

图 1 金葡萄菌热损伤及其恢复速率测定程序

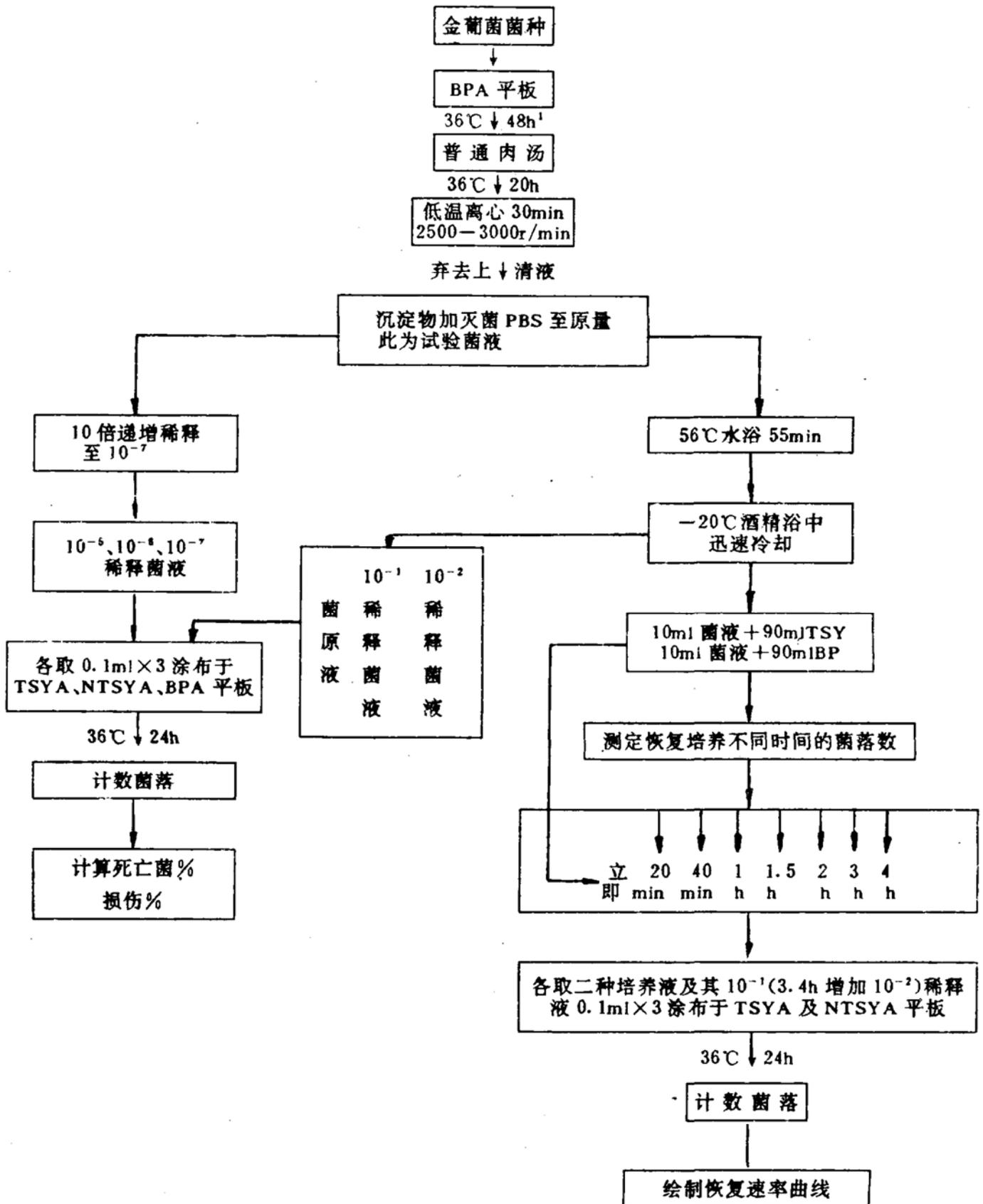
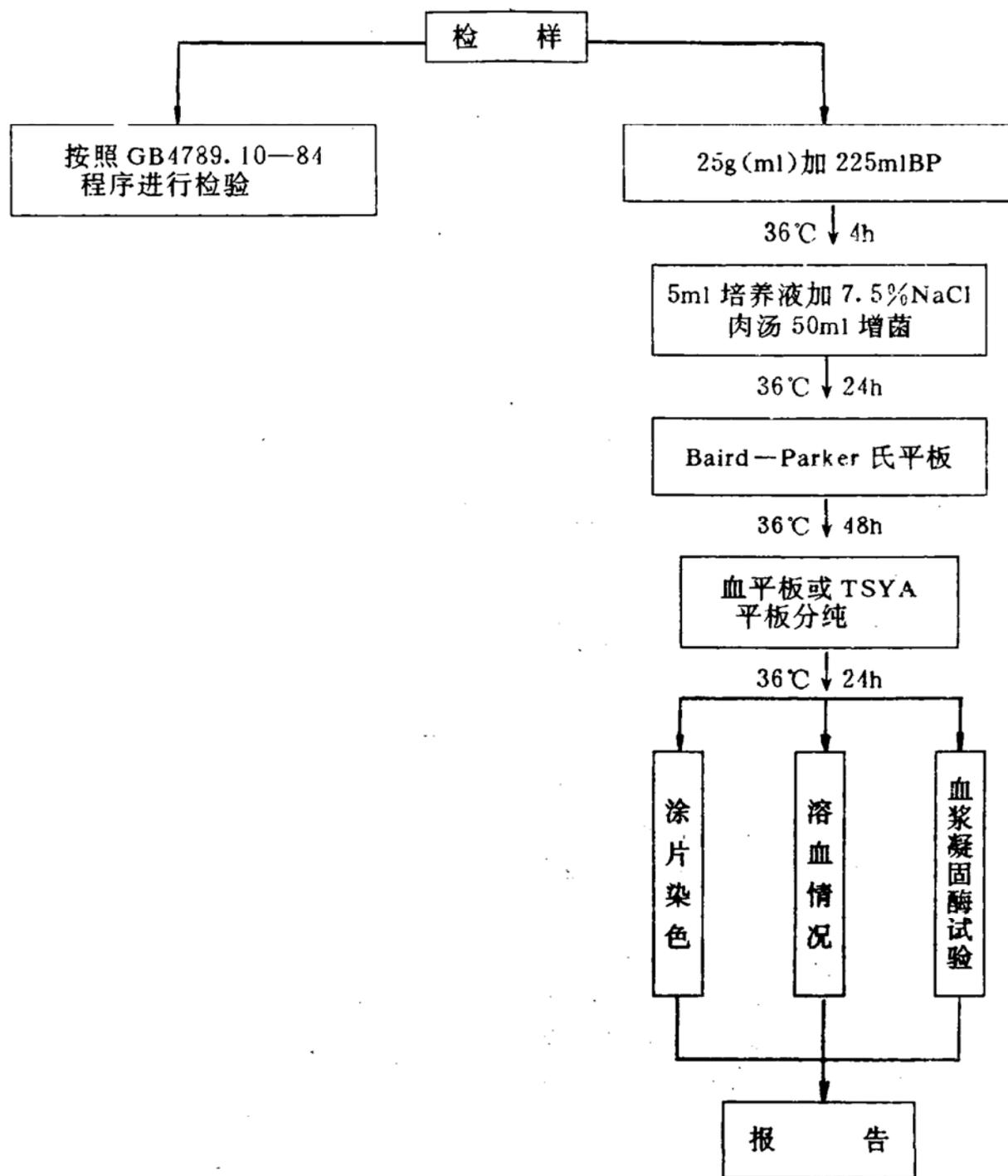


