



冻鸡肉中肠炎沙门氏菌的分离与鉴定

唐爱明, 王 辉, 陈 智, 刘增再, 郑娇妹
(长沙市畜禽水产品质量检测中心, 湖南 长沙 410013)

摘 要: 通过全自动微生物鉴定仪, 对送检的 5 份冻鸡肉进行沙门氏菌的分离与鉴定, 并对检验过程和结果进行分析。结果表明: 5 份送检的冻鸡肉中有两份含有肠炎沙门氏菌。本结果为动物产品中肠炎沙门氏菌等致病菌的检验提供依据, 确保肉品安全。

关键词: 冻鸡肉; 沙门氏菌; 分离鉴定; 食品安全

Isolation and Identification of *Salmonella enteritidis* from Frozen Chicken

TANG Ai-ming, WANG Hui, CHEN Zhi, LIU Zeng-zai, ZHENG Jiao-mei
(Changsha Stock, Poultry and Fisheries Production Quality Detection Center, Changsha 410013, China)

Abstract: Following the new national standard for *Salmonella enteritidis* examination in foods 2010 version, frozen chicken samples were tested using full automatic microbiological analyzer, and meanwhile, analysis of the examination process and data were conducted in order to provide evidence for the examination of *Salmonella enteritidis* and other pathogenic bacteria in food and ensure food safety.

Key words: frozen chicken; *Salmonella*; isolation and identification; food safety

中图分类号: TS251.55; Q93.331

文献标识码: A

文章编号: 1001-8123(2011)03-0001-03

沙门氏菌是重要的人畜共患病病原, 引起人和动物肠道感染和食物中毒, 临床表现为急性胃肠炎症, 有突发性剧烈头痛、腹泻、呕吐、感觉不适和体温升高等症状^[1]。肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, SE)作为沙门氏菌属中重要的肠道致病菌之一, 是污染畜肉、禽肉等动物性食品的主要病原菌, 在兽医公共卫生学中具有重要意义。本实验对送检的冻鸡肉, 按照 2010 年卫生部新颁布的食品安全国家标准和食品微生物学沙门氏菌检验方法进行检验^[2-4], 掌握鸡肉产品中沙门氏菌污染情况, 确保肉品安全^[5], 旨在为长沙市建设食品安全城市构筑有效屏障。

1 材料与方法

1.1 材料

委托检验单位送检的 5 份鸡肉, 编号为 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 于 -20℃ 冰箱保存。肠炎沙门氏菌阳性标准菌株(编号为 CICC21482, 实验编号为 A₆)由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。

1.2 培养基

缓冲蛋白胨水(BPW)、四硫磺酸钠磺绿(TTB)增菌

液、营养琼脂(NA)、亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)、亚硫酸铋琼脂(BS)、HE 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、沙门氏菌属显色培养基、三糖铁琼脂(TSI)、胰酪胨大豆琼脂平皿(TSA) 北京陆桥微生物制剂有限公司。

1.3 细菌微量鉴定管

赖氨酸生化管(批号为 20100420)、氰化钾对照管(批号为 20100222)、蛋白胨水(色氨酸肉汤, 供做靛基质实验, 批号为 20100602) 杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4 仪器与设备

GN 鉴定卡(编码为 241164440, 批号为 20100615)、细菌鉴定仪(全自动微生物鉴定 / 药敏分析系统, 型号为 VITEK 2 COMPACT15, 定期用金黄色葡萄球菌阳性标准菌株做质量控制, 菌株编号为 CICC21600, 质控结果完全符合) 法国梅里埃公司。

1.5 方法

1.5.1 细菌增菌培养

待检冻鸡肉, 于 37℃ 待其解冻后, 按随机取样的方法, 无菌剪取鸡肉 25g, 加在装有 225mL BPW 增菌液的均质器内, 以 8000r/min 打碎 1min, 转至 500mL 广口

收稿日期: 2011-03-10

作者简介: 唐爱明(1974—), 女, 兽医师, 硕士, 主要从事微生物检验研究。E-mail: 935219104@qq.com



瓶内，于37℃培养24h。移取培养过的样品混合物1mL转种于10mL TTB内，于42℃培养24h；同时另取1mL转种于10mL SC内，于37℃培养24h。

1.5.2 细菌的分离培养

取SC和TTB增菌液各一环，分别接种于BS、HE、XLD平板和沙门氏菌属显色培养基平板，37℃培养24h观察结果。

1.5.3 细菌的鉴定^[6-7]

