

食品和水中大肠埃希氏菌验证方法的比较

许晓琳¹, 汪红梅^{1*}, 何芙蓉¹, 凌程江¹, 武婷敏¹, 秦敬波², 敦萌², 付建瑞³

(1. 杭州海润泰合检测技术有限公司, 杭州 310004; 2. 青岛海润农大检测有限公司, 青岛 266109;
3. 潍坊海润华辰检测技术有限公司, 潍坊 261100)

摘要: **目的** 探讨 IMViC 检测实验培养基在大肠菌群验证实验中的适用性, 优选相对快速确证为大肠菌群的培养基。**方法** 比较 IMViC 检测实验培养基与国标法中验证实验所用培养基测定大肠埃希氏菌以及食品、生活饮用水、天然饮用矿泉水中大肠菌群不同时段的结果, 对比所有样本确证为大肠菌群所需时间。**结果** 测定大肠埃希氏菌以及食品、生活饮用水、天然饮用矿泉水中大肠菌群时, IMViC 检测实验培养基 6 h 测定结果与国标法最终结果均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** IMViC 检测实验培养基适用于大肠菌群验证试验, 可根据实验室检测需求选择适用于大肠菌群快速检测实验的培养基。

关键词: 大肠菌群; 验证试验; 快速; 食品卫生

Comparison of the methods for the confirmation of *Escherichia coli* in food and water

XU Xiao-Lin¹, WANG Hong-Mei^{1*}, HE Fu-Rong¹, LING Cheng-Jiang¹, WU Ting-Min¹,
QIN Jing-Bo², GUO Meng², FU Jian-Rui³

(1. Hangzhou Harrens-TH Inspection Testing & Technology Co., LTD., Hangzhou 310004, China; 2. Qingdao Harrens-QAU Testing LTD., Qingdao 266109, China; 3. Weifang Harrens-HC Testing & Technology Co., LTD, Weifang 261100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the applicability of IMViC test medium in the experiment of coliform group confirmation, and to select the medium that can confirm coliform group relatively quickly. **Methods** The results of different periods of time of coliform group in IMViC test medium and national standard method were compared, and the time needed for all samples to confirm coliform group was compared. **Results** There was no significant difference ($P>0.05$) between the results of IMViC test medium for 6 hours and the final results of national standard method in the determination of *Escherichia coli*, food, drinking water and natural mineral water. **Conclusion** IMViC test medium is suitable for coliform group verification experiment, and the medium suitable for coliform group rapid verification experiment can be selected according to the needs of laboratory test.

KEY WORDS: coliforms; verification test; fast; the food hygiene

1 引言

大肠菌群(coliforms)是在一定条件下能发酵乳糖、产气产酸的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽胞杆菌^[1], 包括肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的埃希氏菌属

(*Escherichia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiellae*)等, 大肠菌群并非细菌学分类命名, 而是卫生细菌领域的用语, 它不代表某一个或某一属细菌, 而指的是具有某些特性的一组与粪便污染有关的细菌, 这些细菌在生化及血清学方面

*通讯作者: 汪红梅, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: Miawang@harrens.com

*Corresponding author: WANG Hong-Mei, Assistant Engineer, Hangzhou Harrens-TH Inspection Testing & Technology Co., Ltd., Hangzhou 310004, China. E-mail: Miawang@harrens.com

并非完全一致,是反应食品卫生情况的重要指标之一^[2]。作为世界大多数国家和组织评价食品卫生的重要安全性指标之一,食品中大肠菌群的数量,表明该食品被粪便污染的程度,也反映对人体健康危害性风险的大小。致病性大肠杆菌在环境中的传播严重威胁人和动物的健康,每年造成大量的感染和严重的经济损失^[3,4]。食品安全已然成为越来越受社会重视的问题,检测食品卫生指标是判断食品安全的主要手段。依据现行有效的国家标准,大肠菌群的检测标准包括 GB 4789.3-2016《食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[1],GB/T 4789.3-2003《食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定》^[5],GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》^[6],GB 8538-2016《饮用天然矿泉水检验方法》^[7]等。各检测标准采用的培养基各有不同,存在检验结果时间过长等问题,对于生产企业而言需要耗费更大量的成本。

