

GB 4789.28 食品微生物学检验用培养基和试剂中沙门氏菌检验用培养基质控菌株的筛选

陈怡文, 张晓东, 任秀, 余文, 刘娜, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 该研究根据《GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量控制》(以下简称 GB 4789.28-2013) 的检测要求, 从我国菌种库中筛选出 1 株鼠伤寒沙门氏菌可等效于 GB 4789.28-2013 中的标准菌株(ATCC14028), 用于评价培养基的质量。该研究联合 15 家验证机构用 7 株不同分离源的鼠伤寒沙门氏菌, 依据 GB 4789.28-2013 的检验方法验证不同品牌的培养基, 将生长率、选择性与 ATCC41028 一致性最高的菌株选为标准的等效质控菌株。为确保结果的可重复性和一致性, 各实验均采用同品牌同批次的培养基进行验证, 每株菌株均由至少 5 家单位进行验证。综合生长率与选择性的结果, ATCC41028 在各品牌培养基上均可良好生长, CMCC(B)50976 与 ATCC41028 结果的一致性最高, 而 CMCC(B)50976 最难进行培养或分离。同时, 结果显示, 不同品牌、不同人员、不同实验室环境下进行的培养基验证结果均有差异。工作组从 7 株鼠伤寒沙门氏菌中筛选出 CMCC(B)50976 作为 GB 4789.28 的质控菌株, 可等效于国外的标准菌株(ATCC14028), 新菌株更具有代表性, 且减少了国外菌株运输过程中的生物风险。

关键词: GB 4789.28; 培养基; 鼠伤寒沙门氏菌; 检测技术; 食品微生物

文章编号: 1673-9078(2023)11-270-278

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1470

Election of *Salmonella* Quality Control Strains for Testing According to GB 4789.28 Culture Media and Reagents for Food Microbiological Examination

CHEN Yiwen, ZHANG Xiaodong, REN Xiu, YU Wen, LIU Na, CUI Shenghui*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: The quality of culture media for *Salmonella typhimurium* was evaluated according to the testing requirements of “GB 4789.28-2013 National Food Safety Standard Food Microbiological Examination - Quality requirements of culture media and reagents” (GB 4789.28-2013). One strain of *S. typhimurium* equivalent to the ATCC14028 standard strain in GB 4789.28-2013 was selected from the microbial strain bank of China for the evaluation. As well, seven *S. typhimurium* from different sources were used by 15 validation laboratories at various institutions to verify different brands of medium according to the GB 4789.28-2013 protocol. The strain with the highest growth rate, selectivity, and consistency with ATCC41028 was selected as the standard equivalent quality control strain. To ensure repeatability and consistency of results, the same brands and batches of media were used for verification in all experiments, and each strain was verified by at least five labs. Growth rate and selectivity results indicated that ATCC41028 grew well on all brands of media. CMCC(B)50976 was most consistent with

引文格式:

陈怡文, 张晓东, 任秀, 等. GB 4789.28 食品微生物学检验用培养基和试剂中沙门氏菌检验用培养基质控菌株的筛选[J]. 现代食品科技, 2023, 39(11): 270-278

CHEN Yiwen, ZHANG Xiaodong, REN Xiu, et al. Election of *Salmonella* quality control strains for testing according to GB 4789.28 culture media and reagents for food microbiological examination [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 270-278

收稿日期: 2022-11-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1606306)

作者简介: 陈怡文 (1985-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 食品化妆品微生物检验, E-mail: cyw5437@126.com

通讯作者: 崔生辉 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品药品微生物检验, E-mail: cuish@nifdc.org.cn.

ATCC41028, while CMCC(B)50976 was the most difficult to culture or isolate. The results of medium validation varied using different brands, personnel, and laboratory environments. The working group selected *S. typhimurium* strain CMCC(B)50976 as the quality control strain of GB 4789.28, which was equivalent to ATCC14028. The new strain was more representative and reduced the biological risk during transportation of ATCC14028.

