

# 黄瓜生产过程中致病菌调查及耐药性分析

郭元娟<sup>1,2</sup>, 张露月<sup>3</sup>, 王文博<sup>1,2\*</sup>, 郭栋梁<sup>1,2\*</sup>, 郝艳芳<sup>4</sup>, 刘磊<sup>5</sup>

(1. 山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 山东省食品质量与安全检测技术重点实验室, 山东济南 250100; 2. 山东省农业科学院-北卡罗莱纳州立大学农产品检测技术和风险评估联合实验室, 山东济南 250100; 3. 烟台市食品药品检验检测中心, 山东烟台 264000; 4. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206; 5. 北京良润生物科技有限公司, 北京 102200)

**摘要** 对黄瓜生产过程中黄瓜、土壤、基肥、灌溉用水及植株中感染沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、单增李斯特氏菌的情况进行调查, 结果表明, 共计 102 批次样本中黄瓜样品、植株及土壤中各检出一株大肠杆菌, 植株中检出一株金黄色葡萄球菌。对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌进行 8 大类 13 种抗生素的药敏试验, 结果表明, 土壤中大肠杆菌为敏感菌株且对 13 种抗生素均敏感, 植株中大肠杆菌仅对氯霉素耐药, 黄瓜中大肠杆菌对氨基西林、哌拉西林、氯霉素和四环素耐药, 为多重耐药菌株; 植株中金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、克林霉素及磺胺甲噁唑耐药, 为多重耐药菌株。

**关键词** 黄瓜; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 耐药性

中图分类号 S41-30 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)14-0207-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.14.061



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Investigation of Pathogenic Bacteria and Drug Resistance Analysis in Cucumber Production Process

WU Yuan-juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Lu-yue<sup>3</sup>, WANG Wen-bo<sup>1,2</sup> et al (1. Institute of Agricultural Standards and Testing Technology for Agricultural Products Shandong Academy of Agricultural Sciences & Shandong Provincial Key Laboratory of Test Technology on Food Quality and Safety, Jinan, Shandong 250100; 2. NCSU - SAAS Joint Laboratory for Testing Technology & Risk Assessment for Agro-products, Jinan, Shandong 250100; 3. Yantai Food and Drugs Inspection and Testing Center, Yantai, Shandong 264000)

**Abstract** Cucumber, soil, base fertilizer, irrigation water and plant infected with *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* during the production of cucumber were investigated. The results showed that among the 102 tested samples, *Escherichia coli* was detected in one ripe cucumber, one cucumber plant and one cultivated soil sample respectively, and *Staphylococcus aureus* was found in one cucumber plant sample. The susceptibility test of 8 major classes of 13 types of antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed that the *Escherichia coli* in cultivated soil was sensitive strains, which was susceptible to the 13 types of antibiotics. *Escherichia coli* in cucumber plants was resistant to aztreonam only; *Escherichia coli* in ripe cucumber was resistant to ampicillin, piperacillin, chloramphenicol and tetracycline, making ripe cucumber multi-drug-resistant strains. *Staphylococcus aureus* in cucumber plants was resistant to penicillin, erythromycin, clindamycin and sulfamethoxazole, which made cucumber plants multi-drug-resistant strains.

**Key words** Cucumber; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; Drug resistance

即食生鲜蔬菜属于低酸性食品, 具有较高的含水量, 又可以提供必需的维生素等营养, 是餐桌上必不可少的即食食品, 但为了防止维生素等营养的流失, 消费者在食用时往往不烹调, 在简单的清洗后直接食用<sup>[1]</sup>。在我国, 随着健康饮食理念的引导, 生食新鲜蔬菜的需求日益增多, 但由于缺少加热过程, 极易招致病源微生物的侵染, 特别是食源性致病菌污染, 严重危害人类健康<sup>[2]</sup>。近年国外暴发多起即食生鲜蔬菜食源性致病菌中毒事件, 例如 2006 年美国暴发的菠菜被沙门氏菌污染造成 205 人被感染, 导致 3 人死亡<sup>[3]</sup>; 2011 年德国暴发出血性大肠杆菌感染, 所引起的毒黄瓜中毒事件, 最终导致 14 人死亡<sup>[1]</sup>。自抗生素被人类发现以来, 抗生素给临床治疗带来了前所未有的重大突破, 但随着抗生素的频繁大量使用, 细菌对抗生素的耐药性越来越广泛<sup>[4]</sup>。据美国疾病预防控制中心统计, 美国在 2013 年因多重耐药菌株所引发的人群感染高达 200 万人, 最终导致 23 000 人死