1.5.3.1 细菌形态特征观察^[8]

将24h营养琼脂培养的纯菌落，加生理盐水均匀涂片，火焰固定，革兰氏染色后观察。

1.5.3.2 生化实验^[9]

按食品安全国家标准GB 4789.4—2010《食品微生物检验 沙门氏菌检验》的方法进行生化实验。

1.5.3.3 生化鉴定^[10-11]

取A₁、A₂、A₃、A₄、A₅、A₆菌株在TSA平板上37℃培养18h的分纯细菌，用0.45%生理盐水制备成浊度适当的菌悬液，用比浊仪测定菌液浓度，选用GN鉴定卡，按细菌鉴定仪操作要求，全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离培养

A₁菌在BS琼脂平板上分离出边缘透明、中心呈黑色的单个菌落，成片生长的菌落几乎全呈黑色；HE平板菌落呈黑色；XLD平板菌落全部呈黑色。A₂、A₃、A₄、A₅在HE上为粉红色菌落，在XLD平板上为黄白色菌落，在BS平板上为灰黑色菌落。沙门氏菌属显色培养基平板上菌落A₁呈紫色(为沙门氏菌属典型菌落颜色)，A₂、A₃、A₄、A₅均呈蓝色。挑取A₁紫色单个菌落接种于普通营养琼脂NA平板，进一步分离纯化后

接种于营养肉汤；接种于TSI琼脂斜面，转种时先穿刺底层再涂布斜面，于37℃培养24h。结果分离出一株细菌，该菌株在肉汤表面形成菌膜，肉汤均匀混浊，管底有灰白色沉淀物；普通营养琼脂上的菌落，无色透明，表面光滑，圆形较为扁平、黏稠；TSI琼脂斜面变红，底层产酸产气，H₂S阳性。取NA平板单菌落接种TSA平板，37℃培养18h，上全自动微生物鉴定/药敏分析系统进行鉴定。

2.2 细菌的鉴定

2.2.1 细菌形态特征观察

结果为革兰氏阴性无芽孢短杆菌，大小均匀，单个存在、两端钝圆。

2.2.2 生化实验

表1 沙门氏菌属生化反应初步鉴别表

Table 1 Biochemical characteristics of *Salmonella* in preliminary identification

反应序号	硫化氢	氨基酸	pH7.2 尿素	氧化钾	赖氨酸脱羧酶
A ₁	+	—	—	+	+
A ₂	—	—	+	—	—
A ₃	—	+	+	—	—
A ₄	—	+	—	—	—
A ₅	—	—	—	—	—
A ₆	+	—	—	+	+

注：+，阳性；—，阴性。下同。

根据表1分离菌株的生化反应实验结果，对照GB 4789.4—2010《食品微生物检验 沙门氏菌检验》中沙门氏菌属生化反应初步鉴别的方法，A₁、A₆初步判定为沙门氏菌属细菌；A₂、A₃、A₄、A₅为非沙门氏菌。

2.2.3 生化鉴定

鉴定卡按正常程序放入VITEK 2 COMPACT孵育箱后，仪器经过4~8h的孵育和判读，由工作电脑给出相应鉴定结果。从表2可以看出，全自动细菌鉴定仪报告

表2 沙门氏菌属的生化鉴定结果

Table 2 Biochemical identification results of preliminarily identified *Salmonella* strains

孔号	名称	结果	孔号	名称	结果	孔号	名称	结果
3	侧金盏花醇	—	26	脂酶	—	43	N-乙酰-β-半乳糖氨酶	—
5	L-阿拉伯醇	—	27	古老糖	—	44	α-半乳糖苷酶	+
7	D-纤维二糖	—	31	尿素酶	—	45	磷酸酶	+
9	β-半乳糖苷酶	—	32	D-山梨醇	+	46	氨基乙酸芳胺酶	—
10	H ₂ S产生	+	33	蔗糖	—	47	鸟氨酸脱羧酶	+
13	D-葡萄糖	+	34	D-塔格糖	—	48	赖氨酸脱羧酶	+
14	谷氨酰转移酶	+	35	D-海藻糖	+	53	组氨酸同化	—
15	葡萄糖发酵	+	36	柠檬酸盐	+	56	COURMARATE	+
17	β-葡萄糖苷酶	—	37	丙二酸盐	—	57	β-葡萄糖苷酸酶	—
18	D-麦芽糖酶	+	39	5-酮-葡萄糖苷	—	58	O/129 耐受	—
19	D-甘露醇	+	40	乳酸盐产碱	+	61	L-苹果酸盐同化	—
20	D-甘露糖	+	41	α-葡萄糖	—	62	Ellman	—
21	β-木糖苷酶	—	42	琥珀酸盐产碱	—	64	L-乳酸盐同化	—



