

## 调查研究

新乡市生乳中菌落总数和金黄色葡萄球菌及 $\beta$ -内酰胺酶调查

马建敏<sup>1</sup>, 史晓娟<sup>1</sup>, 邱正勇<sup>2</sup>, 魏红霞<sup>1</sup>, 王伟丽<sup>1</sup>, 栾旭波<sup>1</sup>, 李家珂<sup>1</sup>

(1. 新乡市疾病预防控制中心, 河南 新乡 453002;

2. 河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州 450016)

**摘要:**目的 了解新乡市规模化奶牛养殖场生乳中菌落总数、金黄色葡萄球菌和 $\beta$ -内酰胺酶的基线数据, 为生乳安全性风险评估及国家标准更新提供资料。方法 以新乡市3家规模化奶牛养殖场(A、B、C场)为观测基地, 2016年5月—2017年4月每月采集2家生乳样品各29份和1份混合样品。分别按照GB 4789.2—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》和GB 4789.10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》测定菌落总数和金黄色葡萄球菌, 胶体金法测 $\beta$ -内酰胺酶残留。结果 3家奶牛养殖场单份样品菌落总数的中位数分别为13 000、4 450、130 000 CFU/ml, 明显低于GB 19301—2010《食品安全国家标准 生乳》中的限量( $2 \times 10^6$  CFU/ml), 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 3家奶牛养殖场的菌落总数之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各奶牛养殖场单份样品的菌落总数与混合样品比较, 仅B场差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。7~8月菌落总数较高。3家奶牛养殖场样品中金黄色葡萄球菌检出率分别为1.1% (4/360)、16.7% (30/180)和0.0% (0/180), 计数结果为50~42 000 CFU/ml。3家奶牛养殖场的所有样品中均检出 $\beta$ -内酰胺酶, 检出率为6.1%~10.6%。结论 GB 19301—2010生乳菌落总数限量远高于新乡市实际情况, 建议修订标准; 个别奶牛养殖场生乳中存在一定程度的金黄色葡萄球菌污染, 需加强监管; 筛查出的 $\beta$ -内酰胺酶需进一步鉴定其来源, 同时要加强对 $\beta$ -内酰胺酶检测方法的研究。

**关键词:**生乳; 菌落总数; 金黄色葡萄球菌;  $\beta$ -内酰胺酶; 食源性致病菌; 食品卫生; 标准限量值; 食品安全标准

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)05-0596-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.05.016

### Investigation of aerobic plate count, *Staphylococcus aureus* and $\beta$ -lactamas in raw milk in Xinxiang City

MA Jian-min<sup>1</sup>, SHI Xiao-juan<sup>1</sup>, QIU Zheng-yong<sup>2</sup>, WEI Hong-xia<sup>1</sup>,

WANG Wei-li<sup>1</sup>, LUAN Xu-bo<sup>1</sup>, LI Jia-ke<sup>1</sup>

(1. Xinxiang Center for Disease Control and Prevention, Henan Xinxiang 453002, China;

2. Henan Center for Disease Control and Prevention, Henan Zhengzhou 450016, China)

**Abstract: Objective** To investigate the current situation of aerobic plate count, *Staphylococcus aureus* and  $\beta$ -lactamas in raw milk in Xinxiang. **Methods** Twenty-nine samples and 1 mixed sample of raw milk from 2 of 3 large-scale dairy farms were separately collected once a month lasting for a year. The aerobic plate count and *S. aureus* were determined according to the current national food safety standard, meanwhile  $\beta$ -lactamas was identified by colloidal gold method. **Results** The median of aerobic plate count (CFU/ml) of raw milk from 3 farms was 13 000, 4 450 and 130 000 respectively, all significantly lower than the limit of  $2 \times 10^6$  CFU/ml in GB 19301-2010 ( $P < 0.01$ ). Significant difference existed between the 3 farms ( $P < 0.05$ ). When comparing with the mixed sample, the significant difference was only found in one farm ( $P < 0.05$ ). The aerobic plate count changed seasonally which was higher in July and August. *S. aureus* contamination rates of the 3 farms were 1.1% (4/360), 16.7% (30/180) and 0.0% (0/180), respectively, with the range of 50-42 000 CFU/ml.  $\beta$ -lactamas could be detected in raw milk from all three farms, and the positive rate was 6.1%-10.6%. **Conclusion** The limit of aerobic plate count of raw milk in GB 19301-2010 was much higher than the actual level in Xinxiang. It is recommended to revise the standard limit value. There was a certain degree of *S. aureus* contamination in raw milk in one of the farms, and supervision should be strengthened. Furthermore, identification of the source of  $\beta$ -lactamas was needed, the research on the detection method of  $\beta$ -lactamase should also be strengthened.