亡<sup>[5]</sup>。据有关报道, 中国使用抗生素的总量是英国使用量的 150 倍, 人均日常使用量是美国使用量的 6 倍以上<sup>[4,6]</sup>。抗生素的大量使用已经导致食源性致病菌耐药性日益严重, 并产生多重耐药性。

黄瓜的热量非常低, 对于高血压、高血脂以及糖尿病等患者是一种非常理想的食疗蔬菜。黄瓜既可生吃也可凉拌, 因此深受广大消费者的喜爱。由于黄瓜营养丰富, 在座果成熟期间常被昆虫叮咬和鸟类啄食, 从而会感染各种微生物使其存在被食源性致病微生物污染的可能。黄瓜生长速度非常快, 几天内即可成熟采食, 因此在黄瓜生产过程中, 土壤、基肥、灌溉用水等环境因素对黄瓜影响非常大, 因此对其进行食源性致病微生物风险筛查验证评估, 可以初步摸清其病原微生物的种类以及危害程度, 为生产指导、科学监管及消费引导提供技术依据。该研究选取露天和大棚栽培中黄瓜、植株、基肥、灌溉用水及土壤共计 102 批次样本, 对黄瓜中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、单增李斯特氏菌等食源性致病菌风险筛查验证评估, 并对检测出的食源性致病菌抗生素进行药敏试验, 以期在选择有效抗菌药、防止抗生素的滥用及研究致病菌提供可靠依据, 也为完善即食蔬菜致病菌防治体系奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 样品采集** 选取露天和大棚栽培中黄瓜、植株、基肥、灌

**基金项目** 国家农产品质量安全风险评估重大专项(GJFP201801304); 山东省农业科学院农业科技创新工程项目(CXGC2018E05)。

**作者简介** 郭元娟(1977—), 女, 河南光山人, 研究员, 硕士, 从事农产品质量安全与检测技术研究。\*通信作者: 王文博, 研究员, 硕士, 从事农产品质量安全与检测技术研究; 郭栋梁, 副研究员, 从事农产品质量安全与检测技术研究。

**收稿日期** 2019-01-23

溉用水及土壤共计 102 批次样本。其中露天栽培中黄瓜(10)、植株(12)、基肥(5)、灌溉用水(13)及土壤(13),共计 53 批次样本;大棚栽培中黄瓜(12)、植株(8)、基肥(5)、灌溉用水(12)及土壤(12),共计 49 批次样本。每份黄瓜样品采集量为 500~1 000 g,植株样品采集量为 500~1 000 g,灌溉用水样品采集量为 500 mL,基肥样品采集量为 1 000 g(5 点随机采样),土壤样品采集量为 1 000 g(5 点随机采样),无菌袋封装。保存、运输温度为冷藏,4 h 内送达实验室进行检验。采样过程中遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。

**1.2 主要试剂及设备** 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、空肠弯曲杆菌所用增菌液、分离培养基及显色培养基均购自广东环凯生物科技有限公司;所有试剂及生化检定卡均在有效期内使用;生化培养箱购自上海新苗医疗器械制造有限公司;质控菌株均由广东省食品微生物安全工程技术研究中心提供,质控菌株编号分别为沙门氏菌 FSCC215003、金黄色葡萄球菌 FSCC223005、大肠杆菌 ATCC25922、单增李斯特菌 CMCC4002。

**1.3 检测方法** 金黄色葡萄球菌参照《食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验(第二法)》(GB 4789.10—2010)<sup>[7]</sup>进行检测,沙门氏菌参照《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》(GB 4789.4—2010)<sup>[8]</sup>进行检测,单增李斯特菌参照《食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特菌检验》(GB 4789.30—2010)<sup>[9]</sup>进行检测,大肠杆菌参照《食品微生物学检验 大肠埃希氏菌检验》(GB 4789.6—2016)<sup>[10]</sup>进行检测。检测过程中严格按照《国家食源性致病菌监测工作手册》中质量控制操作程序进行,并以标准菌株为对照菌株进行质控。

