

# 饮用天然矿泉水中疑似粪链球菌的鉴定与分析

崔伟佳<sup>1</sup>, 郭庆龙<sup>2</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 赵峰<sup>1</sup>, 张谦<sup>1</sup>, 刘宏玉<sup>1</sup>, 崔淑华<sup>1\*</sup>

(1. 青岛海关技术中心, 青岛 266002; 2. 黄岛海关, 黄岛 266520)

**摘要:** **目的** 检测某品牌饮用天然矿泉水样品中是否含有粪链球菌, 并对出现的疑似菌落进行分析。**方法** 按照 GB 8538.56-2016《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法》中粪链球菌的检测方法对样品进行检测, 对疑似菌落进行确证性实验, 并通过 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统对疑似菌进行鉴定。

**结果** 滤膜上出现典型红色菌落, 经确证性实验确认为非粪链球菌; 经 VITEK 2 COMPACT 鉴定, 该菌为粘质沙雷氏菌。**结论** 样品中的疑似菌落非粪链球菌而是粘质沙雷菌。

**关键词:** 饮用天然矿泉水; 粪链球菌; 粘质沙雷菌; VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统

## Identification and analysis of suspected *Enterococcus faecalis* in drinking natural mineral water

CUI Wei-Jia<sup>1</sup>, GUO Qing-Long<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, ZHAO Feng<sup>1</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>,  
LIU Hong-Yu<sup>1</sup>, CUI Shu-Hua<sup>1\*</sup>

(1. Qingdao Customs Technical Center, Qingdao 266002, China; 2. Huangdao Customs, Huangdao 266520, China)

**ABSTRACT: Objective** To detect the presence of *Enterococcus faecalis* in a natural mineral water sample and analyze the suspected bacterial colonies. **Methods** The samples were tested in accordance with the test method specified in GB 8538-2016 *National food safety standard-Inspection of natural mineral water for drinking*, and the suspected bacterial colonies were confirmed by VITEK 2 COMPACT automatic microbial identification system.

**Results** The typical red colony appeared on the membrane, which was confirmed as non-*streptococcus faecalis* by confirmative test. VITEK 2 COMPACT identified the bacteria as *Serratia marcescens*. **Conclusion** The suspected colony of *Enterococcus faecalis* in the samples is not *Enterococcus faecalis* but *Serratia marcescens*.

**KEY WORDS:** drinking natural mineral water; *Enterococcus faecalis*; *Serratia marcescens*; VITEK 2 COMPACT automatic microbial identification system

## 1 引言

粪链球菌(*Enterococcus faecalis*), 又称粪肠球菌<sup>[1]</sup>, 属于肠球菌属, 是一种兼性厌氧型革兰氏阳性菌, 菌体形态呈链状或球状, 无芽孢, 无荚膜<sup>[2]</sup>, 对环境具有极强的适应力和抵抗力。粪链球菌为条件致病菌<sup>[3]</sup>, 在水、土壤、人畜体内及其粪便中广泛存在<sup>[4]</sup>。粪肠球菌通常被认为是

人类在内所有陆生动物肠道内共生的一种细菌<sup>[5]</sup>, 一般认为对人体无害, 但近年研究已证实, 部分粪链球菌具有毒力<sup>[6]</sup>基因, 可引起广泛的感染, 如尿路感染、败血症、脑膜炎、化脓性腹部感染、心内膜炎和腹泻发烧等<sup>[7,8]</sup>。

本研究采用国标法对饮用天然矿泉水中的粪链球菌进行检测, 并结合 VITEK 2 COMPACT 快速鉴定, 提高实验室对饮用天然矿泉水中粪链球菌的检测能力, 为今后滤

\*通讯作者: 崔淑华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品农产品安全检测。E-mail: ftalab@163.com

\*Corresponding author: CUI Shu-Hua, Ph.D, Senior Engineer, Qingdao Customs Technical Center, Qingdao 266002, China. E-mail: ftalab@163.com