本研究对比各检测标准中大肠菌群验证试验和IMViC 试验,在测定大肠埃希氏菌、食品中大肠菌群、生活饮用水中总大肠菌群、天然饮用矿泉水中大肠菌群不同时段的结果,以探讨 IMViC 试验在大肠埃希氏菌验证试验中的适用性。以期在优选培养基的情况下,能够更快速获得验证试验结果。

2 材料与方法

2.1 材料、仪器与试剂

2.1.1 材料与菌株

市售面包、散装熟食、瓶装天然饮用矿泉水,购自杭州下城某大型超市。

大肠埃希氏菌标准菌株(ATCC 25922,北京陆桥技术股份有限公司)。

2.1.2 仪器与设备

YXQ-LS-75SII立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);SHP-160型恒温生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司);HH-S21-6S 数显恒温水浴锅(上海跃进医疗器械有限公司);BSC-1600IIA2 生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);XSP-35-1600X 生物显微镜(Phenix 江西凤凰生物公司)。

2.1.3 商品化培养基与试剂

月桂基硫酸盐胰蛋白胨、结晶紫中性红胆盐琼脂培养基、煌绿乳糖胆盐培养基、乳糖胆盐发酵培养基、伊红美蓝琼脂培养基、乳糖发酵培养基、乳糖蛋白胨培养基、胰酪蛋白胨大豆琼脂培养基、1%蛋白胨水培养基(北京陆桥技术股份有限公司);MR-VP 培养基、西蒙氏枸橼酸盐琼脂、甲基红试剂、Kovacs 靛基质试剂、V-P 试剂盒、革兰氏染色液试剂盒(青岛海博生物技术有限公司);葡萄糖(分析纯,广东光华科技股份有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 菌株、待测样制备

将大肠埃希氏菌分别接种在胰酪蛋白胨大豆琼脂培养基平板上,36℃恒温生化培养箱培养,挑取菌落于无菌生理盐水管中,分别配制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液,将细菌悬液进行 10 倍比稀释至 10⁻⁸ 备用。将市售面包、散装熟食、瓶装天然饮用矿泉水、生活饮用水分别添加不用浓度的大肠埃希氏菌,制备成待测样品,如表 1 所示。

表 1 检测样品
Table 1 Test samples

样品编号	添加大肠埃希氏菌浓度/(CFU/g)	测试方法
A1	市售面包	编号 A、S 类: 面包、散装熟食 方法一: GB/T 4789.3-2003 ^[5] 方法二: GB 4789.3-2016 第一法 ^[1] 方法三: GB 4789.3-2016 第二法 ^[1]
A2	加浓度 10 菌的市售面包	
A3	加浓度 10 ² 菌的市售面包	
A4	加浓度 10 ³ 菌的市售面包	
A5	加浓度 10 ⁴ 菌的市售面包	
A6	加浓度 10 ⁵ 菌的市售面包	
S1	散装熟食	编号 W 类: 生活饮用水 方法一: GB/T 5750.12-2006 多管发酵法 ^[6]
S2	加浓度 10 菌的散装熟食	
S3	加浓度 10 ² 菌的散装熟食	
S4	加浓度 10 ³ 菌的散装熟食	
S5	加浓度 10 ⁴ 菌的散装熟食	
S6	加浓度 10 ⁵ 菌的散装熟食	
W1	生活饮用水	编号 Q 类: 瓶装天然饮用矿泉水 方法一: GB 8538-2016 多管发酵法 ^[7]
W2	加浓度 10 菌的生活饮用水	
W3	加浓度 10 ² 菌的生活饮用水	
W4	加浓度 10 ³ 菌的生活饮用水	
W5	加浓度 10 ⁴ 菌的生活饮用水	
W6	加浓度 10 ⁵ 菌的生活饮用水	
Q1	市售瓶装天然饮用矿泉水	
Q2	加浓度 10 菌的市售瓶装天然饮用矿泉水	
Q3	加浓度 10 ² 菌的市售瓶装天然饮用矿泉水	
Q4	加浓度 10 ³ 菌的市售瓶装天然饮用矿泉水	
Q5	加浓度 10 ⁴ 菌的市售瓶装天然饮用矿泉水	
Q6	加浓度 10 ⁵ 菌的市售瓶装天然饮用矿泉水	

2.2.2 测试方法

将样品分别按照相应标准进行实验操作及实验结果判定, 对应标准方法如表 1 所示; 验证试验分别在 4、6、8、18、22、24、48 h 观察, IMViC 试验分别在 2、4、6、18、24 h 观察试管生长情况。