Key words: GB 4789.28; culture medium; *Salmonella typhimurium*; testing technique; food microorganisms

非伤寒沙门氏菌是人类胃肠炎最常见的病因之一,在美国和欧洲,沙门氏菌感染疾病占食源性疾病死亡人数的30%以上^[1-3]。食用被沙门氏菌污染的家禽和家禽产品(肉和蛋类)是人类感染沙门氏菌的最常见原因^[4]。一般食品检测沙门氏菌的方法为从非选择性增菌肉汤中进行富集,经过选择性增菌肉汤增菌后,在选择性分离固体平板上进行分离及后续的生化鉴定和血清学分型^[5,6]。培养基的质量对沙门氏菌的检出率有最直接的影响。

培养基是指液体、半固体或固体形式的,含天然或合成成分,用于保证微生物繁殖、鉴定或保持其活力的物质^[7,8]。一般培养基中含有碳源、氮源、无机盐、生长因子和水,这些成分是细菌生长所必需的营养物质^[9,10]。目前市售的培养基由于原材料质量、制作过程的差异,不同品牌、或不同批号培养基的质量均可能存在差异,可能对微生物的生长带来影响,表现为菌落大小、形态、计数等结果的差异^[11-18]。

《GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验培养基和试剂的质量要求》(以下简称 GB 4789.28-2013)中对培养基质量的检测方法进行了明确规定^[16]。该标准中的每一个培养基都规定了检测用质控菌株。但过半数(21/40)质控菌株来自 The Global Bioresource Center(以下简称 ATCC),不利于国内基层实验室和企业使用。首先是无法验证国外菌株的真实性,我国于2021年4月15日颁布了《中华人民共和国生物安全法》,购买进口菌株需要提供实验室资质、使用证明、销毁证明等,很多实验室难以直接进口,只能选择在国内中介网站购买菌株,这种方式很难保证菌株的真实性,无法保证结果的可靠性。其次 ATCC 的菌株不具备本土代表性,培养基的验证主要是观察质控菌株在待测培养基上的生化反应及生长情况能否满足标准要求,不需要使用模式菌株,质控菌株应具有检品和地域特点,即最好使用本国食品或相关环境中分离的常见菌株,如美国 Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media (Third Edition)标准中使用 ATCC 菌株;澳大利亚 Guidelines for Assuring Quality of Food and Water Microbiological Culture Media 标准中使用 NCTC 菌株;ISO 标准 Microbiology of Food, Animal Feed and

Water-Preparation, Production, Storage and Performance Testing of Culture Media 中使用 WDCM 菌株^[19-21]。综上所述,我国国家强制标准应优先选取本国的菌株作为质控菌株。

本文仅以鼠伤寒沙门氏菌为例,对整个菌株筛选过程进行阐述。本次标准修订通过组织 15 家实验室对 7 株鼠伤寒沙门氏菌在不同种类、品牌的培养基上进行验证,筛选出可等效于 ATCC 的菌株。研究中选取的 7 株鼠伤寒沙门氏菌均来源于我国菌种库,分离自我国食品或环境样品。综上所述,本研究旨在通过实验验证筛选出国内具有代表性的菌株等效国外的菌株,从而保证国家强制标准使用菌株的科学性、合理性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备

PL2002 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;SWB25 水浴锅,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;R205050GC 生化培养箱,美国 Thermo 公司;Autoflex II 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱,美国 Bruker 公司;VITEK2 COMPACT 60 自动微生物分析系统,法国梅里埃公司。

1.1.2 实验用标准菌株

本研究用 8 株鼠伤寒沙门氏菌来自中国医学细菌菌种保藏管理中心(CMCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)和美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

表 1 验证用鼠伤寒沙门氏菌菌株信息

Table 1 Information on *Salmonella typhimurium* strains for validation

序号	编号	来源	分离源
1	CMCC(B)50970		食品能力验证考核样品
2	CMCC(B)50975		食品
3	CMCC(B)50976	CMCC	食品
4	CMCC(B)50977		食品
5	CMCC(B)50994		食品
6	CMCC(B)50115		/
7	CICC24121	CICC	环境
8	ATCC14028	ATCC	/

1.1.3 试剂和培养基

本实验所用的培养基均由国内培养基生产企业提供,经中检院验证符合 GB 4789.28 的要求后,由生产企业将同一种类和品牌的同批次培养基分发给验证实验室进行后续实验。培养基生产企业包括北京奥博星生物技术有限责任公司、北京陆桥技术股份有限公司、北京三药科技开发公司、广东环凯微生物科技有限公司、青岛海博生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 研究用菌株的确认

