

食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法的研究

Ⅱ、乳及其制品中小肠结肠炎耶尔森氏菌分离方法的研究

卫生部食品卫生监督检验所 王淑颖 杨宝兰 王淑真 周桂莲

小肠结肠炎耶尔森氏菌主要存在于肉、乳及其制品这两大类食品中；在《食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌检验方法的研究》的第一部分，我们研究了从肉及其制品中分离该菌的检验方法^①，比较了冷增菌和碱处理方式对该菌分离效果的影响，证实了冷增菌和碱处理可以提高该菌的检出率；同时根据国际上通用的CIN耶尔森氏菌选择性培养基推出了CIN-I培养基，比较了CIN-I、MAC、SS和改良Y 4种分离培养基的分离选择效果。在这部分里，我们将研究冷增菌和碱处理方式对从乳及其制品中分离小肠结肠炎耶尔森氏菌的影响，进一步比较CIN-I、MAC、SS和改良Y培养基的分离敏感度和选择性。

目前国外对于从乳及其制品中分离该菌的增菌方式有几种：(1) 较高温度短时间增菌法：改良Rappaport肉汤(MRC)，25℃，5天；(2) 冷增菌法：PSB，4℃，经7、14、21天冷增菌；(3) 二步增菌法：PSB，4℃，14天；转种MRC，25℃，5天。对于这三种增菌方式的效果我们将进行比较，从中选出一个适宜该菌生长的增菌方式。

关于从乳及其制品中分离该菌的检验方法，国内研究得还不多；有关乳及其制品中该菌的检出报道也很少；国外报道的关于乳的检出率多在10%左右^{②③}。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 菌株：52203

2. 血清：卫生部成都生物制品研究所制备。

3. 样品：采自中国农科院畜牧所奶牛场。

二、培养基

1. PSB冷增菌液：PH7.6PBS + 0.15%胆盐 + 2%山梨醇

2. 改良的Rappaport肉汤(MRC)：
胰胨：6.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ：1.90g
氯化镁：84.8g

孔雀绿：0.0128g 蒸馏水：1000ml

3. 碱处理液：以0.5%NaCl做溶剂配制而成的0.5%KOH溶液

4. CIN-I培养基^①

5. 改良y培养基^①

其他的培养基如SS、MAC按常规要求制备。

三、试验方法

1. 人为污染奶粉，比较冷增菌和碱处理方式对小肠结肠炎耶尔森氏菌检出结果的影响。

(1) 确定污染量：4份PSB—奶粉增菌液，其中小肠结肠炎耶尔森氏菌的污染浓度为： 3×10^0 个/ml、 3×10^2 个/ml、 3×10^3 个/ml、 3×10^4 个/ml；另取一份PSB—奶粉做对照。

(2) 比较在4℃，经7、14、21天冷增菌后，进行碱处理和直接分离的结果。

2. 比较三种增菌方式的效果

人为污染10份样品(消毒牛奶)，污染

浓度为2个/ml菌；

(1) 高温短时间增菌：MRC，25℃，5天；

(2) 二步增菌：PSB，4℃，14天转种MRC，25℃，5天；

(3) 冷增菌：PSB，4℃，7、14、21天；

将上述三种方式的增菌液接种CIN-I、MAC、SS和改良Y培养基，比较增菌方式的效果。

3. 比较4种分离培养基的分离效果

根据4种培养基对人为污染样品的检出情况，确定每一种培养基对该菌的最低直接检出量；及从人为污染的样品中分离该菌的分离率。

4. 对生牛奶中小肠结肠炎耶尔森氏菌的分离

将样品以1:10的比例加入PSB冷增菌液中，经4℃，7、14、21天三个阶段冷增

菌后，接种CIN-I、MAC、SS和改良Y培养基。

结果和讨论

一、冷增菌和碱处理方式对从乳品中分离小肠结肠炎耶尔森氏菌的影响

从表1的结果可以看出，PSB冷增菌方式同样也适用于从乳品中分离该菌；由于乳类本身污染较少，故经碱处理后，不仅破坏了杂菌也破坏了小肠结肠炎耶尔森氏菌，降低了该菌的检出率。