最终鉴定, A₁和A₆菌株100%为沙门氏菌, 为相当好的鉴定。A₁和A₆阳性标准菌株各项生化指标实验结果完全吻合, 判定为肠炎沙门氏菌。A₂、A₃为沙雷菌属, A₄为大肠埃希氏菌, A₅为蜂房哈夫尼亚菌。

3 结论与讨论

3.1 经鸡肉的分离培养以及细菌鉴定, 证实从冻鸡肉A1样品中分离到肠炎沙门氏菌, 该批鸡肉已不符合食品卫生检验标准, 对人体健康潜在严重的威胁^[12-13]。因此, 要求委托方对同批全部冻鸡肉作无害化处理。

3.2 按GB 4789.4—2010进行动物产品沙门氏菌检验时, 每个检验样品均采用BPW前增菌, 使受损伤的沙门氏菌细胞回复到稳定的生理状态, 使濒死状态的沙门氏菌恢复活力^[14]。

3.3 把分别经(42±1)℃培养的TTB增菌液和(36±1)℃培养的SC增菌液划线接种BS、沙门氏菌显色培养基等平板进行分离培养。根据对200多份样品的沙门氏菌检验结果进行分析, 检验样品同时采用TTB(42±1)℃和SC(36±1)℃进行选择性地增菌, 能较大地提高检出率^[15]。在分离沙门氏菌时, BS比其他选择性琼脂平板特异性更强, 典型菌落易于辨认, 检出率较高。

3.4 沙门氏菌检验中生化实验是结果判定的主要依据。按GB 4789.4—2010食品安全国家标准沙门氏菌检验方法进行检验时, 依据典型生化反应对沙门氏菌进行初步判定。日常检验工作中, 应尽可能多做扩大生化实验来判定结果。这是因为合成的培养基和生化试剂的质量存在一定程度的不稳定性, 有时会影响生化实验结果的准确性。例如用不同厂家生产的生化试剂对同一菌株进行生化实验, 显示氨基酸脱羧酶类实验结果经常出现不一致, 致使检验结果难以判定。为避免出现假阴性或假阳性结果, 除了应尽可能多做扩大生化实验外, 对某

些质量不甚稳定的生化试剂, 按标准中培养基配方自己配制使用更能确保检验结果的准确性。

3.5 鉴定仪必须采用质控参考菌株定期做质量控制, 以保证鉴定步骤的精密度和准确度, 保证鉴定实验所用试剂和仪器的质量, 同时监测进行实验的工作人员是否规范操作^[16]。

参考文献:

- [1] 中国标准出版社第一编辑室. 动物防疫标准汇编[M]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准 GB 4789.1—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则[S].
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准 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[S].
- [4] 卫生部国家监督中心. 食品卫生国家标准汇编(6)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [5] 余锐萍. 动物产品卫生检验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
- [8] 孙锡斌. 动物检疫检验彩色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [9] GB/T 1.1—2001 标准化工作导则第一部分: 标准的结构和编写规则[S].
- [10] 王鑫, 闫磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 82-86.
- [11] JAY J M, LOESSNER M J, GOLDEN D A. 现代食品微生物学[M]. 何国庆, 丁立孝, 宫春波, 译. 7版. 北京: 中国农业大学出版社, 2008.
- [12] 中国兽医药品监察所. 欧盟动物源性食品安全管理法规[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003.
- [13] 纪正昆, 夏延斌. 食品质量与安全[M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2002.
- [14] 童伟. 食品检验、动植物检疫技术分析与实用大全[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999.
- [15] 广东出入境检验检疫局. 国内外技术法规和标准中食品微生物限量[M]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [16] 许伟琦. 畜禽检疫检验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.