图 2 检样检验程序



参 考 文 献

1. 中华人民共和国国家标准, 食品卫生检验方法·理化部分, 第一版, 北京: 国家标准出版社, 1986: 46—48。
2. 徐君译, 标准曲线可靠性检验程序, 中华预防医

学, 1989: 23(4): 246。

3. 端木彬如, 鲁长豪主编, 卫生学及卫生检验技术, (全国中等卫生学校教材), 第一版, 四川科技出版社, 1986: 139—145。

食品中金黄色葡萄球菌热损伤 恢复后检验方法的探索

舟山市卫生防疫站 黄林志 蒋文雅

摘要 本文探索了金黄色葡萄球菌(以下称金葡菌)受热亚致死性损伤恢复后的检验方法。金葡菌经 56℃ 55min 处理后, 尚存活的菌细胞有 98.2% 受亚致死性损伤, 对 NaCl 的抵抗力丧失, 不能在含 7.5% NaCl 的培养基上生长。用 BP 或 TSY 36℃ 培养, 2h 可完全恢复, 并开始增殖。在 BP 中恢复速率比在 TSY 中更佳。109 件加工食品在 BP 中 36℃ 恢复培养 4h 后, 再用 7.5% NaCl 肉汤增菌, 阳性检出率比 GB4789.10—84 方法提高 2.5 倍以上。