**1.4 药敏试验方法** 将保存于-80℃冰箱的大肠杆菌取出复苏,划线接种于营养琼脂板上,挑取菌落数个置于接种水(DEMINERALIZED WATER)中,用 0.5 麦氏比浊管比浊;取上述菌液 60 μL,加入营养肉汤培养液中,混匀;吸取稀释菌液,加入药敏板中,每孔 100 μL;将板条放入恒温培养箱中 36℃培养 16~24 h,自培养箱中取出板条,判断各个孔的阴阳性结果。

**1.4.1 大肠杆菌药敏板浓度。** 头孢噻唑(EFT) 0.125~8.000 μg/mL、青霉素(PEN) 0.125~8.000 μg/mL、氨苄西林(AM) 4~16 μg/mL、阿莫西林-克拉维酸(AMC) 4/2~16/8 μg/mL、头孢西丁(FOX) 1~16 μg/mL、苯唑西林(OX) 0.125~8.000 μg/mL、氨基糖苷类(AZT) 2~16 μg/mL、美罗培南(EMP) 1~8 μg/mL、哌拉西林(PIP) 4~64 μg/mL、庆大霉素(GEN) 2~8 μg/mL、链霉素(STS) 1 000 μg/mL、卡那霉素(KAN) 4~16 μg/mL、四环素(TET) 2~8 μg/mL、复方新诺明(T/S) 0.5/9.5~2/38 μg/mL、氧氟沙星(OFX) 1~8 μg/mL、环丙沙星(CFX) 0.5~2.0 μg/mL、克林霉素(CLN) 0.125~4.000 μg/mL、氯霉素(CLM) 4~16 μg/mL、利福平(RIF) 0.25~16.00 μg/mL、氟苯尼考(FFC) 0.5~32.0 μg/mL、阿奇霉素(AZM) 2~64 μg/mL,上海星佰生物技术有限公司。

**1.4.2 金黄色葡萄球菌药敏板浓度。** 头孢噻唑(EFT) 0.125~32.000 μg/mL、青霉素(PEN) 0.06~0.12 μg/mL、氨苄

西林(AM) 0.125~2.000 μg/mL、苯唑西林(OX) 0.125~8.000 μg/mL、四环素(TET) 0.125~32.000 μg/mL、复方新诺明(T/S) 0.5/9.5~4/76 μg/mL、环丙沙星(CFX) 0.06~16.000 μg/mL、克林霉素(CLN) 0.06~32.00 μg/mL、红霉素 0.125~16.000 μg/mL、磺胺甲噁唑 16~512 μg/mL、替米考星 0.5~64.0 μg/mL、万古霉素 0.25~32.00 μg/mL,上海星佰生物技术有限公司。

## 2 结果与分析

**2.1 黄瓜生产过程中食源性致病菌检出总体情况** 该项研究共分离纯化得到大肠杆菌 3 株、金黄色葡萄球菌 1 株。其中座果前期采集的黄瓜样品、座果前期采集的植株样品中各检出一株大肠杆菌及座果后期采集的土壤样品检出一株大肠杆菌;座果前期采集的植株样品中检出一株金黄色葡萄球菌。

**2.2 大肠杆菌药物敏感性试验结果分析与最低抑菌浓度(MIC)值** 采用 CLSI M100S 26th Edition 抗微生物药物敏感性试验的执行标准对大肠杆菌进行耐药性讨论。

**2.2.1 大肠杆菌药敏试验结果。** 采用目前国际通用的美国临床实验室标准化委员会(CLSI)2016 年标准规定的微量肉汤稀释法和结果判定方法,对分离得到的 3 株大肠杆菌进行药敏试验,结果发现(表 1),氟苯尼考 MIC 值为 4~>32 μg/mL,利福平 MIC 值为 4~16 μg/mL,头孢噻唑 MIC 值为 0.25~0.50 μg/mL,青霉素和苯唑西林的 MIC 值均大于 8 μg/mL,氨苄西林的 MIC 值为 ≤4~>16 μg/mL,克林霉素 MIC 值>4 μg/mL,阿奇霉素 MIC 值为 4~8 μg/mL,头孢西丁 MIC 值为 ≤1~8 μg/mL,链霉素 MIC 值为 ≤1 000 μg/mL,奥格门丁 MIC 值为 ≤4/2~16/8 μg/mL,复方新诺明 MIC 值为 ≤0.5/9.5~>2/38 μg/mL,哌拉西林 MIC 值为 ≤4~>64 μg/mL,环丙沙星 MIC 值 ≤0.5 μg/mL,氨基糖苷类 MIC 值为 ≤2~>16 μg/mL,美罗培南和氧氟沙星的 MIC 值 ≤1 μg/mL,氯霉素 MIC 值分布为 ≤4~>16 μg/mL,卡那霉素 MIC 值 ≤4 μg/mL,庆大霉素 MIC 值 ≤2 μg/mL,四环素 MIC 值分布为 ≤2~>8 μg/mL。