**Key words:** Raw milk; aerobic plate count; *Staphylococcus aureus*;  $\beta$ -lactama; foodborne pathogens; food hygiene; standard limited value; food safety standards

近些年,生乳质量一直是我国媒体及消费者关注的热点。目前,我国生乳执行 GB 19301—2010《食品安全国家标准 生乳》<sup>[1]</sup>,其中,规定生乳中菌落总数 $\leq 2 \times 10^6$  CFU/ml,这与美国、欧盟国家 $\leq 10^5$  CFU/ml的标准差距甚大,因此,该国标被认为只是一个应急标准<sup>[2]</sup>,未进行修订的重要原因之一是缺乏足够的基础数据。

生乳中菌落总数反映卫生状况,而有无致病菌污染及污染程度则反映其致病状况。容易造成生乳污染且危害性较高的致病菌是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),牛乳腺炎、操作人员及器具都是潜在的金黄色葡萄球菌污染来源<sup>[3]</sup>。据报道<sup>[4]</sup>,美国加州生乳中金黄色葡萄球菌阳性率为25.3%;上海市、甘肃省生乳中金黄色葡萄球菌的阳性率分别为72.0%和30.5%<sup>[5-6]</sup>,我国21个省/直辖市的监测结果为21.94%<sup>[7]</sup>。暴露风险评估常以金黄色葡萄球菌的产毒素阈值(菌量 $10^5$  CFU/ml)评估风险大小<sup>[4,8-9]</sup>,故生乳中金黄色葡萄球菌的限量是一项关键指标。

β-内酰胺酶类抗生素能有效抑制金黄色葡萄球菌等致病菌,但其滥用导致耐药菌增多,政府明确规定:生乳中抗生素超标者不得出售<sup>[10]</sup>。为掩盖事实,市场上出现了在牛乳中添加β-内酰胺酶以降解β-内酰胺类抗生素,该行为助长抗生素的滥用,且目前该添加剂的安全性风险未知,因此,2009年政府公布的《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》<sup>[11]</sup>将β-内酰胺酶列入其中,并在《全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治近期工作重点及要求》的通知(卫监督发[2009]21号)<sup>[12]</sup>中明确指出“添加β-内酰胺酶(等)非食品用物质属违法行为。”

近些年,新乡市存栏上百头的规模化奶牛养殖场增多,且有不断扩大的趋势,这为标准化管理提供了契机,但关于生乳质量的数据至今尚未见报道。为此,本研究就菌落总数、金黄色葡萄球菌定量、β-内酰胺酶等3项指标对新乡市3家规模化奶牛养殖场的生乳连续取样调查,旨在了解新乡市生乳质量,为全省乃至全国生乳安全性风险评估及国家标准的更新提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

选择新乡市卫辉市A奶牛养殖场、卫滨区B奶牛养殖场和新乡县C奶牛养殖场,三者的乳牛存栏数量分别为400、200和600头,其中C场使用全自

动化机械挤奶,其余使用半自动化。于2016年5月—2017年4月每月采集一次样品。每个奶牛养殖场选择健康乳牛29头,使用采奶设备采集中段生乳约100 ml,每头牛采集的生乳作为一个样品,每个奶牛养殖场每月采集30份生乳样品,其中包括一份混合生乳样品。采样后冷藏运输,2 h内完成菌落总数及金黄色葡萄球菌的样品处理和接种,8 h内完成β-内酰胺酶检验。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

恒温培养箱,干式恒温器,菌落计数仪。平板计数琼脂(北京陆桥技术股份有限公司),血平板、Baird-Parker琼脂平板均购自郑州博赛生物技术股份有限公司,兔血浆(美国BD),β-内酰胺酶快速检测卡(北京维德维康生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

菌落总数测定依据 GB 4789.2—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》<sup>[13]</sup>;金黄色葡萄球菌检验依据 GB 4789.10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》<sup>[14]</sup>;胶体金法测β-内酰胺酶,按产品说明书操作。