2.2.3 数据处理

使用 SPSS 软件 Wilcoxon 配对法对数据进行分析, $P > 0.05$ 结果无显著性差异。

3 结果与分析

3.1 方法的比较

本次实验采用大肠埃希氏菌, 其 IMViC 试验为 + + — — 或 - + - -^[8]。如表 2 所示, 在市售面包的添加试验中, 靛基质试验 24 h, 甲基红试验 18 h, 大肠埃希氏菌的验证试验即能得到阳性结果, 而国标方法大肠菌群的验

证试验则需要 48 h, IMViC 试验相较于国标验证试验耗时更短, 能够更快得到验证结果, IMViC 检测实验培养基 6 h 测定结果与国标法最终结果均无显著性差异($P > 0.05$)。经对比可知验证试验反应速度受含菌量影响, 而市面上的食品种类多, 且一些培养基受样品颜色影响, 不易判断实验现象, 如原本颜色较深或含食用色素的食品^[9]。

3.2 方法分析

IMViC 试验: 包括靛基质(吲哚)实验、甲基红实验、VP 实验、柠檬酸盐利用试验, 常用于鉴定肠道杆菌。尤其对形态、革兰染色反应和培养特性相同或相似的细菌更为重要。发酵法实验中, 初发酵阳性管, 在验证试验后, 可能成为阴性, 且初发酵与验证试验相差较大。平板计数实验中, 大肠菌群受样品生产工艺、储存条件、培养基成分等影响, 常出现生长缓慢、菌落不典型等问题, 影响检测人员的视觉判断。因此, 上述两类试验, 验证试验在检验工作中是必需的。

表 2 比较大肠菌群、总大肠菌群测定耗时
Table 2 Time required for comparative detection of coliforms

样品 编号	国标验证试验结果与时间/h						靛基质试验结果与时间/h						甲基红实验结果与时间/h					
	方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三
A1	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
A2	+	48	+	48	+	48	+	24	+	24	+	24	+	18	+	18	+	18
A3	+	48	+	48	+	48	+	22	+	22	+	22	+	18	+	18	+	18
A4	+	42	+	24	+	24	+	18	+	18	+	18	+	6	+	6	+	6
A5	+	40	+	24	+	24	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6
A6	+	36	+	24	+	24	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6
S1	+	48	+	48	-	0	+	24	+	24	+	24	+	18	+	18	+	18
S2	+	48	+	48	+	48	+	24	+	24	+	24	+	18	+	18	+	18
S3	+	48	+	48	+	48	+	22	+	22	+	22	+	18	+	18	+	18
S4	+	42	+	24	+	24	+	18	+	18	+	18	+	6	+	6	+	6
S5	+	40	+	24	+	24	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6
S6	+	36	+	24	+	24	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6	+	6
W1	-	0	/	/	/	/	-	0	/	/	/	/	/	0	/	/	/	/
W2	+	48	/	/	/	/	+	18	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
W3	+	40	/	/	/	/	+	18	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
W4	+	40	/	/	/	/	+	8	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
W5	+	40	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
W6	+	40	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
Q1	-	0	/	/	/	/	-	0	/	/	/	/	-	0	/	/	/	/
Q2	+	48	/	/	/	/	+	18	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
Q3	+	48	/	/	/	/	+	18	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
Q4	+	48	/	/	/	/	+	8	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
Q5	+	24	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/
Q6	+	24	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/	+	6	/	/	/	/

注 1: +、- 分别代表阳性和阴性。
注 2: VP 实验和柠檬酸盐实验均为阴性不做数据整理。

若在观察乳糖蛋白胨管时有可疑情况,可适当延迟培养时间,防止漏读一些发酵较慢的菌^[10]。肠杆菌科的细菌在糖代谢过程中,分解葡萄糖,产生丙酮酸,丙酮酸再被分解,生成甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸,甲基红试验能够快速提供参考结果。有研究表明,大肠埃希氏菌属中有迟发酵乳糖型菌株,分离得到的菌株均能利用葡萄糖产气产酸,甲基红实验结果不受此类特异型菌株影响^[11]。