**2.2.2 大肠杆菌耐药性情况。** CLSI M100S 26th Edition 标准中没有利福平(RIF)、青霉素(PEN)、苯唑西林(OX)、克林霉素(CLN)、阿奇霉素(AZM)、氟苯尼考(STS)、链霉素(STS)等药物对革兰氏阴性菌的耐药性判定标准无法对其结果做出有效的耐药性分析,结果表明青霉素(PEN) 0.125~8.000 μg/mL、苯唑西林(OX) 0.125~8.000 μg/mL、克林霉素(CLN) 0.125~4.000 μg/mL、克林霉素(CLN) ≤1 000 μg/mL 浓度下无法对大肠杆菌形成有效抑制,利福平 16 μg/mL 浓度下可以对 100%的大肠杆菌实现形成抑制,阿奇霉素 8 μg/mL 浓度下可以对 100%的大肠杆菌形成有效抑制,氟苯尼考 8 μg/mL 浓度下可以对 66.7%的大肠杆菌形成有效抑制。

采用 CLSI M100S 26th Edition 标准对此次药物敏感性试验进行分析,结果发现,氨苄西林(AM)、奥格门丁(AMC)、头孢西丁(FOX)、氨基糖苷类(AZT)、美罗培南(EMP)、哌拉西林

(PIP)、庆大霉素(GEN)、卡那霉素(KAN)、四环素(TET)、复方新诺明(T/S)、氧氟沙星(OFX)、环丙沙星(CFX)、氯霉素(CLM)共 13 种抗生素均可对大肠杆菌形成有效抑制,其中

土壤中大肠杆菌为敏感菌株且对 13 种抗生素均耐药;植株中大肠杆菌仅对氨基糖苷类耐药;黄瓜中大肠杆菌对氨基糖苷类、哌拉西林、氯霉素和四环素耐药,为多重耐药菌株。

表 1 大肠杆菌药物敏感性试验 MIC 值统计

Table 1 MIC value statistics of *Escherichia coli* drug sensitivity test

样品名称 Sample name	氟苯尼考 Florfenicol	利福平 Rifampin	头孢噻吩 Ceftiofur	青霉素 Penicillin	苯唑西林 Oxacillin	氨苄西林 Ampicillin	克林霉素 Clindamycin	阿奇霉素 Azithromycin	头孢西丁 Cefoxitin	链霉素 Streptomycin	奥格门丁 Ogmending	μg/mL
ATCC25922	4	8	0.50	>8	>8	≤4	>4	4	4	≤1 000	≤4/2	
植株 Plant	8	16	0.50	>8	>8	≤4	>4	8	8	≤1 000	8/4	
黄瓜 Cucumber	>32	8	0.50	>8	>8	>16	>4	4	8	≤1 000	16/8	
土壤 Soil	4	4	0.25	>8	>8	≤4	>4	4	≤1	≤1 000	≤4/2	

  

样品名称 Sample name	复方新诺明 SMZCo	哌拉西林 Piperacillin	环丙沙星 Ciprofloxacin	氨基糖苷类 Aztreonam	美罗培南 Meropenem	氧氟沙星 Ofloxacin	氯霉素 Chloramphenicol	卡那霉素 Kanamycin	庆大霉素 Gentamicin	四环素 Tetracycline
ATCC25922	≤0.5/9.5	≤4	≤0.5	≤2	≤1	≤1	≤4	≤4	≤2	≤2
植株 Plant	≤0.5/9.5	≤4	≤0.5	>16	≤1	≤1	8	≤4	≤2	≤2
黄瓜 Cucumber	>2/38	>64	≤0.5	≤2	≤1	≤1	>16	≤4	≤2	>8
土壤 Soil	1/19	≤4	≤0.5	≤2	≤1	≤1	≤4	≤4	≤2	≤2