### 1.3 统计学分析

使用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 菌落总数

不同奶牛养殖场单份生乳样品的菌落总数有明显差别。B场的菌落总数最低,中位数为4 450 CFU/ml,其次为A场,中位数为13 000 CFU/ml,最高是C场130 000 CFU/ml,但均远低于GB 19301—2010中的限量标准( $2 \times 10^6$  CFU/ml),差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),3家奶牛养殖场的菌落总数差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表1,表明3家奶牛养殖场对挤奶过程的管理控制严格程度不一。

C场使用全自动机械化设备挤奶,菌落总数反而最高。为了解设备内部的卫生状况,本研究在C场使用采奶器采样前利用无菌瓶人工采集生乳20份(其他条件不变),其菌落总数与机械采集的样品菌落总数相差较为明显(见表2),表明C场未严格按规范清洗管道,其设备内部携带的细菌是该场生乳中菌落总数的主要来源。

B场单份样品的菌落总数与混合样品的菌落总数(11 000 ~ 560 000 CFU/ml)比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其余奶牛养殖场单份样品的菌

表1 新乡市不同奶牛养殖场月份采样生乳中  
月平均菌落总数( $\bar{x} \pm s$ , CFU/ml)

Table 1 Average aerobic plate count per month in individual  
samples of different dairy farms in Xinxiang

时间	A场	B场	C场
1月	8.89 ± 1.13*	—	11.29 ± 1.05*
2月	8.68 ± 0.96*	—	12.03 ± 0.89*
3月	8.11 ± 1.14*	—	10.91 ± 1.02*
4月	8.48 ± 1.06*	—	12.08 ± 0.86*
5月	9.16 ± 1.37*	7.20 ± 1.18*	—
6月	9.18 ± 1.03*	8.61 ± 1.48*	—
7月	10.08 ± 0.83*	8.67 ± 0.71*	—
8月	10.41 ± 0.86*	10.60 ± 1.03*	—
9月	9.62 ± 1.48*	8.27 ± 2.00*	—
10月	9.84 ± 0.98*	7.19 ± 1.31*	—
11月	9.35 ± 0.95*	—	13.19 ± 1.10* <sup>§</sup>
12月	8.91 ± 1.12*	—	11.34 ± 1.19*
合计	9.67 ± 1.90* <sup>#</sup>	8.42 ± 1.17* <sup>#</sup>	11.81 ± 1.27* <sup>#</sup>

注:表格中为数据经过对数转换后计算的平均值;—表示无此数据,5~10月采集的为B场,11月份起至次年4月份更换为C场;\*表示与国标值的对数 $\ln 2000000$ 比较, $P < 0.01$ ;<sup>#</sup>表示A、B、C场的菌落总数经两两比较, $P < 0.01$ ;<sup>§</sup>表示C场11月份的菌落数与其他月份的菌落数比较, $P < 0.01$

表2 C场人工无菌采集与设备采集的生乳中菌落  
总数比较(CFU/ml)

Table 2 Comparison of aerobic plate count in raw milk between  
artificially collecting method and equipment in C farm

序号	人工采集	设备采集	序号	人工采集	设备采集
1	$1.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^5$	11	$2.2 \times 10^2$	$4.8 \times 10^5$
2	$1.0 \times 10^2$	$3.4 \times 10^5$	12	$1.8 \times 10^3$	$7.1 \times 10^5$
3	<1	$1.3 \times 10^5$	13	$1.0 \times 10^2$	$5.6 \times 10^4$
4	$2.5 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$	14	<1	$5.8 \times 10^4$
5	$2.0 \times 10^2$	$1.2 \times 10^5$	15	$1.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^5$
6	<1	$7.3 \times 10^4$	16	<1	$5.6 \times 10^4$
7	$4.0 \times 10^2$	$1.4 \times 10^5$	17	$3.1 \times 10^2$	$1.9 \times 10^5$
8	$4.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^5$	18	<1	$1.7 \times 10^5$
9	<1	$5.1 \times 10^5$	19	$1.0 \times 10^2$	$6.7 \times 10^5$
10	<1	$1.1 \times 10^5$	20	$2.0 \times 10^2$	$9.4 \times 10^4$

表3 新乡市不同奶场生乳中金黄色葡萄球菌污染情况

Table 3 Contamination of *S. aureus* from raw milk in different dairy farms in Xinxiang