取表1菌种 TSA 琼脂培养基平板新鲜二代培养物,进行革兰氏染色、镜检,观察其染色特性及形态;使用革兰氏阴性菌鉴定卡在 VITEK Compact II 系统上进行生化确认;新鲜培养物经 $\varphi=70\%$ 甲酸提取后,用 MALDI-TOF 方法进行确认;将从新鲜培养物用水煮法提取的 7 株菌基因组 DNA 进行 16S rRNA 扩增,将扩增产物委托北京天一辉远生物科技有限公司用 Sanger 法进行克隆测序,并将测序结果上传至 NCBI 网站,进一步对种属进行确认。参考《GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》中的附录 B,对研究用菌种进行血清型确认。

表 2 实验用培养基及生产厂家编码

Table 2 Experimental medium and manufacturer code

培养基名称	涉及国标方法	GB 规定的培养条件	生产厂家编码*
缓冲蛋白胨水 (BPW)	GB 4789.4-2016	36±1 °C 8 h	A
	GB 4789.30-2016		B
	GB 4789.40-2016		D
	GB 4789.41-2016		
亚硫酸铋琼脂 (BS)	GB 4789.4-2016	36±1 °C 40~48 h	B
			C
			E
HE 琼脂 (HE)	GB 4789.4-2016	36±1 °C 18~24 h	A
			B
			D
木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD)	GB 4789.4-2016 GB 4789.5-2012	36±1 °C 18~24 h	A
			B
			C
			D
			E
沙门氏菌显色培养基 (沙显)	GB 4789.4-2016	36±1 °C 18~24 h	A
			B
			D
			E
伊红美蓝琼脂 (EMB)	GB4789.36	36±1 °C 18~24 h	B
			D
			E
四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB)	GB 4789.4-2016 GB 4789.31-2013	42±1 °C 18~24 h	B
			C
			D
			E
亚硝酸盐脱氨酸增菌 (SC)	GB 4789.4-2016 GB 4789.31-2013	36±1 °C 18~24 h	B
			E
肠道菌增菌肉汤/缓冲葡萄糖煌绿胆盐肉汤 (EE)	GB 4789.6-2016 GB 4789.41-2016	36±1 °C 24±2 h	A
			B
			D

注: *表示生产厂家编号为本研究自行编排的实验室序号,与文字部分实验室的顺序无关。

1.2.2 菌悬液制备

用无菌棉签取鼠伤寒沙门氏菌 TSA 平板新鲜 2 代培养物, 加入无菌生理盐水中, 制备成系列稀释菌悬液。

1.2.3 固体培养基的测试方法

定量测试方法: 取 1.2.2 制备的菌悬液, 分别用待评价培养基和 TSA 参比培养基进行计数, 参照 GB 4789.28 中选择性分离和技术固体培养基的测试方法计算生长率。每一稀释度接种两个平板。并按表 2 中规定的培养条件培养。

定性测试方法: 用 1 μL 接种环取 1.2.2 制备的菌悬液在固体培养基 (EMB) 表面进行分区划线。并按表 2 中规定的培养条件培养平板。

1.2.4 液体培养基的测试方法

非选择性增菌培养基的测试方法参考 GB 4789.28-2013 中非选择性增菌培养基的半定量测试方法进行检测, 中检院除了上述方法, 还同时参考了选择性增菌培养基的检测方法, 进行定量检测。

选择性增菌培养基的测试方法为: 在液体培养基中接种 10~100 CFU 的鼠伤寒沙门氏菌, 接种量为 1 mL, 按标准方法中规定的培养时间和温度进行培养, 培养后, 取 10 μL 培养液均匀涂布到 XLD 平板, 按表 3 中规定的培养条件进行培养。

1.2.5 培养基的评价方法

参照 GB 4789.28-2013 质控评定标准对待测培养基的质量进行评价。

定量检测 (生长率) 的计算公式为:

$$P_R = \frac{N_S}{N_0} \quad (1)$$

式中:

P_R ——生长率;

N_S ——待测培养基平板上的菌落总数平均值;

N_0 ——参比培养基平板上的菌落总数平均值。

1.3 验证单位

本研究的验证工作由国内 15 家单位完成, 主要包

括国家级、省级、市级食品检验机构和培养基生产厂家 (表 3)。为保证结果的有效性, 验证用菌种由 CMCC 和 CICC 统一提供, 干粉培养基为各生产厂家提供的同批次产品。

