

调查研究

保健食品中检出蜡样芽孢杆菌的情况分析

黄结,黄橘

(广西壮族自治区食品药品检验所,广西 南宁 530021)

摘要:目的 了解保健食品的卫生状况。方法 依照国家标准 GB/T 4789.14—2003 和进出口商品检验行业标准 SN 0176—92,对市场随机抽检的 12 个品种 225 批保健食品检出的芽孢杆菌采用全自动微生物分析系统仪进行鉴定研究。结果 确认有 12 批保健食品被检出蜡样芽孢杆菌,其中检出率较高的有螺旋藻片和钙片,检出率分别为 60.0% 和 21.1%。结论 分析结果可为保健食品的生产、消毒灭菌、卫生学检验标准及监督管理等方面提供参考。

关键词:保健食品;蜡样芽孢杆菌;全自动微生物分析系统仪

中图分类号:R378 文献标识码:C 文章编号:1004-8456(2012)02-0173-04

Analysis on the detected *Bacillus cereus* in health foods

Huang Jie, Huang Ju

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Guangxi Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the hygienic status of health foods in markets. **Methods** Referencing to National Standard GB/T 4789.14—2003 and Industry Standard SN 0176—92, *Bacillus cereus* was detected by automated microbial analysis system for samples selected from 225 batches of 12 varieties of health foods on markets. **Results** *Bacillus cereus* was confirmed in 12 batches of health foods. There was a higher rate of contamination for spiraling tablets (60.0%) and calcium tablets (21.1%). **Conclusion** The results would provide references for health foods production, processing, sterilization, the standards for hygienic examination and inspective administration.

Key words: Health foods; *Bacillus cereus*; automated microbial analysis system

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)属芽孢杆菌属,是兼性好氧菌,广泛存在于土壤、水和尘埃中,海洋中也有蜡样芽孢杆菌的存在^[1],也常见于植物性食品和许多生熟食品中,是一种条件致病菌。最低生长温度为 4~5℃,最高生长温度为 48~50℃^[2],可以生长的 pH 值为 2~11,其中 pH4.3~9.3 时迅速繁殖^[3]。其孢子具有典型的耐热性。蜡样芽孢杆菌可引起胃肠道外感染及胃肠道感染。胃肠道外感染主要以感染为主,可导致支气管炎、脑膜炎、骨髓炎及菌血症。胃肠道感染主要以肠毒素为主,肠毒素有腹泻毒素和呕吐毒素,致腹泻的肠毒素能使小白鼠致死。当摄入食品中蜡样芽孢杆菌数量 >10⁵ CFU/g(ml)时可引起食物中毒。

由蜡样芽孢杆菌污染食品而引起腹泻的报道越来越多^[3],但有关蜡样芽孢杆菌污染保健食品的报道较少。因此,对在保健食品中检出的蜡样芽孢杆菌进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器

ESCO 生物安全柜、OLYMPUS BX51 显微镜、BD (E2)240 电热恒温培养箱。VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统仪和 VITEK 2 芽孢菌鉴定卡(BCL)(法国生物酶里埃公司)。

1.2 材料

营养琼脂。甘露醇卵黄多黏菌素琼脂 MYP、蜡样芽孢杆菌显色培养基、血琼脂平板、蜡样芽孢杆菌生化鉴定盒(广东环凯微生物科技有限公司)。革兰氏染液试剂盒。

1.3 标准菌株

蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) [CMCC 63301] (中国医学菌种保藏中心)。

1.4 样品来源

市场随机抽样 225 批保健食品。功能型的保健食品有:阿胶、人参蜂皇浆、芦荟、大豆磷脂、螺旋藻、虫草菌丝体、减肥(茶)胶囊、褪黑素;营养型的有:鱼油、维生素、钙、氨基酸。它们来自广东、福建、广西、江西、河南、北京、上海等不同产地。

