

利用选择性培养基快速初步鉴定食品中的致病微生物

贺炎娜*, 范丽丽, 张琦, 张云鲜, 王丹
(蒙牛乳业(焦作)有限公司, 焦作 454000)

摘要: 目的 建立快速区分鉴别某种(类)微生物的方法。**方法** 选择几种常用的培养基, 将不同的菌株接种在培养基上, 通过培养基成分对不同微生物的选择性、显色反应及不同菌株在选择性培养基上具有的特征性菌落形态, 初步并快速判定微生物, 尤其是致病类微生物。**结果** 大肠埃希氏菌会与其他致病菌混淆, 可以通过结晶紫中性红胆盐(crystal violet neutral red bile salt, VRBA)琼脂将其区分; 志贺氏菌在培养基上菌落基本均为半透明, 体现的均为培养基本身的颜色; 亚硫酸铋(sulfurous acid bismuth, BS)琼脂的选择性较强, 但鼠伤寒沙门氏菌在该培养基上长势良好。**结论** 该方法可有效提高鉴别致病菌的效率。

关键词: 选择性培养基; 菌落形态; 微生物

Rapid and preliminary identification of pathogenic microorganisms in food by selective medium

He Yan-Na*, Fan Li-Li, Zhang Qi, Zhang Yun-Xian, Wang Dan
(Mengniu Dairy (Jiaozuo) Co., Ltd., Jiaozuo 454000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for distinguishing and identifying certain microorganisms. **Methods** Several commonly used media were selected, and different strains were inoculated on the media. Through the selectivity and color reaction of the medium components to different microorganisms and the characteristic colony morphology of different strains on the selective medium, the microorganism, especially the pathogenic microorganism, was preliminarily and rapidly determined. **Results** *Escherichia coli* was confused with other pathogenic bacteria, which could be distinguished by crystal violet neutral red bile salt agar. The colonies of *Shigella* were basically translucent on the medium, reflecting the color of the medium. The selectivity of bismuth sulfite agar was more strong, but *Salmonella typhimurium* grew well on this medium. **Conclusion** This method can effectively improve the efficiency of identifying pathogenic bacteria.

KEY WORDS: selective medium; colony morphology; microorganism

1 引言

国家标准会对每一种微生物菌落形态进行描述, 包括菌落的大小、形状、边缘、光泽、质地、颜色和透明程度等。每一种细菌在一定条件下会形成固定的菌落特征。

细胞形态是菌落形态的基础, 菌落形态是细胞形态在群体集聚时的反映。不同种或同种细菌在不同的培养条件下, 菌落特征是不同的。日常检验中如何快速识别致病微生物菌落形态与其他微生物的不同之处, 对于初步快速判定致病微生物有着重要意义, 本研究利用选择性培养基培养 5

*通讯作者: 贺炎娜, 主要研究方向为微生物检验与分析。E-mail: 543296763@qq.com

*Corresponding author: HE Yan-Na, Mengniu Dairy (Jiaozuo) Co., Ltd., Jiaozuo 454000, China. E-mail: 543296763@qq.com

种菌株,根据其生化特性如利用糖及其特定分解某些物质的程度,由此借助如酚红等指示剂使其在培养基上呈现不同的颜色、形状等菌落形态,从而分析出该菌株的生长情况及对培养基的选择性,由此来初步鉴定食品中的致病微生物,以期提高鉴别致病菌的效率。

2 材料与方法

2.1 材料

标准菌株:鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、大肠埃希氏菌 ATCC25922、福氏志贺氏菌 ATCC356、金黄色葡萄球菌 ATCC6538[美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)];单核细胞增生李斯特氏菌 CICC21635[中国工业微生物菌种保藏管理中心(China center of industrial culture collection, CICC)]。

营养肉汤培养基、营养琼脂、亚硫酸铋(bismuth sulfite, BS)琼脂[1]、沙门氏菌显色培养基、木糖赖氨酸脱氧胆盐(xylose lysine deoxycholate, XLD)琼脂[1]、HE 琼脂[1]、结晶紫中性红胆盐(violet red bile agar, VRBA)琼脂[9]均购自北京陆桥技术股份有限公司。

2.2 实验仪器

SX-700 高压灭菌器(日本 TOMY Seiko 公司);HR40-IIA2 生物安全柜(青岛海尔特种电器有限公司);DPX-9272B-1 恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司);玻璃培养皿、18 mm×180 mm 试管、接种针、HM-3000C 红外灭菌器(杭州奥盛仪器有限公司)。

2.3 实验方法

参照 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》^[1], GB 4789.5-2012《食品安全国家标准 食品微生物学检验志贺氏菌检验》^[2], GB 4789.10-2016《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》^[3], GB 4789.30-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验》^[4]方法。