表 3 验证单位名称及编号

序号	单位类型	单位名称
1	国家级	中国食品药品检定研究院
2		河北省食品药品检验院
3		山西省食品药品检验所
4		山东省食品药品检验检测院
5	省级	上海市食品药品检验所
6		四川省食品药品检验检测院
7		湖北省食品质量监督检验研究院
8		江西省食品检验检测研究院
9		厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心
10	菌种保藏机构	中国食品发酵工业研究院有限公司
11		北京奥博星生物技术有限责任公司
12		北京陆桥技术股份有限公司
13	培养基生产厂家	北京三药科技开发公司
14		广东环凯微生物科技有限公司
15		青岛海博生物技术有限公司

注: 培养基生产厂家按拼音顺序进行排序。

1.4 菌株的筛选原则

依据固体培养基的生长率结果, 筛选出与 ATCC 菌株生长率最接近的菌株, 作为替代 ATCC 菌株的备选质控菌株。

将备选质控菌株的增菌效果和/或选择性等结果与 ATCC 菌株质控结果进行对比, 筛选出与 ATCC 菌株质控结果一致性最高的菌株。

1.5 数据分析

本文使用 JMP 数据分析软件对不同菌株的数据进行分析比较。

表 4 鼠伤寒沙门氏菌菌株的鉴定结果

Table 4 Identification results of *Salmonella typhimurium* strains

菌株编号	革兰氏染色	生化及微生物质谱鉴定结果	血清型凝集抗原式	16S rRNA 基因 Genbank 编号*
CMCC(B)50970			1,4, 12: i: 1,2	MH634714
CMCC(B)50975			1,4, 12: i: 1,2	MK886515
CMCC(B)50976	革兰氏阴性杆菌	沙门氏菌	1,4, 12: i: 1,2	MK886516
CMCC(B)50977			1,4, 12: i: 1,2	MK886517
CMCC(B)50994			1,4, 12: i: 1,2	MK883284

注: CMCC(B)50115 和 ATCC14028 为原标准中的标准菌株。CICC 24121 非本实验室分离菌株, 详细信息由 CICC 进行提供。

2 结果与讨论

2.1 菌种的确认

5 株鼠伤寒沙门菌由 CMCC 提供, 均分离自食品或相关环境样品, 经革兰氏染色后镜检验证均为革兰氏阴性杆菌, 生化和质谱鉴定结果均为沙门氏菌, 经血清型鉴定为鼠伤寒沙门氏菌, 并经 16S rRNA 测序后将序列上传至 Genbank, 具体编号见表 4。

2.2 固体培养基的测试结果

2.2.1 定量测试结果

表 5 结果所示, 经 8 个机构检验, ATCC14028 在 5 个厂家生产的 4 种沙门菌选择性分离固体培养基上的生长率均大于 0.5, 符合 GB 4789.28 对沙门菌选择性分离固体培养基的要求。但其余各菌株结果显示, 均有个别结果不符合生长率要求 (<0.5), 同一菌株在不同品牌培养基上的生长形态和数量会存在一定差异 (图 1) [22]。图 2 显示, 通过 JMP 软件对所有结果的分布进行分析比较, CMCC(B)50115 和 CMCC(B)50976 生长率和 ATCC14028 最接近, 同时该两株菌经不同检测机构验证不同品牌培养基, 均只有单个检测结果不符合 GB 4789.28 的要求, 经 a 机构检测 CMCC(B)50115 在 B 品牌 HE 培养基上的生长率小于 0.5, 经 b 机构检测 CMCC(B)50976 在 E 品牌 BS 培养基上的生长率小于 0.5。而其他菌均有多个检测结果不符合 GB 4789.28 的要求, 该两株菌可以作为标准菌株替代 ATCC14028。

表 5 结果显示, CMCC(B)50994 在 4 种培养基上

有 6 个生长率结果低于国标限值的结果 ($PR \geq 0.5$), 该菌对培养基的质量要求较高, 培养基生产企业可选择该类挑战菌株作为质控菌株, 但由于其与 ATCC14028 结果差异性较大, 不考虑选择该菌株作为替代菌株。