1.5 方法

以无菌操作称取保健食品 25 g (ml),加入

收稿日期:2011-08-25

作者简介:黄结 女 主管技师 研究方向为食品药品微生物学

E-mail:huangjie1055@163.com

225 ml葡萄糖肉浸液肉汤,用均质器拍打,36 °C 培养 24 h,划线接种于血琼脂平板上 36 °C 培养 24 h,按 GB/T 4789. 11—2003《溶血性链球菌检验方法》检测保健食品中蜡样芽孢杆菌。挑选有溶血环并革兰氏染色镜检为阳性芽孢杆菌的菌株,划线于 MYP 培养基和显色培养基上 36 °C 培养 20 h,挑取可疑蜡样芽孢杆菌的菌落接种于营养琼脂平板 36 °C 纯培养 24 h,使用 BCL 检测卡,用全自动微生物分析系统仪进行细菌快速鉴定。接着依据 SN 0176—92《出口食品中蜡样芽孢杆菌检验方法》进行 3 个全自动微生物分析系统仪的补充试验(动力试验、根状生长试验、蛋白质结晶毒素试验),进一步确认蜡样芽孢杆菌。然后将确认好的蜡样芽孢杆菌再依据 GB/T 4789. 14—2003《食品卫生微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验》进行生化分型试验(柠檬酸盐利用、硝酸盐还原、淀粉水解、V-P 反应、明胶液化)。

2 结果与分析

2.1 菌体形态与染色

经过初检,获得革兰氏阳性芽孢杆菌,挑取菌落用血琼脂平板、甘露醇卵黄多黏菌素琼脂 MYP、蜡样芽孢杆菌显色培养基进行分离培养。结果观察,12 株菌株均与标准菌株有相似特征。菌落特征见图 1 至图 4,从图 1 中可以看到菌体均为杆状,呈链状排列或散列,每个菌体均有一个明显的芽孢,芽孢成椭圆形,位于菌体中央或稍偏于一端,不突出菌体,菌体不膨大。从图 2 中可以看到菌落周围均呈现 β 型完全溶血的溶血环。从图 3 中可以看到在 MYP 琼脂平板上菌落均为粉红色(表示菌株不发酵甘露醇),菌落均环绕有沉淀环(表示菌株有卵磷脂酶产生,可分解卵磷脂)。从图 4 中可以看到在蜡样芽孢杆菌显色培养基上均呈绿/蓝绿色菌落。均呈现为蜡样芽孢杆菌的典型特征。



图 1 菌体及芽孢形态观察(1000 ×)
Figure 1 Bacteria body and endospore

2.2 芽孢菌的全自动微生物分析系统仪鉴定

从纯培养中得到的 12 株可疑蜡样芽孢杆菌,分别记为 Y1 藻、Y2 藻、Y3 藻、Y4 钙、Y5 钙、Y6 钙、Y7 钙、Y8、Y9、Y10、Y11、Y12,并以标准菌种 *B. cereus* [CMCC 63301](记为 S)作为对照。结果见表 1。