2.3.1 菌种的活化

从 ATCC 或 CICC 菌种保藏机构购买标准菌株,严格

按照菌株操作流程活化标准菌株。实验室购买 MAST CRYOBANK 菌种保藏管按照说明将活化后的菌株保存在保藏管中作为标准储备菌株,贮存在(-20±2) °C 的专用冰箱中^[5-9]。

2.3.2 菌种的复活

将标准储备菌株分别取出放置在营养肉汤(36±1) °C 培养(18~24) h,各菌株在营养肉汤里均呈浑浊生长^[10-15]。

2.3.3 划线分离

将上述肉汤中的培养物分别划线于亚硫酸铋琼脂、沙门氏菌显色培养基、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂、HE 琼脂、结晶紫中性红胆盐琼脂上,亚硫酸铋琼脂于(36±1) °C 培养(40~48) h,其余培养基于(36±1) °C 培养(18~24) h。

3 结果与分析

3.1 营养琼脂

各菌株在不同培养基上的生长情况见表1。营养琼脂在试验中主要起纯化的作用,由于营养琼脂培养基为非选择性增菌培养基,故实验中的菌株均为乳白色,从菌落形态上无法进行区分。

3.2 亚硫酸铋琼脂

表1中,鼠伤寒沙门氏菌在亚硫酸铋琼脂平板上的菌落形态为菌落为黑色有金属光泽,周围培养基呈棕色。大肠埃希氏菌和福氏志贺氏菌生长受抑制,少量菌落为灰白色。金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特氏菌不生长。由于亚硫酸铋琼脂培养基中的煌绿和亚硫酸钠能抑制革兰氏阳性菌,在日常检测中可通过亚硫酸铋琼脂平板排除金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌等革兰氏阳性菌。

3.3 沙门氏菌显色培养基

沙门氏菌显色培养基除满足沙门氏菌生长需要外还可抑制革兰氏阳性菌的生长(表1),沙门氏菌在该培养基上生长时产生特异性脂酶,与培养基中的显色底物作用使得菌落呈现紫红色,鼠伤寒沙门氏菌在沙门氏菌显色培养基上的菌落形态为紫红色菌落、圆形、湿润光滑;大肠埃希氏菌的菌落形态为蓝绿色、圆形、湿润光滑;而大肠埃希

表1 各菌株在不同培养基上的生长情况
Table 1 Growth of each strain on different media

鼠伤寒沙门氏菌	乳白	黑色有金属光泽	紫红色	粉红色带黑色中心	蓝绿色带黑色中心	灰白色
大肠埃希氏菌	乳白	灰白色	蓝绿色	黄色	黄色	紫红色周围有红色的胆盐沉淀环
福氏志贺氏菌	乳白	灰色	灰白色、半透明	粉红色至无色、半透明	灰绿色、半透明	灰白色
金黄色葡萄球菌	乳白	不生长	不生长	不生长	黄色	不生长
单核细胞增生李斯特氏菌	乳白	不生长	不生长	不生长	不生长	不生长

氏菌在结晶紫中性红胆盐琼脂上菌落形态为紫红色周围有红色的胆盐沉淀环,日常检测过程中可以结合沙门氏菌显色培养基和结晶紫中性红胆盐琼脂上的菌落形态将大肠杆菌类与沙门氏菌加以区分。福氏志贺氏菌在沙门氏菌显色培养基上的菌落形态为灰白色、圆形光滑;金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特氏菌在沙门氏菌显色培养基上不生长。

3.4 木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂

木糖、乳糖、蔗糖作为该培养基的鉴别系统,鼠伤寒沙门氏菌在木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂上的菌落形态为粉红色带黑色中心(表 1);大肠埃希氏菌菌落形态为黄色,周围培养基也为黄色,因大肠埃希氏菌发酵糖类,产酸量大,致使培养基颜色变黄。福氏志贺氏菌的菌落形态为粉红色至无色、半透明;去胆酸钠抑制革兰氏阳性菌故金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特氏菌不生长,利用该培养基可抑制革兰氏阳性菌、区分沙门氏菌和其他肠道菌。

3.5 HE 琼脂

鼠伤寒沙门氏菌在 HE 琼脂上的菌落形态为蓝绿色带黑色中心(表 1),大肠埃希氏菌的菌落形态为黄色,周围培养基也为黄色;福氏志贺氏菌菌落形态为灰绿色、半透明,金黄色葡萄球菌菌落为黄色,生长受抑制。单核细胞增生李斯特氏菌不生长,培养基中的蔗糖、水杨素、乳糖能将发酵糖类和未发酵糖类的细菌区分:前者为橘黄色后者为无色菌落,大肠菌群的菌落周围有明显的胆酸盐沉淀环。