细菌因遭受环境中诸因素的作用而引起亚致死性损伤, 已被许多学者证实^[1]。细菌的损伤和恢复对食品的细菌学检验和卫生质量的评价具有实际意义, 需考虑受损伤细菌的种种因素, 并探索其相应的检验方法。本文报告了对加工食品中金葡菌受热亚致死性损伤恢复后检验方法的探索。

1 材料与方 法

1.1 菌种: 金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 87045(本站分离菌株)

1.2 培养基含 0.3% 酵母浸汁的胰化大豆肉汤(TSY); 缓冲蛋的胨水(BP); 普通肉汤; 7.5% NaCl 肉汤; 含 0.3% 酵母浸汁的胰化

大豆琼脂(TSYA); 含 7.5% NaCl 的 TSYA (NTSYA); Baird—Parker 氏琼脂(BPS); PH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)以上培养基均按文献配制^[2,3]。

1.3 食物样品: 含乳制品 38 件, 消毒牛奶 18 件, 豆制品 9 件, 糕点 34 件, 罐头等其它食品 10 件。均从生产和销售单位采集。

1.4 方法及程序(见图 1)

1.4.1 试验菌液制备: 将金葡菌划种于 BPA 平板上, 36℃ 培养 48h, 挑取 3—5 个菌落接种于 100ml 普通肉汤中, 36℃ 培养 20h 后, 低温离心 30min (2500~3000r/min), 弃去上清液, 用灭菌 PBS 补足至原量, 充分混匀, 此为试验菌液。将试验菌液以灭菌 PBS 中作 10 倍连续递增稀释至 10^{-7} , 取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释度的菌液, 分别吸取 0.1ml 一式三份涂布于 TSYA、NTSA 及 BPA 三种平板上, 36℃ 培养 24h。选 30~300 个菌落的平板, 计数菌落, 以观察未经热处理的金葡菌在三种平板上生长有无差异, 同时测定试验菌液的浓度。

1.4.2 热损伤测定: 将试验菌液于 56℃ 水浴中加热 55min, 取出置 -20℃ 酒精浴中迅速冷却, 分别吸菌原液及 10^{-1} 、 10^{-2} 稀释的菌

液按上法涂布于上述三种平板上,36℃培养24h,计数菌落。分别计算热杀死和损伤的百分率。

1.4.3 恢复速率测定:取两份10ml上述加热后的试验菌液,分别接种于已预热至36℃的90mlBP及90mlTSY中,混匀,立即各吸0.1ml及再10倍稀释的0.1ml的菌液,按上法一式三份涂布于TSYA及NTSYA平板上,36℃培养24h,计数菌落。加试验菌液后的BP及TSY培养液置36℃培养以后分别于20和40min,1、1.5、2、3和4h从BP及TSY培养液中各取两个稀释度的菌液按上法涂布于两种平板,培养计数。

1.4.4 样品检验程序(见图2)

每件样品混匀(固体捣碎),分为两份,一份完全按国家标准方法GB4789.10—84(下称GB法)进行检验。另一份取25ml(固体25g)接种于225mlBP中,36℃培养4h,吸取培养液5ml移种于50ml7.5%NaCl肉汤中,36℃培养24h,以下按GB法进行分离鉴定。

2 结果分析

试验菌液加热前后,在TSYA,在TSYA、NTSYA和BPA三种平板上的生长结果见表1。

TSYA平板上菌落数即为试验菌液的含活菌量。从表1结果看,试验菌未经热处理前,在这三种培养基上生长繁殖情况无差异。经36℃55min加热处理后,试验菌在三种平板上的菌落数均显著减少,以NTSYA更为明显,这是由于受热损伤的细菌不能在此平板生长所致。试验菌液加热前后在TSYA平板上生长的菌落数之差为加热杀死的菌落数。

$$\begin{aligned} \text{死亡}\% &= \frac{\text{加热前 TSYA 菌落数} - \text{加热后 TSYA 菌落数}}{\text{加热前 TSYA 菌落数}} \times 100\% \\ &= \frac{5.2 \times 10^4 \text{ 个/ml} - 9.2 \times 10^2 \text{ 个/ml}}{5.2 \times 10^4 \text{ 个/ml}} \times 100\% = 98.2\% \end{aligned}$$