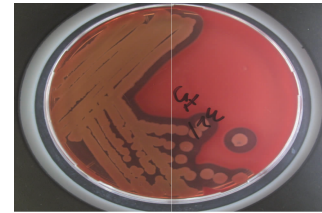


图 2 血琼脂培养菌落观察
Figure 2 Blood agar colonies

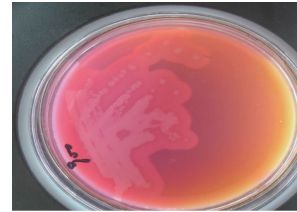


图 3 MYP 培养菌落观察
Figure 3 MYP training colonies

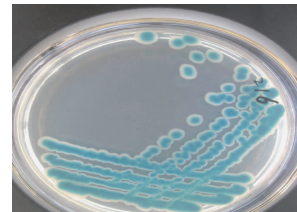


图 4 显色培养基菌落观察
Figure 4 Chromogenic media colonies

将 12 株菌株和标准菌种 S 进行比较发现,没有一个是和 S 完全相同的。LeuA(亮氨酸芳胺酶)、PheA(苯丙氨酸芳胺酶)、AlaA(丙氨酸芳胺酶)、TyrA(酪氨酸芳胺酶)、GlyA(氨基酸芳胺酶)、KAN(卡那霉素耐受)、TTZ(多粘菌素 B 耐药)等 7 个生化指标存在差异最多,而 BNAG(N-乙酰- β -D-葡萄糖氨酶)和 ESC(七叶灵水解)2 个生化指标跟 S 比较却完全相反。因此采用全自动微生物分析系统仪鉴定,同样鉴定为蜡样芽孢杆菌,但个别生化反应结果却不同。表 1 显示相同品种(螺旋藻片或钙片)中污染的蜡样芽孢杆菌,或者同一生产厂家(Y2 藻、Y8 和 Y9 来自同一厂家,Y11 和 Y12 来自同一厂家)不同产品中污染的蜡样芽孢杆菌,个别生化反应也存在差异。

2.3 全自动微生物分析系统仪的补充试验

2.3.1 MOB(动力)试验

12 株蜡样芽孢杆菌和标准菌株的菌体均有不规则运动,而且运动均极为活跃。

2.3.2 根状生长试验

在营养琼脂平板上的菌落无根状生长现象,见图 5。证实并非覃状芽孢杆菌(*B. mycoides*)。

2.3.3 毒素晶体存在试验

菌体旁均无染成黑色或深色的菱形毒素结晶体,证实并非苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)。

表1 保健食品中芽孢杆菌的 BCL 鉴定结果

Table 1 BCL identification results of *Bacillus* in health foods

菌株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	BXYL	LysA	AspA	LeuA	PheA	ProA	BGAL	PyrA	AGAL	AlaA	TyrA	BNAG	APPA	CDEX	dGAL	GLYG	INO	MdG	ELLM	MdX	AMAN	MTE	GlyA	dMAN	
Y1 藻	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Y2 藻	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Y3 藻	-	-	-	+	(+)	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Y4 钙	-	-	-	(-)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Y5 钙	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Y6 钙	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(-)	-
Y7 钙	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Y8	-	-	-	(-)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Y9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Y10	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Y11	-	-	-	+	+	-	-	+	-	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Y12	-	-	-	(+)	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S	-	-	-	+	(-)	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

菌株	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	鉴定菌名	
	dMNE	dMLZ	NAG	PLE	IRHA	BGLU	BMAN	PHC	PVATE	AGLU	dTAG	dTRE	INU	dGLU	dRIB	PSCNa	NaCl 6.5%	KAN	OLD	ESC	TTZ	POLYB-R		
Y1 藻	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	95% <i>B. cereus</i>
Y2 藻	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	99% <i>B. cereus</i>
Y3 藻	-	-	+	-	-	+	-	-	+	(-)	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	95% <i>B. cereus</i>
Y4 钙	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	95% <i>B. cereus</i>
Y5 钙	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	95% <i>B. cereus</i>
Y6 钙	-	-	(-)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	(+)	+	+	88% <i>B. cereus</i>
Y7 钙	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	(-)	+	+	88% <i>B. cereus</i>
Y8	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	88% <i>B. cereus</i>
Y9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	88% <i>B. cereus</i>
Y10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	95% <i>B. cereus</i>
Y11	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	95% <i>B. cereus</i>
Y12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(-)	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	95% <i>B. cereus</i>
S	-	-	+	-	-	-	-	-	+	(-)	-	+	-	+	+	-	+	-	-	(-)	-	+	+	95% <i>B. cereus</i>