3.6 结晶紫中性红胆盐琼脂

鼠伤寒沙门氏菌在结晶紫中性红胆盐琼脂上的菌落形态为灰白色(表 1);大肠埃希氏菌的菌落形态为紫红色周围有红色的胆盐沉淀环;福氏志贺氏菌的菌落为灰白色、半透明菌落;金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特氏菌在此培养基上不生长。结晶紫中性红胆盐琼脂含有胆盐可抑制革兰氏阳性菌的生长。

4 结 论

1) 大肠埃希氏菌会与其他致病菌混淆,可以通过结晶紫中性红胆盐琼脂将其区分。志贺氏菌在培养基上菌落基本均为半透明,体现的均为培养基本身的颜色。

2) 亚硫酸铋琼脂的选择性较强,鼠伤寒沙门氏菌在该培养基上长势良好,其余均被抑制生长。

3) 通过 5 种菌株在 6 种不同培养基上的菌落形态可以看出:微生物在特定的培养基中生长,生成不同的菌落特征,通过肉眼观察这些微生物的菌落形态可对未知菌进行初步判定。对于选择性较强的培养基,可以快速筛选特定菌落,而非目标不生长,可在短时间内判定微生物,尤其是通过致病类微生物在不同培养基上的菌落形态初步快速判定致病种类,缩短检测时间,对食品检验具有重要意义。

参考文献

- [1] 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].
GB 4789.4-2016 National Food Safety Standard-Food microbiological examination-Salmonella examination [S].
- [2] GB 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验[S].
GB 4789.5-2012 National Food Safety Standard-Food microbiological examination-Shigella examination [S].
- [3] GB 4789.10-2016 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[S].
GB 4789.10-2016 National Food Safety Standard-Food microbiological examination-Staphylococcus aureus examination [S].
- [4] GB 4789.30-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].
GB 4789.30-2016 National Food Safety Standards-Food microbiological examination-Listeria monocytogenes examination [S].
- [5] GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求[S].
GB 19489-2008 Laboratories-General requirements for biosafety [S].
- [6] GB 4789.1-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验总则[S].
GB 4789.1-2016 National food safety standard-General rules for food microbiology [S].
- [7] GB/T 27405-2008 实验室质量控制规范 食品微生物检测[S].
GB/T 27405-2008 Criterion on quality control of laboratory-Microbiological testing of food [S].
- [8] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National Food Safety Standards-Microbiological examination of food-Determination of colony count [S].
- [9] GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S].
GB 4789.3-2016 National food safety standards-microbiological examination of food-enumeration of Coliforms [S].
- [10] GB 4789.38-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数[S].
GB 4789.38-2012 National food safety standards-Microbiological examination of food-Enumeration of Escherichia Coli [S].
- [11] 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].
GB 4789.38-2013 National Food Safety Standards-Quality requirements for food microbiological-Examination media and reagents [S].
- [12] 柳宏斌,胡鹏,王银平. 浅议食品微生物检验及其质量控制[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(9): 2624-2628.
Liu HB, Hu P, Wang YP. Discussion on the inspection and quality control of microorganism in food [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(9): 2624-2628.
- [13] 杜亚琼,胡飞杰,祝晨辰. 食品相关产品微生物检验的质量控制[J]. 食品安全质量检测学报,2018,9(22): 6049-6054.
Du YQ, Hu FJ, Zhu CC, Quality control of the food-related products microbiological test [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(22): 6049-6054.
- [14] 陈玉婷,程楠,许文涛. 食源性致病微生物的检测新技术[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(9): 3405-3413.
Chen YT, Cheng N, Xu WT, Novel technologies for foodborne pathogenic microorganism detection [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(9): 3405-3413.

[15] 姜彦芬, 王建昌, 孙晓霞, 等. 不同分离培养基检测食品中沙门氏菌效果的比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 1025-1029.
 Jiang YF, Wang JC, Sun XX, *et al.* Performance comparison of different culture mediums for detection of Salmonella in food [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(3): 1025-1029.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



贺炎娜, 主要研究方向为微生物方面的研究与检测。
 E-mail: 543296763@qq.com



“茶学研究” 专题征稿函

茶叶源于中国, 与咖啡、可可并称为世界三大饮料。茶叶可鲜食, 也可以加工精制备用, 具有降压、提神等多种保健功能, 且含有多种有机化学成分和无机矿物元素。国内外对茶叶市场需求稳定增长, 我国的茶产业增长潜力巨大, 茶已成为社会生活中不可缺少的健康饮品和精神饮品。

鉴于此, 本刊特别策划了“茶学研究”专题, 主要围绕茶叶的贮藏保鲜、精深加工、品质评价、生物化学和功能性成分、香气成分分析、污染物分析检测、茶树生长代谢、茶叶资源的质量标准化等方面展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2020 年 4 月出版, 请在 2020 年 3 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明茶学研究专题)

E-mail: jfoodsqa@126.com(注明茶学研究专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部