二、比较增菌方式对小肠结肠炎耶尔森氏菌检出效果的影响

从表2可以看出，PSB冷增菌方式效果最好，冷增菌时间达两个星期（14天）时，样品分离率达到最高。MRC直接增菌，虽然可以缩短增菌的时间，但是由于杂菌可以在25℃时迅速繁殖，阻碍了小肠结肠炎耶尔森氏菌的生长，因此不能得到令人满意的分离效果。

表1 不同污染量的乳样中小肠结肠炎耶尔森氏菌的分离情况

样品增菌液中小肠结肠炎耶尔森氏菌的浓度	CIN-I				MAC			
	0天	7天	14天	21天	0天	7天	14天	21天
对照	- NG	- NG	-	-	- NG	- NG	- NG	-
样品增菌液中小肠结肠炎耶尔森氏菌的含量 (个/ml)	SS				改良Y			
	0天	7天	14天	21天	0天	7天	14天	21天
	直得	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱	直碱
3×10 ³ 个/ml	NG NG	- NG	+ NG	+	- NG	- NG	+ NG	- +
3×10 ² 个/ml	NG NG	+ NG	+ NG	+	- NG	+ NG	+ NG	+ +
3×10 ² 个/ml	NG NG	+ NG	+ NG	+	+ NG	+ NG	+ NG	- -
3×10 ⁴ 个/ml	- NG	+ +	+ NG	+	+ NG	+ NG	+ NG	- +
对照	NG NG	NG NG	- -	-	- NG	- NG	- NG	- -

- 未检出时 + 检出 NG: 未生长

0天: 指的是样品污染了一定量的小肠结肠炎耶尔森氏菌后，在室温放置4小时，然后接种分离培养基。

表2

三种增菌方式的比较

	MRC	PSB→MRC	PSB (4℃)		
	25℃, 5天	4℃, 14天 25℃, 5天	7天	14天	21天
阳性样品数 总样品数	5/10	5/10	1/10	9/10	9/10

表3

比较4种分离培养基的分离效果

最低直接检出量		CIN-I	MAC	SS	改良Y
		3×10^2 个/ml	3×10^4 个/ml	$> 3 \times 10^4$ 个/ml	3×10^3 个/ml
样品的检出率	7天	0/10	1/10	0/10	0/10
(人为污染, 浓度为 2个/ml, 共10份)	14天	9/10	4/10	6/10	6/10
PSB, 4℃	21天	9/10	6/10	5/10	6/10

3、4种分离培养基分离效果的比较

从表中所示的结果来看, CIN-I培养基的分离敏感度最高, 当乳样中小肠结肠炎耶尔森氏菌的浓度为 3×10^2 /ml时, 不需进行增菌就可以直接分离出该菌来; 当PSB冷增菌至14天时, 此培养基就可得到最佳分离效果(分离率为90%); 由于小肠结肠炎耶尔森氏菌可在其上生长为有红色牛眼状特点的菌落, 因此我们认为CIN-I为最佳分离培养基。

四、样品的分离

对于采集的42份样品, 采取PSB 4℃三阶段(7、14、21天)冷增菌直接分离的方式, 在CIN-I、MAC、SS和改良Y培养基上的检出率皆为零。由于这些样品都来源于同一个牛场, 我们认为这还不能代表生牛

奶中该菌的污染状况, 对此还有待于进一步的研究。

小 结

PSB冷增菌方式是适于乳及其制品中的小肠结肠炎耶尔森氏菌分离的增菌方式, 由于乳及其制品污染不严重, 故而在冷增菌后不需进一步做碱处理, 而直接接种分离培养基即可。从实验的结果来看, CIN-I是一个适于分离乳及其制品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的选择性分离培养基。

参考文献

- ①Schiemann D A, et al, Appl Environ Microbid 1978; 36: 274~271.
- ②Swaminaxhan B, et al J Appl Bacteriol 1982; 52: 151~183.
- ③Moustafa K, et al. J Food Prot 1983; 46(4) 276~278.