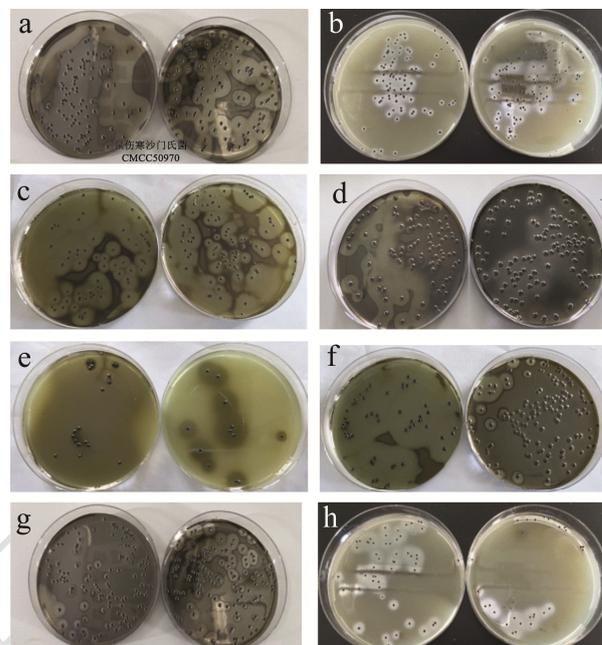


图 1 c 实验室使用不同编号鼠伤寒沙门氏菌在 C 品牌 BS 培养基上的生长情况

Fig.1 Results of *Salmonella typhimurium* growth rate detected by c institutions on BS medium

注: a-h 菌株编号依次为 CMCC(B)50970、CMCC(B)50975、CMCC(B)50976、CMCC(B)50977、CMCC(B)50994、CMCC(B)50115、CMCC(B)14028、CMCC(B)24121。

表 5 不同检测机构在不同品牌上检测不同编号鼠伤寒沙门氏菌生长率结果

Table 5 Results of *Salmonella typhimurium* growth rate detected by different detection institutions

培养基名称	品牌名称	检测机构	检测结果 (P_R)							
			ATCC 14028	CMCC(B) 50970	CMCC(B) 50975	CMCC(B) 50976	CMCC(B) 50977	CMCC(B) 50994	CMCC(B) 50115	CICC(B) 24121
BS	A	a	0.61	0.99	0.72	0.66	0.52	0.98	1.00	0.81
	B	a	0.91	0.93	0.63	0.88	0.94	0.66	1.00	0.58
	B	b	0.80	0.81	0.79	1.08	0.94	0.01	0.76	0.73
	B	l	0.63	0.94	1.33	0.70	0.98	0.79	0.65	0.85
	C	b	1.02	1.24	1.15	0.86	0.97	0.02	0.83	1.05
	C	c	1.21	0.63	0.88	0.69	0.91	0.16	0.72	0.41
	C	m	1.11	0.99	0.99	0.89	0.95	1.05	0.99	0.92
	E	a	0.72	1.03	0.21	0.61	0.73	0.92	0.70	0.38
	E	b	0.63	0.87	0.11	0.34	0.57	0.01	0.83	1.11
	E	o	0.94	0.97	1.02	1.05	0.90	1.16	1.04	1.07

续表 5

培养基名称	品牌名称	检测机构	检测结果 (P_R)							
			ATCC 14028	CMCC(B) 50970	CMCC(B) 50975	CMCC(B) 50976	CMCC(B) 50977	CMCC(B) 50994	CMCC(B) 50115	CICC(B) 24121
HE	A	a	0.89	0.47	0.74	0.72	0.25	0.78	0.37	0.86
	A	b	0.88	0.66	0.89	1.12	0.98	1.18	0.96	0.97
	A	c	0.87	0.80	0.63	0.64	0.61	0.46	0.64	0.62
	A	k	0.62	0.59	0.82	0.61	0.64	0.71	0.69	0.66
	B	a	0.84	0.71	0.96	0.57	0.90	0.82	0.49	0.97
	B	b	0.90	0.82	0.82	0.83	1.01	1.03	0.91	0.92
	D	a	0.61	0.91	0.56	0.63	0.65	0.60	0.75	0.81
	D	b	0.87	0.76	0.88	1.01	0.89	1.00	0.90	0.89
	D	n	0.80	0.70	1.01	1.43	1.23	1.31	1.15	1.28
XLD	A	a	0.85	0.87	0.74	0.79	0.60	0.85	1.02	0.59
	A	b	0.83	0.88	0.83	0.96	0.95	1.09	0.65	0.83
	A	k	0.91	0.84	0.81	0.83	0.84	0.79	0.80	0.86
	B	a	0.56	0.95	0.92	1.12	0.64	0.68	0.91	0.88
	B	b	0.77	0.82	1.01	1.00	0.88	1.14	0.81	0.91
	B	l	0.74	0.67	0.72	0.55	0.50	0.74	0.62	0.85
	C	a	0.51	1.00	0.43	0.68	0.65	0.49	0.61	0.35
	C	c	1.37	1.10	0.46	0.75	0.94	0.75	0.58	0.83
	D	a	0.62	0.61	0.65	0.71	0.78	0.67	0.95	0.83
	D	b	0.68	0.89	0.84	1.02	0.95	1.16	0.75	0.94
	D	n	1.17	0.86	1.01	0.87	1.11	0.98	0.96	0.79
	E	a	0.67	0.49	0.74	0.96	0.93	0.54	0.72	0.58
	E	b	0.89	0.77	0.79	1.10	0.94	1.13	0.96	0.97
E	o	0.93	0.91	0.89	0.96	0.83	1.05	0.88	0.90	
沙显	A	a	0.85	0.69	0.92	0.57	0.30	1.21	1.04	0.63
	B	a	0.77	0.71	0.42	0.68	0.72	1.31	1.23	0.55
	B	b	0.83	0.94	0.92	0.99	0.66	0.38	0.71	0.77
	B	l	0.90	0.99	0.92	0.86	0.69	0.88	0.84	0.76
	D	a	0.86	0.61	0.91	0.88	0.63	0.72	0.95	0.81
	D	b	0.85	0.95	0.87	0.95	0.83	0.64	0.75	0.82
	D	c	0.96	0.86	0.72	0.94	0.92	0.94	0.61	0.78
	D	n	1.10	0.00	0.77	1.15	1.16	1.03	1.03	1.01
	E	a	0.58	0.85	0.95	0.95	0.60	0.83	0.82	0.82
	E	b	0.78	1.08	0.90	0.96	0.69	0.14	0.86	0.82
	E	o	0.99	1.07	0.71	0.86	0.90	1.03	1.00	0.79