膜法检测粪链球菌提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 样品

某品牌饮用天然矿泉水, 18.9 L×5 桶。

#### 2.1.2 标准菌株

粪链球菌 ATCC29212、大肠埃希氏菌 ATCC25922(美国 Microbiologics 公司)。

#### 2.1.3 主要培养基与试剂

KF 链球菌琼脂培养基、脑-心浸萃液态培养基、3% 过氧化氢试剂、0.45 μm 无菌滤膜(北京陆桥技术股份有限公司); GN 鉴定卡(法国生物梅里埃公司)。

#### 2.1.4 仪器

SPX-150B-Z 生化培养箱、YXQ-LS-75G 高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); HR40-IIA2 生物安全柜(青岛海尔特种电器有限公司); C6 水中微生物过滤系统(杭州吉沃科技有限公司); VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 水样过滤

在 100 级洁净工作台上进行过滤操作。用无菌镊子夹取 0.45 μm 无菌滤膜边缘部分, 网格面朝上, 放置于已灭菌的滤床上, 固定好无菌滤器。采用无菌方式打开样品, 倒入 250 mL 水样于无菌滤器中进行抽滤。过滤完成后, 将过滤后的滤膜直接转移到 KF 链球菌琼脂培养基上, 网格面朝上, 小心贴合放置, 避免在滤膜与培养基之间夹留气泡。其他 4 个样品操作同上, 5 个样品编号 1~5。

#### 2.2.2 培养

将 KF 培养皿倒置, 36 °C±1 °C 培养 48 h。

#### 2.2.3 计数

粪链球菌菌落在滤膜上应呈现大小不等的红色或粉红色菌落。挑取 5 个可疑菌落(不足 5 个则全挑)进行革兰

氏染色并镜检, 计数典型菌落数。

检验及计数过程中以粪链球菌 ATCC29212 作为阳性对照; 以大肠埃希氏菌 ATCC25922 作为阴性对照。

#### 2.2.4 确证性实验

从滤膜上挑取可疑菌落, 接种到脑-心浸萃琼脂培养基斜面上, 在 36 °C±1 °C 培养 24~48 h。根据实验结果选择进行过氧化氢酶实验、脑-心浸萃液态培养基及胆汁液态培养基生长实验等确认。

## 3 结果与分析

### 3.1 观察计数

培养后经过观察计数, 滤膜上的菌落生长情况如表 1 所示。

由表 1 可知, 样品 3、4、5 对应的滤膜上有菌落生长, 非典型菌落计数分别为 2、6、1, 非典型菌落为淡黄色, 形态较大不定形, 边缘整齐, 直径约 3~4 mm, 表面湿润。只有样品 3 对应的滤膜上有大量红色典型菌落, 菌落形态大小不一。大量圆形、红色菌落, 直径约 0.5~1 mm, 表面湿润; 大量圆形、粉红菌落, 直径约 1~2 mm, 表面湿润; 少量红色及粉红色方形菌落, 沿滤膜网格生长, 表面湿润; 还有少量形态较大不定形的粉红菌落, 直径约 3~4 mm, 表面湿润。

### 3.2 确证性实验

挑取可疑菌落接种于脑-心浸萃琼脂斜面培养基, 适宜条件下培养后, 从中挑取典型培养物到无菌载玻片上, 在涂有新鲜菌苔的载玻片上加入几滴 3% 过氧化氢酶后, 观察有无气泡产生。若无气泡, 则为过氧化氢酶阴性, 需进行进一步的确证性实验; 若有气泡, 则为过氧化氢酶阳性, 与粪链球菌不符, 确证实验到此为止。

从滤膜中挑取可疑菌落分别进行确证性实验, 结果如表 2 所示。

表 1 滤膜菌落生长情况统计  
Table 1 Statistics of bacterial colony growth

样品编号	稀释倍数	培养时间/h	典型菌落数(红色或粉红)/(CFU/100 mL)	非典型菌落数(淡黄色)/(CFU/100 mL)
1	原液	48	0	0
2	原液	48	0	2
3	原液	48	62	6
4	原液	48	0	1
5	原液	48	0	0