华香食品有限公司徐州分公司

祝贺《中国食品卫生杂志》创刊

中外合资经营的南京华香食品有限公司徐州分公司, 依靠总公司从国外引进的全套生产设备和技術, 生产“华香”系列面包、糕点, 不同档次的四十余种产品具有色、香、酥、甜、软等各种特点。主要原料为进口小麦精粉、奶油、酵母等, 营养丰富, 老少皆宜, 以最优惠的价格, 最优良的服务向社会提供最优质的产品。欢迎各界人士, 以及广大群众经营指导和监督。我们愿在大家的帮助下办好企业, 更好地为人民服务。

谷物中镰刀菌毒素的污染

卫生部食品卫生监督检验所 罗雪云

镰刀菌属的菌种广泛分布于自然界,该菌是侵染田间谷物和贮藏的粮食的真菌之一。镰刀菌属的禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、三线镰刀菌(*F. tricinatum*)、梨孢镰刀菌(*F. poae*)、串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)等菌种在谷物生长繁殖的同时,还能产生有毒的代谢产物:玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)可引起猪的雌性激素亢进症^①;单端孢霉烯族化合物中的T-2毒素与食物中毒性白细胞缺乏症有关^②;脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON, 又称呕吐毒素)具有很强的致呕吐作用^③;丁烯酸内酯(butenolide)是导致牛烂蹄病的一种毒素^④。由于镰刀菌侵染谷物的普遍性、该菌产生的毒素对人畜健康的危害性、镰刀菌及其毒素在谷物上的污染,越来越引起世界各国普遍的重视。

玉米赤霉烯酮

玉米赤霉烯酮简称ZEN, 又称F₂, 是禾谷镰刀菌、三线镰刀菌、木贼镰刀菌(*F. equiseti*)、黄色镰刀菌(*F. culmorum*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)、串珠镰刀菌等菌种在玉米、大麦、小麦等谷物上生长繁殖产生的二次代谢产物^⑤。猪和牛等家畜吃了被ZEN污染的谷物和饲料后,可引起动物的雌性激素亢进症,主要症状有阴道和乳腺肿胀,子宫肿大,外翻和脱垂,还可引起不育或流产。^⑥ ZEN主要作用于动物的生殖系统。每天经口给6周龄雌猪1mgZEN纯品,8天后出现外阴和乳腺肿大,给雌猪5mgZEN,4天后出现症状。猪的急性中毒症状除外阴肿大外,严重的还可引起阴道或直肠脱垂,子

宫增大、肿胀和扭曲,卵巢萎缩等。ZEN可引起雄性小猪睾丸萎缩,乳腺肿大等雌性化影响^⑦。给怀孕最后一个月母猪每天注射5mgZEN纯品可能引起死胎及畸胎^⑦。大鼠、小鼠、火鸡和牛等也可由于摄入ZEN引起雌性激素亢进症^⑧。

ZEN是一种白色结晶化合物,不溶于水、二硫化碳和四氯化碳,溶于碱性溶液、苯、氯仿、二氯甲烷、醋酸乙酯、乙腈和乙醇;微溶于石油醚^⑨。在短波紫外光下,ZEN呈蓝绿色荧光,其化学结构式如图1。

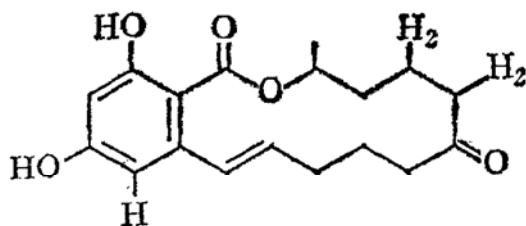


图1 ZEN的化学结构式

ZEN主要污染玉米、小麦、大麦、燕麦和小米。此外,还可污染芝麻、干草和青贮饲料等^⑩。Mirocha等^⑪对65份玉米样品的测定结果表明,有29份样品(占45%)检出该毒素,含量为0.1~2909ppm。Epply等^⑫报道,223份玉米样品中,有17%阳性样品,检出ZEN的含量为0.1~5.0ppm。Hesseltine等^⑬发现,在102份小麦中,有19份样品检出ZEN,其含量为364~11054ppb。我国于1986年对江苏^⑭ 安徽^⑮ 甘肃^⑯ ⑰ 河南^⑱ 江西和上海县的小麦进行了ZEN的污染调查。共检测439份样品,阳性样品140份,占31.9%。上海县、甘肃和江苏的小麦ZEN阳性样品分别占33.0%、40.6%和64.8%。