试验菌液加热前后,在BPA平板上的菌落数均与TSYA平板上的菌落数无差异。已知加热后TSYA平板上的菌落数包含了受

损伤和未受损伤的活菌数,加热后菌液在BPA平板上菌落数不像在NTSYA平板上那末少,而与TSYA平板上一样多,这是受损伤细菌也在BPA平板上生长繁殖的结果。亚硝酸钾是BPA培养基中选择性抑菌剂,从本次实验结果看,受热损伤的金葡菌对亚硝酸钾的抵抗力正常。

加热后金葡菌在BP或TSY中于36℃恢复培养,从零时至1.5h在TSYA平板上的菌落数无变化。受损伤和未受损伤的金葡菌这时处于迟缓阶段,2h开始略有增殖。而在NTSYA平板上从20min开始与其在零时的菌落数相比,逐步有所增加,增加的菌落数相等,即受损伤菌已完全恢复,恢复培养2h,NTSYA平板上的菌落数已达到TSYA平板上零时的菌落数,说明此时受损伤细菌已完全恢复。恢复速率见图3、4。

109件食品检样的检验结果见表2。

GB法金葡菌阳性检出率为11.9%,经BP恢复培养后,金葡菌的阳性检出率达30.3%,差异极显著(P<0.001)。

3 讨论

金葡菌在56℃加热55min后,99.99%的菌细胞被杀死,尚存活的细菌中,98.2%的菌细胞受到亚致死性损伤,丧失了对NaCl的抵抗力,不能在含7.5%NaCl的培养基上生长。目前,国内检验食品中金葡菌按GB法,采用样品于7.5%NaCl肉汤中增菌。而高浓度的NaCl会使受热伤害的细菌致死⁽²⁾。因而样品先用7.5%NaCl肉汤,会使仅含少量已受损伤活菌的样品检不出该菌,使结果不够正确,从而得出错误的卫生质量评价。

近代研究指出,无论细菌遭受何种损伤,受伤菌细胞在适当的培养基和适当的温度下都能很快得到恢复⁽²⁾。完全恢复的细菌对用于为检出该菌而加到培养基中的选择剂反应正常。本文用TSY和BP两种培养基,36℃

作受热损伤金葡菌的恢复试验,两种培养基对热损伤金葡菌的恢复速率几乎相同,而BP比TSY更佳。且BP是GB法中用加工食品中沙门氏菌检验的前增菌培养基。因此,在实际工作中作沙门氏菌检验前增菌的同时可作为金葡菌检验的前增菌。这样既不增加工作量,又能使受损伤的金葡菌得到恢复,使检验结果更接近真实。

对109件食品样品通过BP前增菌,金葡菌的阳性检出率从11.9%提高到30.3%,比GB法检出率提高2.5倍以上。因此认为加工食品做金葡菌检验时,以BP前增菌4h,再移种于7.5%NaCl肉汤中增菌为宜。样品

若做金葡菌计数(MPN),则前增菌1.5h即可。

参 考 文 献

1. 郝上海. 细菌的亚致死性损伤及其恢复. 见:孟昭赫主编. 食品卫生检验方法注解. 微生物学部分. 第一版. 北京:人民卫生出版社,1990年 860—869。
2. 何晓青、孟昭赫、吴光先等译. 食品微生物学检验方法提要. 第一版. 北京. 人民卫生出版社,1982年:108—111,239—240。
3. 刘以贤. 葡萄球菌检验. 中华人民共和国国家标准食品卫生检验微生物学部分. GB4789.10—84. 第一版. 中国标准出版社. 1987年 49—51。

表 1 试验菌液热处理前后在三种平板上生长的菌落数

平 板	菌 落 数 (个/ml)	
	未 加 热 菌 液	56℃55min 热 处 理 菌 液
TSYA	8.7×10^4	5.2×10^4
NTSYA	8.6×10^4	9.2×10^2
BPA	8.4×10^4	5.4×10^4

表 2 109份加工食品二种方法检验金葡菌结果

	含乳制品	牛 奶	豆 制 品	糕 点	罐 头 等 其 它 食 品	合 计
样 品 数	38	18	9	34	10	109
GB 法阳性件数	3	2	2	6	0	13
BP 恢复培养阳性件数	15	4	3	11	0	33