表 2 确证性实验结果统计  
Table 2 Statistics of confirmatory test results

可疑菌落	革兰氏染色	脑-心浸萃琼脂生长实验	过氧化氢酶实验
1	革兰氏阴性	生长	阳性
2	革兰氏阴性	生长	阳性
3	革兰氏阴性	生长	阳性
4	革兰氏阴性	生长	阳性
5	革兰氏阴性	生长	阳性

由表 2 可知,挑取的疑似菌落皆能在脑-心浸萃琼脂斜面培养基上生长,但皆为革兰氏阴性菌且过氧化氢酶实验为阳性;而粪链球菌为革兰氏阳性球菌且过氧化氢酶实验为阴性,因此,该可疑菌落不属于粪链球菌。

### 3.3 VITEK 2 COMPACT 鉴定

鉴于在日常实验中极少遇到粪链球菌疑似菌落,此次实验过程较为罕见,为进一步了解该疑似菌落,决定对该菌进行 VITEK 2 COMPACT 鉴定。

挑取红色可疑菌落接种于营养琼脂进行纯化,于 36 °C 培养 24 h,生长出粉红、圆形菌落。挑取适量菌落,制成 0.5 ~ 0.63 麦氏浊度的菌悬液,填充到 GN 卡后装载上机鉴定。经鉴定,该菌为粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*),可能性(probability)为 98%。

据悉,粘质沙雷菌为革兰氏阴性短杆菌,无荚膜,有鞭毛,能运动,部分粘质沙雷菌可产生红色或粉红色的脂溶性色素,称为灵菌红素<sup>[9]</sup>(prodigiosins)。粘质沙雷菌可分为产色素菌株和不产色素菌株,在一定条件下可以进行转变,对温度敏感,在 20~28 °C 时可产生红色色素,温度继续升高,产色素能力逐渐消失,37 °C 时几乎不产色素,恢复温度可重新产色素<sup>[10]</sup>。赵银娟等<sup>[11]</sup>曾在实验过程中发现一株适应性比较强的沙雷氏菌,在较高温度下如 35 °C 甚至 37 °C 也能产生少量灵菌红素。本次实验在纯化过程中将其置于 36 °C 培养,也产生了红色色素,推测这可能是一株产灵菌红素能力较强的粘质沙雷菌。

## 4 结论与讨论

水与人们的生活息息相关,非常有必要保证水质的卫生。粪链球菌作为一种重要的污染指示菌<sup>[12]</sup>,能客观地反映水质的卫生状况<sup>[13]</sup>,对饮用天然矿泉水的水质状况起到了重要的监测作用。现行标准 GB 8537-2018《食品安全国家标准 饮用天然矿泉水》<sup>[14]</sup>依然将粪链球菌纳入检验指标菌且限量要求不得检出。由此可见,监测饮用天然矿泉水中的微生物指标,如大肠菌群、粪链球菌、铜绿假单胞菌等<sup>[15]</sup>具有重要意义。

虽然本次实验中的粪链球菌可疑菌落经确证性实验

证明不属于粪链球菌,且经 VITEK 2 COMPACT 鉴定为粘质沙雷菌,但其作为干扰菌,仍对以后的检测工作有着借鉴意义。在粪链球菌的检测过程中,需要注意对可疑菌落加以甄别,并通过确证性实验予以确认。在对可疑菌落进行确证性实验的同时,必要时可同时辅以微生物鉴定系统(如 VITEK 2 COMPACT)进行确认,采用多种鉴定方法有助于提高检测结果的准确性,避免造成漏检。