4 结论与讨论

大肠菌群检验中常用的抑菌剂有胆盐、十二烷基硫酸钠、煌绿(亮绿)、结晶紫(甲紫、龙胆紫)、孔雀绿、伊红、美蓝等。抑菌剂的主要作用是抑制其他杂菌,特别是革兰氏阳性菌的生长。抑菌剂虽可抑制样品中的一些杂菌,而有利于大肠菌群细菌的生长和挑选,但对大肠菌群中的某些菌株有时也产生一些抑制作用^[12]。很多食品加工过程中采用了热处理的工艺,导致其中尚存的微生物处于亚致死受损状态,促使受损的微生物修复和复苏,是试验结果准确的关键。亚致死性损伤菌难以彻底消除,会造成极大的食品安全隐患,已引起高度重视,成为近年来的研究热点。大肠杆菌是一种重要的肠道共生菌,它的状态对于理解肠道环境,以及食品-肠道-健康内在关系具有重要意义^[13,14]。

大肠菌群的生长繁殖是以几何级数递增的,所得数据的发散性较大^[15]。我国现行检验标准中并无规定大肠菌群损伤菌的限量指标,适时修订标准方法,推行快速检测方法对保障食品安全具有重要意义。甲基红试验虽然不能代替国标中的验证试验,但能快速的为实验员提供参考结果以便生产企业决定对应产品的处理方式。

参考文献

- [1] 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 standard-Food microbiological examination-Enumeration of coliforms [S].
- [2] 杜连平, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 轻工业出版社, 2008.
Du LP, Lu FP. Microbiological experimental technology [M]. Beijing: Light Industry Press, 2008.
- [3] Mead PS, Slutsker L, Ditz V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [4] 姜勇, 刘振涛, 马淑棉, 等. 不同接种方式对食品中热损伤大肠菌群检测的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3745-3748.
Jiang Y, Liu ZT, Ma SM et al. Comparative study on detection of coliforms in food with different inoculation methods [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3745-3748.
- [5] GB/T 4789.3-2003 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定[S].
GB/T 4789.3-2003 Food hygiene microbiological test-Coliforms determination [S].
- [6] GB/T 5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法 微生物指标[S].
GB/T 5750.12-2006 Standard test method for drinking water-Microbial

index [S].

- [7] GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法[S].
GB 8538-2016 National food safety standard-Test method for drinking natural mineral water [S].
- [8] 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 standard-Food microbiological examination-Count of *Escherichia coli* [S].
- [9] 张凤英, 朱克永. 成品酱油检测大肠菌群的质疑与研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 124-127.
Zhang FY, Zhu KY. Query and Research on the detection of coliforms in finished soy sauce [J]. Chin Condiments, 2019, 44(9): 124-127.
- [10] 林铜锐, 庞晓林, 丁秀琼, 等. 生活饮用水中菌落总数和大肠埃希菌检测能力验证[J]. 检验检疫学刊, 2018, (4): 23-25.
Lin JR, Pang XL, Ding XQ, et al. Verification of total bacterial count and detection ability of *Escherichia coli* in drinking water [J]. J insp Quar, 2018, (4): 23-25.
- [11] 成大荣, 朱善元, 钱金梅, 等. 不发酵或迟发酵乳糖型禽大肠埃希菌的分离鉴定[J]. 动物医学进展, 2009, 30(5): 28-31.
Cheng DR, Zhu SY, Qian JM, et al. Isolation and identification of Avian *Escherichia coli* with no or weak ability in lactose ferment [J]. Progress Vet Med, 2009, 30(5): 28-31.
- [12] 陆蓓. 增菌液中抑菌剂用量问题的探讨[J]. 中成药杂志, 1998, (3): 15-16.
Lu P. Discussion on the dosage of bacteriostatic in the enrichment solution [J]. J Chin Patent Med, 1998, (3): 15-16.
- [13] 段学辉, 魏斌, 傅奇, 等. 食品微生物检验中损伤大肠杆菌的修复研究[J]. 食品工业, 2011, (6): 89-91.
Duan XH, Wei B, Fu Q, et al. Study on the repair of damaged *Escherichia coli* in food microbiological examination [J]. Food Ind, 2011, (6): 89-91.
- [14] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed acrossage and geography [J]. Nature, 2012, 486: 222-227.
- [15] 姚丽芳, 朱洪坤, 李蔚, 等. 大肠菌群 MPN 计数法不确定度评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 193-196
Yao LF, Zhu HK, Li W, et al. Uncertainty evaluation of MPN counting method for coliforms [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(1): 193-196.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



许晓琳, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: Nikixu@harrens.com



汪红梅, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: Miawang@harrens.com