注：机构编号为本研究自行编排的检测机构序号，与表 3 顺序不同。8 家验证机构包括：中国食品药品检定研究院、河北省食品药品检验院、山西省食品药品检验所、上海市食品药品检验所、湖北省食品质量监督检验研究院、江西省食品检验检测研究院、厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中国食品发酵工业研究院有限公司。

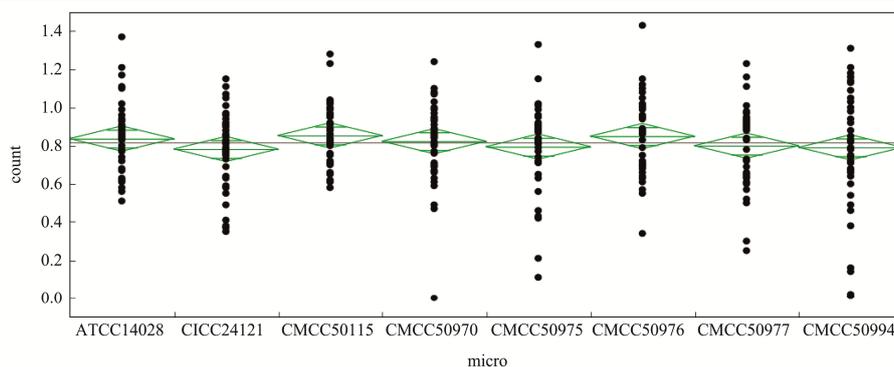


图 2 用 JMP 比较不同编号鼠伤寒沙门氏菌在不同培养基上的生长率

Fig.2 JMP was used to compare the growth rate of *Salmonella typhimurium* on different medium

表 6 中检院测试不同菌株编号鼠伤寒沙门氏菌在伊红美蓝培养基上的生长率结果

Table 6 The results of growth rate of *Salmonella typhimurium* on EMB medium were tested by NIFDC

培养基名称	培养基品牌	检测结果 (PR)							
		ATCC 14028	CMCC(B) 50970	CMCC(B) 50975	CMCC(B) 50976	CMCC(B) 50977	CMCC(B) 50994	CMCC(B) 50115	CICC 24121
伊红 美蓝	a	0.06	0.36	0.50	0.38	0.67	3.21	0.45	0.35
	b	0.32	0.01	0.66	0.28	0.36	3.63	0.18	0.73
	c	0.06	0.01	0.18	0.05	1.06	3.00	0.27	0.07
	d	0.07	0.49	0.29	0.18	0.38	2.53	0.02	0.11

表 7 中检院测试不同菌株编号鼠伤寒沙门氏菌在 BPW 肉汤中的浑浊度

Table 7 The turbidity of different strains of *Salmonella typhimurium* in BPW broth was tested by NIFDC