奶牛养殖场	检测样品份数	10~99 CFU/ml		100~999 CFU/ml		1 000~9 999 CFU/ml		10 000~50 000 CFU/ml	
		检出份数	占比/%	检出份数	占比/%	检出份数	占比/%	检出份数	占比/%
A	360	2	0.6	2	0.6	0	0.0	0	0.0
B	180	6	3.3	15	8.3	7	3.9	2	1.1
C	180	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

### 2.3 $\beta$ -内酰胺酶的检测

$\beta$ -内酰胺酶在3个奶牛养殖场的生乳样品中均有检出。其中,A场检出22份,检出率为6.1%(22/360);B场检出19份,检出率为10.6%(19/180);C场检出14份,检出率为7.8%(14/180)。

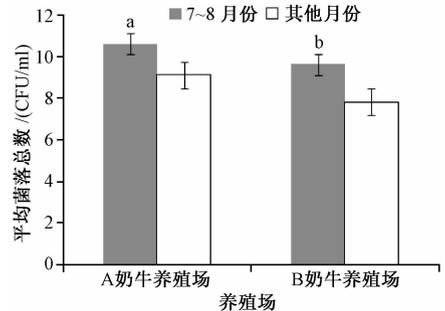
## 3 讨论

### 3.1 菌落总数

菌落总数是指示奶牛养殖场卫生状况以及操

落总数与混合样品的菌落总数比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。但B场的菌落总数最低,表明B场对采奶过程控制较严,但从输奶管到储奶罐的这一环节可能存在污染。

新乡市生乳中的菌落总数呈现季节性变化。A场和B场的数据显示,7~8月份生乳菌落总数较其他季节高(见图1)。因C场为冬春季采样,未发现菌落总数与季节变化的关系;但该奶牛养殖场11月份的菌落总数最高,之后明显下降(见表1),可能是由于初次采样时使用的采样瓶未经严格消毒。



注:图中平均菌落总数为数据经过对数转换后计算的平均值;a表示与其他月份比较, $P < 0.05$ ;b表示与其他月份比较, $P < 0.01$

图1 新乡市奶牛养殖场生乳中菌落总数的季节差异

Figure 1 Seasonal difference of aerobic plate  
count in raw milk in Xinxiang

### 2.2 金黄色葡萄球菌计数结果

不同奶牛养殖场检出金黄色葡萄球菌的情况差别较大。A场全年仅在5月和7月检出4份,检出率为1.1%(4/360),结果为50~450 CFU/ml,混合样品未检出。B场5~10月共检出30份(9月份未检出),检出率为16.7%(30/180),计数结果为50~42 000 CFU/ml,其中4份为混合样品。C场未检出金黄色葡萄球菌,具体结果见表3。

作规范的重要指标。本研究中的3家奶牛养殖场全部使用机械化挤奶,牧场条件及管理水平也在不断改善,生乳中菌落总数均远低于GB 19301—2010《食品安全国家标准 生乳》<sup>[1]</sup>,表明 $2 \times 10^6$  CFU/ml的限量过高,与新乡市实际情况不符,故希望该标准能够重新调整,提高生乳收购质量。值得注意的是,C场样品的菌落总数高于美国、欧盟等国家标准<sup>[15-16]</sup>,表明新乡市生乳质量仍有待提高。本研究结果初步显示,挤奶设备内部的洁净程度是影响生

乳菌落数量的关键因素之一,因此,奶牛养殖场必须要重视和加强设备的冲洗环节,特别是7~8月份,防止细菌滋生。

### 3.2 金黄色葡萄球菌

3家奶牛养殖场金黄色葡萄球菌的检出率均低于美国加州及我国上海、甘肃等地的调查结果<sup>[5-6]</sup>,菌落计数结果均未超过 $10^5$  CFU/ml。研究<sup>[9,13]</sup>表明,生乳中金黄色葡萄球菌初始污染水平是引起风险的最重要因素,一般认为其污染菌量达到 $10^5$  CFU/ml时,产生的肠毒素可引起食物中毒<sup>[9,17]</sup>。但限于目前国内外尚无成熟的方法对肠毒素进行定量检测,金黄色葡萄球菌食物中毒尚缺乏确切的毒素含量数据,因此上述问题不能忽视,特别是B场,连续多月检出金黄色葡萄球菌,可能奶牛患乳房炎的情况较多,且未得到及时隔离治疗,存在奶牛间相互传染;或者有设备、环境和人员携带病原菌污染的情况。由于诸多方面的原因,此推测尚待进一步的检验,今后应该加强监管部门与检测部门的沟通协调,以便实行科学有效的指导和监管。