注: + 为阳性; (+) 为弱阳性; - 为阴性; (-) 为弱阴性。BXYL:β-木糖苷酶;LysA:L-赖氨酸芳胺酶;AspA:L-天冬氨酸芳胺酶;LeuA:亮氨酸芳胺酶;PheA:苯丙氨酸芳胺酶;ProA:脯氨酸芳胺酶;BGAL:β-半乳糖苷酶;PyrA:吡咯烷基芳胺酶;AGAL:α-半乳糖苷酶;AlaA:丙氨酸芳胺酶;TyrA:酪氨酸芳胺酶;BNAG:N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶;APPA:丙氨酸-茶丙氨酸-脯氨酸芳胺酶;CDEX:CYCLODEXTRINE;dGAL:D-半乳糖;GLYG:糖元;INO:肌醇;MdG:甲基葡萄糖苷;ELLM:ELLMAN;MdX:甲基-D-木糖苷;AMAN:α-甘露糖苷酶;MTE:麦芽三糖;GlyA:氨基葡萄糖酶;dMAN:D-甘露醇;dMNE:D-甘露糖;dMLZ:D-松三糖;NAG:N-乙酰-D-葡萄糖胺;PLE:古老糖;IRHA:L-鼠李糖;BGLU:β-葡萄糖苷酶;BMAN:β-甘露糖苷酶;PHC:磷酸基维生素 B;PVATE:丙酮酸盐;AGLU:α-葡萄糖苷酶;dTAG:D-塔格糖;dTRE:D-海藻糖;INU:菊粉;dGLU:D-葡萄糖;dRIB:D-核糖;PSCNa:腐胺同化;NaCl6.5%:6.5%氯化钠生长;KAN:卡那霉素耐受;OLD:竹桃霉素耐受;ESC:七叶灵水解;TTZ:多粘菌素 B 耐药;POLYB-R:多粘菌素 B 耐受。



图5 营养琼脂菌落观察
Figure 5 Colonies on nutrient agar

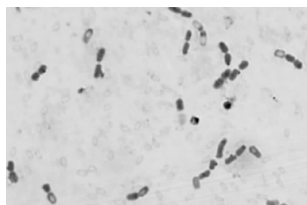


图6 毒素晶体观察
Figure 6 Toxin crystals

表2 保健食品中蜡样芽孢杆菌的生化分型结果

Table 2 Biochemical typing results of *Bacillus*

cereus in health foods

菌株	生化试验					型别
	柠檬酸盐利用	硝酸盐还原	淀粉水解	V-P 反应	明胶液化	
Y1 藻	-	+	+	+	+	2
Y2 藻	+	+	+	+	+	1
Y3 藻	+	+	-	-	+	12
Y4 钙	-	+	+	+	+	2
Y5 钙	-	+	+	+	+	2
Y6 钙	-	+	+	-	+	10
Y7 钙	-	+	+	-	+	10
Y8	-	-	-	-	+	无
Y9	-	+	+	-	+	10
Y10	-	-	+	+	+	4
Y11	+	+	+	+	+	1
Y12	-	+	+	+	+	2
S	-	+	+	-	+	10

注: + 为阳性; - 为阴性。

一是某种原料被该菌污染;二是产品生产加工的某个环节被污染;三是产品消毒灭菌不彻底,未进行卫生学把关就投放市场。以这次蜡样芽孢杆菌检出率最高的螺旋藻片和钙片为例,其共同点就是原料来自海或湖水生物。螺旋藻片主要原料是螺旋藻,螺旋藻是生长于海水或湖泊中的绿色水生藻类植物;而某些钙片的原料取自珍珠粉和贝壳,珍珠

2.4 生化分型试验

生化分型试验结果见表2。

3 讨论

蜡样芽孢杆菌检出率为5.3%(12/225);其中不同品牌的螺旋藻片共5批,有3批检出蜡样芽孢杆菌;不同品牌的钙片共19批,有4批检出蜡样芽孢杆菌。

保健食品被蜡样芽孢杆菌污染有3方面原因:

和贝壳也生长于海水或湖泊中。蜡样芽孢杆菌在土壤、水、尘埃、空气和海洋中均有分布。所以,该芽孢菌很可能是从被污染的原料中带来。在产品生产加工(灌装包装等)环节中如存在不规范的卫生操作,就可能从操作人员、空气、尘埃、器具等方面污染该芽孢菌。污染有该芽孢菌的成品若未经过有效地消毒灭菌,就会携带该芽孢菌进入市场,威胁人们的健康。因此,使用卫生指标合格的原料,加强生产加工环节的卫生管理以及选用适宜的消毒灭菌方法,是把住产品卫生质量关的重要环节。

蜡样芽孢杆菌属芽孢杆菌属,具有抗热、抗辐射、抗静水压和抗化学药物等能力,是一种难以杀灭的芽孢菌^[4]。75%酒精无法杀死芽孢细菌。湿热灭菌121℃ 30 min 或干热灭菌120℃ 60 min 方能完全杀灭蜡样芽孢杆菌。也有报道说用0.3%过氧乙酸溶液或750 mg/L的二氧化氯溶液能杀灭蜡样芽孢杆菌^[5],在5 mg/ml壳聚糖、0.02 mg/ml乳酸链球菌素、0.01 mg/ml聚赖氨酸组合条件下对蜡样芽孢杆菌杀菌率达83.85%^[6]。在保健食品灭菌中要考虑灭菌方法是否会带有灭菌有害物质残留,或保健食品的功效成分变性失效等问题。因此,有必要加强对保健食品中蜡样芽孢杆菌的控制及灭菌方法方面的研究。

蜡样芽孢杆菌是一种条件致病菌,在一定条件下才会引起中毒,菌量、毒力、摄入量及每个人的体质等都与能否引起中毒有着密切关系^[7]。各国对蜡样芽孢杆菌在食品中的残留限量都有明确规定,大多以 10^3 CFU/g(ml)为临界值,而我国相关食品的标准中没有明确蜡样芽孢杆菌的残留限量值,对该菌的要求大多是按照进食污染菌量 $>10^5$ CFU/g

(ml)的食物时,就可能发生食物中毒的标准进行检验控制^[8]。这次只对保健食品中污染的蜡样芽孢杆菌做了定性检测,没有检测染菌量。所以无法知道染菌量是否达到引起食物中毒的程度。然而,就算染菌量较低,若该食物保存温度不当,放置时间较长,蜡样芽孢杆菌也会大量繁殖,毒素量不断增高,导致中毒。而且在这批检出的保健食品中有一批是孕妇钙片(Y6钙),其存在的危害不容忽视。因此,建议国家在保健食品卫生学标准修订时,增加蜡样芽孢杆菌的限定标准,将蜡样芽孢杆菌列为保健食品的卫生指标菌。

志谢:感谢石瑞棉老师对该试验的指导。

参考文献

- [1] 袁茵,鲁欣.具细菌群体感应抑制活性海洋细菌的筛选鉴定[J].生物技术,2006,16(4):30-33.
- [2] 张金兰,鲁绯,张伟伟,等.腐乳中蜡样芽孢杆菌污染情况的调查分析[J].中国酿造,2010(10):15-18.
- [3] 张伟伟,鲁绯,张金兰,等.食品中蜡样芽孢杆菌的研究进展[J].中国酿造,2010(5):1-4.
- [4] 黄训端,潘见,余晓峰,等.草莓中蜡样芽孢杆菌的VITEK快速检测[J].微生物学杂志,2006,26(4):99-102.
- [5] 莫金观,邓金花,黄静.不同消毒剂对蜡样芽孢杆菌的杀灭效果比较[J].中国消毒学杂志,2008,25(6):672-673.
- [6] 黄现青,史苗苗,高晓平,等.3个生物防腐剂抑制蜡样芽孢杆菌的效果研究[J].浙江农业科学,2009(3):535-537.
- [7] PRIEST F G. Products and applications[M]//HARWOOD C R. Biotechnology handbooks. New York: Plenum Press,1989.
- [8] 蔡纪明.常见传染病与急性中毒预防和控制手册[M].北京:北京大学医学出版社,2004.