培养基名称	培养基品牌	浑浊度							
		ATCC 14028	CMCC(B) 50970	CMCC(B) 50975	CMCC(B) 50976	CMCC(B) 50977	CMCC(B) 50994	CMCC(B) 50115	CICC 24121
BPW	a	2	2	1	2	2	2	2	2
	b	2	1	2	2	2	2	1	2
	c	2	2	2	2	2	2	2	2
	d	2	2	2	2	2	1	2	2

2.2.2 定性测试结果

7 株鼠伤寒沙门氏菌在伊红美蓝琼脂培养基上的特征性反应均符合 GB 4789.28-2013 要求, 菌株生长形态为无色, 半透明状。中检院使用 4 种不同品牌培养基, 按照 1.2.5 方法, 检测了 7 株菌的生长率, 沙门氏菌很难被伊红美蓝琼脂培养基抑制, 所以在 GB 4789.28 中, 仅要求菌落生长形态能够与大肠埃希氏菌进行区分, 但表 6 结果显示, 部分培养基品牌能够抑制鼠伤寒沙门氏菌的生长, CMCC(B)50970、CMCC(B)50976 和 CMCC(B)50115 生长率均不超过 0.5。

2.3 液体培养基的测试结果

2.3.1 非选择性增菌培养基的半定量测试结果

7 株鼠伤寒沙门氏菌经缓冲蛋白胨水增菌液增菌后, 使用 TSA 平板进行计数, 结果均为多不可计, 全部菌株符合 GB 4789.28-2013 要求。中检院在对增菌

后培养基进行计数的同时, 观察了接菌后增菌液的浑浊度, 表 7 结果显示, CMCC(B)50977、CMCC(B)50976 和 CICC24121 的浑浊度优于其他菌株。

2.3.2 选择性增菌培养基的半定量测试结果

7 株鼠伤寒沙门氏菌经四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB) 和亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC) 增菌后, 经 TSA 平板进行计数, 除 CMCC(B)50994 外, 其余结果均 >10 CFU, 符合 GB4789.28-2013 的要求。a 和 k 机构在 TTB 增菌液中接入 CMCC(B)50994 后, 经验证, 增菌结果 <10 CFU, k 机构在 SC 增菌液中接入该菌, 增菌后结果 <10 CFU。

3 结论

本次研究综合生长率、选择性和定性实验结果数据, 选择了 CMCC(B)50976 作为质控菌株替代 ATCC14028。该菌于 2002 年分离自湖北地区的食品中,

经生化、质谱、16S RNA 鉴定确定为鼠伤寒沙门氏菌,经不同验证部门使用不同品牌培养基进行验证结果与 ATCC14028 最为接近,且结果稳定,符合本次质控菌株的筛选标准。本研究证明我国菌株可以替代国外菌株作为国家强制标准的质控标准,为未来的标准菌株筛选提供了实验思路。

本研究发现,同种类培养基由于生产厂家不同,质量存在差异(见图 1)。培养基质量是影响菌落计数结果的因素之一,如 A 和 B 品牌的 BS 培养基,质量检测结果普遍优于 E 品牌和 C 品牌,其中 B 品牌培养基仅 b 检测机构检测的 CMCC(B)50994 生长率低于 0.5。这种生长率的差异主要由于培养基中提供氨基酸和生长因子等营养成分的质量差异,这种营养成分(如蛋白胨,牛肉浸出物等)一般为复杂的生物组分构成,由于成分的不稳定性很容易造成培养基质量的不稳定性。同时培养基为防止微生物污染,延长保质期,也会添加抑菌成分或者进行辐照灭菌等,这也是影响培养基生长率的关键因素之一,针对这种情况在培养基的验证过程中可加入如藤黄微球菌等对抑菌物质敏感的菌株进行质控。