### 3.3 β-内酰胺酶

目前,国内外对生乳中β-内酰胺酶检测方法的研究还处于初期阶段,不同的方法各有利弊<sup>[18]</sup>,至今还没有一套准确、切实可行的标准方法。本研究使用的胶体金法利用β-内酰胺酶可分解生乳中的β-内酰胺类抗生素原理,通过测定被β-内酰胺酶降解后的β-内酰胺类抗生素的残留量,判定生乳中是否存在β-内酰胺酶,操作简单、省时,适用于本次大量样品的筛查。结果显示,3家奶牛养殖场生乳样品中均检出β-内酰胺酶,筛查阳性率为6.1%~10.6%。很多微生物可以产生β-内酰胺酶<sup>[19]</sup>,但崔生辉等<sup>[20]</sup>提出,基于目前已有的知识,应认为牛奶中检出的β-内酰胺酶属人为添加。本研究现场采样不存在外源添加的情况,新乡市生乳中β-内酰胺酶的来源有待进一步研究。使用科学有效的检测方法对于区分内源和外源性β-内酰胺酶至关重要,国家食品安全监管部门应尽快研究并制定出一套灵敏、便于操作的检测方法。

### 参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 生乳: GB 19301—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[2] 谢燕青, 全逸先. 菌落总数“200万”真相还原[J]. 中国卫生标准管理, 2010, 1(3): 21-22.

[3] LE L Y, BARON F, GAUTIER M. *Staphylococcus aureus* and food

poisoning[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2003, 2(1): 63-76.

[4] HEIDINGER J C, WINTER C K, CULLOR J S. Quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus enterotoxin A* in raw milk[J]. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(8): 1641-1653.

[5] 胡晓宁, 苏诚玉, 权玉玲, 等. 甘肃省生鲜乳中金黄色葡萄球菌及肠毒素污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4): 984-985, 989.

[6] 刘弘, 顾其芳, 吴春峰, 等. 生乳中金黄色葡萄球菌污染半定量风险评估研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(4): 293-296.

[7] 闫军, 遇晓杰, 苏华, 等. 原料乳中金黄色葡萄球菌风险评估基础研究[J]. 中国公共卫生管理, 2010, 26(1): 39-40.

[8] BARKER G C, GOMÉZ-TOMÉ N. A risk assessment model for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk: a potential route to source-level inference[J]. *Risk Analysis*, 2013, 33(2): 249-269.

[9] 遇晓杰, 闫军, 苏华, 等. 原料乳中金黄色葡萄球菌的风险评估及防控策略的建立[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(9): 53-58.

[10] 孟静, 吴裕健. 生乳中β-内酰胺酶对抗生素检测的影响[J]. 中国乳业, 2010(12): 38-40.

[11] 中华人民共和国中央人民政府. 卫生部关于印发《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》的通知: 食品整治办[2009]5号[A/OL]. (2009-02-04) [2017-05-31]. [http://www.gov.cn/gzdt/2009-02/07/content\\_1223971.htm](http://www.gov.cn/gzdt/2009-02/07/content_1223971.htm).

[12] 国家食品药品监督管理局. 关于印发《全国打击违法添加非食用物质和滥用食品添加剂专项整治近期工作重点及要求》的通知: 卫监督发[2009]21号[A/OL]. (2009-03-06) [2017-05-31]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0056/38681.html>.

[13] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[14] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验: GB 4789.10—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[15] U. S. Department of health and human services public health service, food and drug administration-section 7 grade A pasteurized milk ordinance[S]. 2007.

[16] 王海, 沈秋光, 邹明晖, 等. 各国乳品的生乳标准分析对比[J]. 乳业科学与技术, 2011, 34(6): 293-295.

[17] LINDQVIST R, SYLVÉN S, VÅGSHOLM I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(1): 155-170.

[18] 沈焱, 刘洋, 李兆阶. 乳与乳制品中β-内酰胺酶的研究进展和标准化现状[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(11): 35-38.

[19] SAMAHA-KFOURY J N, ARAJ G F. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases[J]. *British Medical Journal*, 2003, 327(7425): 1209-1213.

[20] 崔生辉, 李景云, 马越, 等. “生鲜牛乳抗生素分解剂”的鉴定与检测[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(2): 113-116.