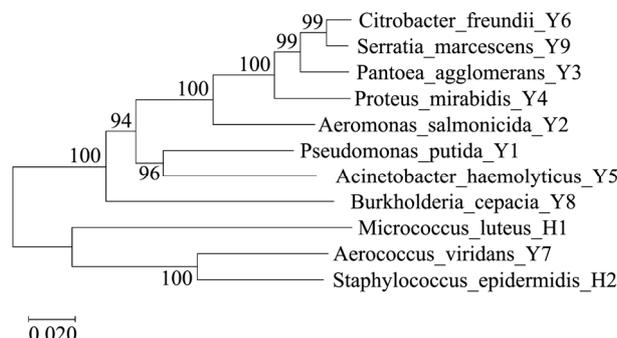


图 1 细菌 16S rRNA 基因序列同源性分析图

Fig.1 The phylogenetic relationship based on 16S rRNA gene sequence

4 结论与讨论

本文结合保健食品检验工作中的实例, 运用显微镜观察法、生化鉴定法、分子生物学同源性分析等细菌鉴定方法, 采用细菌微量生化鉴定系统、VITEK 2 Compact 全自动鉴定系统、16S rRNA 基因同源性分型系统 3 种分析方法对从样品和环境中分离得到的 11 株菌株进行鉴定分型及同源性分析, 阐述了保健食品微生物限度检查中病原微生物鉴定和溯源分析的过程和方法, 为保健食品病原微生物追踪溯源提供科学参考。

显微观察与生化鉴定方法是经典的微生物鉴定技术, 具有操作简单仪器成本较低, 推广比较容易等优势, 是微生物鉴定与分型研究的基础。但针对复杂的环境微生物种类和微生物本身的生化反应可变性高等特性, 显微观察与生化鉴定法在鉴定溯源过程中存在不可避免的局限性。16S rRNA 基因序列对比分析在细菌现代分类学里应用非常广泛, 是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的研究手段^[12]。结合本文实例的分析, 在保健食品微生物限量检查试验中, 在病原微生物源比较单一、交叉污染较少的情况下可以结合显微观察、生化鉴定与基因同源性分型系统的方法对病原微生物进行鉴定和溯源分析, 这在初步判断实验过程是否存在交叉污染和寻找污染源方面起到非常重要的作用; 但由于不同方法在鉴定与分型中均有不同的局限性, 对于一些病原微生物比较复杂的情况, 就必须在传统形态学与生化鉴定的基础上借助多种鉴定与分型方法, 如 RiboPrinter 技术^[13]和 DiversiLab 技术^[14]、红外光谱(fourier transform infrared, FTIR)^[15]、串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)^[16]等方法, 以解决保健食品微生物限量检查中实际遇到的病原微生物和溯源问题。

参考文献

- [1] 张林青, 胡旂, 王岚, 等. 2009-2016 年 1842 份保健食品微生物检测检测结果分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(11): 1293-1295.
Zhang LQ, Hu Z, Wang L, *et al.* Microbiological detection results of 1,842 samples of health food, 2009-2016 [J]. Pract Prev Med, 2017, 24(11): 1293-1295.
- [2] 赫文龙, 宫国强, 刘斌, 等. 常用保健食品中可能的非法添加物质分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1438-1444.
He WL, Gong GQ, Liu B, *et al.* Analysis of possible illegal substances in common health foods [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(6): 1438-1444.
- [3] GB 16740-2014 食品安全国家标准 保健食品[S].
GB 16740-2014 National food safety standard-Health food [S].
- [4] Tam WK, Yang D. Food safety and the development of regulatory institutions in China [J]. Asian Perspect, 2005, 29(4): 5-36.
- [5] 柳宏斌, 胡鹏, 王银平. 浅议食品微生物检验及其质量控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2624-2628.
Liu HB, Hu P, Wang YP. Discussion on the inspection and quality control of microorganism in food [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(9): 2624-2628.
- [6] 付玉生, 李永利, 张欣焯, 等. 河南省保健食品中污染物调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(3): 360-365.
Fu YS, Li YL, Zhang XY, *et al.* Analysis on heavy metal, microbe and pesticide contamination of health foods from Henan Province [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(3): 360-365.
- [7] 李迪. 食品中微生物危害的分析和控制[J]. 现代食品, 2018, (11): 77-79.
Li D. Analysis and control of microbial hazards in food [J]. Mod Food, 2018, (11): 77-79.
- [8] 张新武, 杜小波, 徐素玲, 等. 食品中微生物危害的分析和控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, (10): 3295-3299.
Zhang XW, Du XB, Xu SL, *et al.* Analysis and control of microbiological hazards in food [J]. J Food Saf Qual, 2015, (10): 3295-3299.
- [9] 王国琴. 食品微生物之水产品中的微生物检验方法研究进展[J]. 中国现代医生, 2013, 51(7): 116-117.
Wang GQ. Research progress of microbial test method of aquatic product of microorganisms in food [J]. China Mod Doc, 2013, 51(7): 116-117.
- [10] 姚瑶, 孙健, 邵顺章. 薄膜过滤法在茶饮料微生物检验中的应用[J]. 食品与药品, 2018, 20(2): 105-109.
Yao Y, Sun J, TAI SZ. Application of membrane filtration method in microbiological test for tea drinks [J]. Food Drug, 2018, 20(2): 105-109.
- [11] 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.* Isolation and identification of *Salmonella* in the proficiency testing [J]. Food Res Dev, 2018, 39(20): 166-171.
- [12] 韩晓伟, 张小波, 严玉平, 等. 16S rRNA 基因高通量测序法分析黄河太岁细菌的多样性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 866-874.
Han XW, Zhang XB, Yan YP, *et al.* Bacterial diversity of the yellow river taisu by 16S rRNA gene sequencing [J]. Microbiol, 2018, 45(4): 866-874.
- [13] 杨燕, 冯震, 鲍英, 等. 全自动基因指纹分析仪 Riboprinter 在药品中大肠埃希菌的鉴定分析中的应用[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(7): 536-539.
Yang Y, Feng Z, Bao Y, *et al.* Identification and analysis of *Escherichia coli* in drugs by Riboprinter microbial characterization system [J]. Chin J Antibiot, 2013, 38(7): 536-539.
- [14] 郑晶, 唐中伟, 陈彬, 等. 对同一地区分离的单增李斯特菌进行 DiversiLab 分型及同源性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 9-15.
Zheng J, Tang ZW, Chen B, *et al.* DiversiLab typing and homology analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from the same place [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(1): 9-15.
- [15] Agnieszka N, Magdalena K, Zbigniew N, *et al.* Characteristics of the chemical processes induced by celluloses in the model and gluten dough studied with application of FTIR spectroscopy [J]. Food Hydrocolloid, 2018, 27(20): 176-184.
- [16] 李妍, 刘海灿, 杨健, 等. 陕西分离株结核分枝杆菌可变数目串联重复序列基因分型研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(4): 354-358.
Li Y, Liu HC, Yang J, *et al.* Study on VNTR genotyping of mycobacterium tuberculosis isolates from Shaanxi province [J]. J Parasit Biol, 2018, 13(4): 354-358.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



郭芯岐, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为保健食品药品分析。
E-mail: 928692336@qq.com



潘建文, 副主任药师, 主要研究方向为保健食品及药品安全检测。
E-mail: 356051657@qq.com