同时不同的实验室的操作人员、实验室环境、使用仪器等也会影响最终的实验结果。表 5 结果显示, a 实验室检测的培养基不合格率高于其他实验室, b 实验室检测的生长率结果普遍低于其他实验室。这种差异除了培养基质量的不稳定性,也可能来自于实验人员的操作,实验人员在实验操作过程中的接菌量对最终结果有很大的影响。GB 4789.28-2013 中规定目标菌的接菌量为 10~100 CFU/mL,在实际操作中,接菌量为 10 CFU/mL 与 100 CFU/mL 对最终结果的判读有很大影响,越低的接菌量越容易出现不合格的结果,如接菌量为 20 CFU/mL,则两个品牌培养基间有 2 个菌落的差异,即会造成 10% 的差异。同时,本次研究证明接菌量低对选择性强的培养基更难生长,而高的接菌量,实验结果越容易符合 GB 4789.28-2013 的规定要求。建议实验室在验证过程中可以使用标准物质等质控样品,控制每次实验的接种量偏差,使得实验数据更加准确。生产企业为了保证培养基质量,在验证过程中可以适当的减少接菌量,使用比较极限的接菌量挑战培养基的生长能力,确保培养基能够在不同实验室符合 GB 4789.28 的要求。

本研究由于涉及验证 GB 4789.28 所有培养基和菌株,15 个实验室验证了几十种培养基上白株菌,工作量大,参与部门多,所以不符合要求的结果未进行多次重复验证。通过固体培养基定量结果筛选出 CMCC(B)50115 和 CMCC(B)50976 生长率和

ATCC14028 最接近,后通过液体培养基进一步验证,确定 CMCC(B)50976 与 ATCC14028 结果一致性最高,故选择该菌作为替代菌株。本文通过实验和本次标准的修订系统的总结了培养基质量的控制方法和可能存在的不合格因素,为培养基生产企业的培养基质控和国家食品或其他标准修订菌株的筛选过程提供了思路和实验数据。

参考文献

- [1] Carrique-Mas J, Barnes S, McLaren I, et al. Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D) [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 1976-1973.
- [2] Ibarra J A, Steele-Mortimer O. *Salmonella*-the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival [J]. *Cellular Microbiology*, 2009, 11(11): 1579-1586.
- [3] Schmedes S E, Woerner A E, Budowle B. Forensic human identification using skin microbiomes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22).
- [4] Hyeon J Y, J Park H, Chon J W, et al. Evaluation of selective enrichment broths and chromogenic media for *Salmonella* detection in highly contaminated chicken carcasses [J]. *Poultry Science*, 2012, 91: 1222-1226.
- [5] ISO 6579-1, Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* [S].
- [6] GB 4789.4-2016, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
- [7] Busse M. Media for *Salmonella* [J]. *Int J Food Microbiol*, 1995, 26: 117-131.
- [8] Oberhardt M A, Zarecki R, Gronow S, et al. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 1-14.
- [9] Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media [M]. BD Diagnostics, USA, 2009.
- [10] Letort C, Juillard V. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus* [J]. *Appl. Microbiol.*, 2001, 91: 1023-1029.
- [11] Amit P, Douglas L. Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella* spp. from frozen channel catfish and Vietnamese basa fillets [J]. *Food*

- Microbiology, 2009, 26: 317-319.
- [12] Lee S, Song K, Chon J W, et al. Evaluation of selective-enrichment and chromogenic media for *Salmonella* detection in raw shell egg contents with a low microbial load [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2017, 14(7): 1-5.
- [13] Pao S, Patel D, Kalantari A, et al. Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 4(71): 2158-2161.
- [14] Dijk S, Bruins J, Ruijs J H M. Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for *Salmonella* detection in stool in routine laboratory diagnostics [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(2): 456-458.
- [15] Weller D, Mark A, Catherine A, et al. Effects of water, sodium hypochlorite, peroxyacetic acid, and acidified sodium chlorite on in-shell hazelnuts inoculated with *Salmonella enterica* serovar panama [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(12): 1885-1891.
- [16] GB 4789.28-2013,食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S].
- [17] 杨静.食品菌落总数检测结果出现异常现象的原因分析[J].疾病监测与控制杂志.2014,8(1):46-47.
- [18] 朱斌.不同厂家药品微生物限度检查用计数培养基的质量比较[J].中国药房,2010,21(25):2365-2368.
- [19] NCCLS M22 A3, Quality control for commercially prepared microbiological culture media (Third edition) [S].
- [20] Guidelines for assuring quality of food and water microbiological culture media, 2nd edition, 2014 [S].
- [21] ISO 11133-2020, Microbiology of food, animal feed and water- Preparation, production, storage and performance testing of culture media [S].
- [22] John P Gorsuch, Daniel LeSaint, Zachary Jones, et al. Culture medium brand choice impacts colony swarming behavior among industrial *Bacillus isolates* and the accuracy of aerobic plate counts [J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 172: 1-5.