2.3 金黄色葡萄球菌药物敏感性试验结果分析与 MIC 值 采用 CLSI M100S 26th Edition 抗微生物药物敏感性试验的执行标准对金黄色葡萄球菌进行耐药性讨论。

2.3.1 金黄色葡萄球菌药敏试验结果。采用目前国际通用的美国临床实验室标准化委员会(CLSI)2016 年标准规定的微量肉汤稀释法和结果判定方法,对分离得到的 1 株金黄色葡萄球菌进行药敏试验,结果表明,头孢噻吩 MIC 值为 2 μg/mL,青霉素 MIC 值 > 2 μg/mL,氨苄西林 MIC 值 > 2 μg/mL,苯唑西林 MIC 值为 1 μg/mL,四环素 MIC 值为 1 μg/mL,复方新诺明 MIC 值 ≤ 0.5/9.5 μg/mL,环丙沙星 MIC 值为 0.25 μg/mL,克林霉素 MIC 值 > 32 μg/mL,红霉素 MIC 值为 16 μg/mL,磺胺甲噁唑 MIC 值为 128 μg/mL,替米考星 MIC 值 > 64 μg/mL,万古霉素 MIC 值为 1 μg/mL。

2.3.2 金黄色葡萄球菌耐药性情况。CLSI M100S 26th Edition 标准中没有头孢噻吩(EFT),氨苄西林(AM)、替米考星等药物对金黄色葡萄球菌的耐药性判定标准无法对其结果做出有效的耐药性分析。采用 CLSI M100S 26th Edition 标准对此次药物敏感性试验结果分析发现苯唑西林(OX)、四环素(TET)、复方新诺明(T/S)、环丙沙星(CFX)、万古霉素等 5 种抗生素均可对金黄色葡萄球菌形成有效抑制。植株中检出的金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、克林霉素及磺胺甲噁唑耐药,为多重耐药菌株。

### 3 结论与讨论

此次风险评估项目在生产过程中黄瓜、土壤、基肥、灌溉用水及植株中感染沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、单增李斯特氏菌的情况表明,黄瓜样品、植株及土壤中各检出一株大肠杆菌,植株中检出一株金黄色葡萄球菌。因此沙门氏菌、单增李斯特氏菌可能不是影响其质量安全的主要风险因子,但在露天生产过程中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌可能是影响其质量安全的主要风险因子。

土壤中大肠杆菌为敏感菌株且对 13 种抗生素均敏感,

植株中大肠杆菌仅对氨基糖苷类耐药;黄瓜中大肠杆菌对氨基糖苷类、哌拉西林、氯霉素和四环素耐药,为多重耐药菌株。植株中金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、克林霉素及磺胺甲噁唑耐药,为多重耐药菌株。虽然土壤、植株及黄瓜中均检出有大肠杆菌,但土壤、植株及黄瓜中的大肠杆菌耐药情况却有差异,因此有可能来源于不同种植环境中的致病微生物。

即食蔬菜是餐桌上最为常见的即食食品,尤其在夏季人均消费量很大,只经过简单的清洗即食用,因此发生交叉污染的可能性很大。此次调查监测到的致病菌虽然检出率不高,但仍需要引起相关部门的重视,希望有关部门加强对即食蔬菜的卫生监管,尽量减少食源性致病菌的交叉污染,减少由此可能引发的食源性疾病。

### 参考文献

- [1] 马晨,陈雪华,钱程.海口市市售新鲜蔬菜微生物污染分析[J].浙江农业科学,2015,56(3):396-401.
- [2] 陈月英.我国居民蔬菜消费需求现状及前景[J].中国食物与营养,2005(7):38-39.
- [3] 王志刚,黄祺,陈岳.美国“毒菠菜”事件始末及其对中国食品安全的启示[J].世界农业,2008(4):25-28.
- [4] 容冬丽,吴清平,吴诗,等.我国部分地区即食食品和蔬菜中金黄色葡萄球菌污染分布及耐药和基因分型情况[J].微生物学报,2018,58(2):314-323.
- [5] MARSTON H D, DIXON D M, KNISELY J M, et al. Antimicrobial resistance[J]. The journal of the American medical association, 2016, 316(11):1193-1204.
- [6] ZHANG Q Q, YING G G, PAN C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environmental science & technology, 2015, 49(11):6772-6782.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品微生物学检验 沙门氏菌检验:GB 4789.4—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验:GB 4789.30—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验:GB/T 4789.36—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.