### 参考文献

- [1] 于泓洋,刘燕霏,杨建德.粪链球菌的分离与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2012,(17):97-98.  
Yu HY, Liu YF, Yang JD. Isolation and identification of *Streptococcus faecalis* [J]. Heilongjiang Anim Sci Veter Med, 2012, (17): 97-98.
- [2] 祝钰森,吕潇颖,李静雅,等.粪肠球菌在口腔及全身系统性疾病中的致病相关因素及其机制的研究进展[J].国际口腔医学杂志,2020,47(2):225-234.  
Shui YS, Lv XY, Li JY, et al. Pathogenic factors and mechanisms of *Enterococcus faecalis* in oral and systemic diseases [J]. Int J Stomatol, 2020, 47(2): 225-234.
- [3] 彭子欣,张思雨,闫韶飞,等.北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌种水平鉴定及耐药特征[J].中国食品卫生杂志,2017,29(3):283-288.  
Peng ZX, Zhang SY, Yan SF, et al. The species-level identification and antimicrobial susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. of raw pork collected from a free trade market in Beijing [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(3): 283-288.
- [4] 周玲,李秀贵,王子桂.一起食用甜白酒所致粪链球菌食物中毒[J].中国卫生检验杂志,1991,(3):180-181.  
Zhou L, Li XG, Wang ZG. Food poisoning caused by *Streptococcus faecalis* consumed together with sweet liquor [J]. Chin J Health Lab Technol, 1991, (3): 180-181.
- [5] 陈夏威,蔡春生,何彬洪,等.一起粪肠球菌引起食源性疾病暴发流行病学分析及分子溯源调查[J].中国食品卫生杂志,2020,32(1):99-102.  
Chen XW, Cai CS, He BH, et al. Epidemiological analysis and molecular traceability investigation of foodborne disease outbreak caused by *Enterococcus faecalis* [J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(1): 99-102.
- [6] 吴兰,竹莹园,刘燕霏,等.多重耐药性粪肠球菌的分离与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2019,(9):85-87,90,181.  
Wu L, Zhu KY, Liu YF, et al. Isolation and identification of multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* [J]. Heilongjiang Anim Sci Veter Med, 2019, (9): 85-87, 90, 181.
- [7] 成晓维,唐食明,游淑珠.水中粪链球菌的检测研究[J].科技资讯,2010,(15):223-225.  
Cheng XW, Tang SM, You SZ. Detection of *Streptococcus faecalis* in water [J]. Sci Technol Inform, 2010, (15): 223-225.
- [8] 范辉.一株致病性粪肠球菌的分离与鉴定[J].福建畜牧兽医,2019,41(3):13-15.  
Fan H. Isolation and identification of a pathogenic *Enterococcus faecalis* strain [J]. Fujian J Anim Husb Veter Med, 2019, 41(3): 13-15.
- [9] 李子武,张显,徐美娟,等.一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件[J].食品与生物技术学报,2012,(10):1018-1024.  
Li ZW, Zhang X, Xu MJ, et al. Screening and identification a *Serratia marcescens* strain producing red-pigment and preliminary study of the

- fermentation conditions [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2012, (10): 1018–1024.
- [10] 刘思航, 邹宜均, 常菲菲, 等. 一株高产灵菌红素粘质沙雷氏菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(1): 26–32.  
Liu SH, Zou YJ, Chang FF, *et al.* Isolation and identification of *Serratia marcescens* producing high levels of prodigiosin and its fermentation optimization [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, 24(1): 26–32.
- [11] 赵银娟, 杨韵, 吴小芹. 粘质沙雷氏菌 NJZT-1 产灵菌红素培养条件的优化[J]. *林业科技开发*, 2015, 29(5): 130–134.  
Zhao YJ, Yang Y, Wu XQ. Optimization of culture medium composition and culture conditions of *Serratia marcescens* for enhancing the production of prodigiosin [J]. *J Forest Sci Technol*, 2015, 29(5): 130–134.
- [12] 李飞, 吴清平, 张菊梅, 等. 矿泉水和山泉水中粪链球菌污染调查及主要污染菌株的 ERIC-PCR 分型研究[J]. *微生物学通报*, 2013, (5): 881–890.  
Li F, Wu QP, Zhang JM, *et al.* Studies on the contamination investigation and ERIC-PCR typing of *Enterococcus faecalis* in mineral and spring water [J]. *Microbiol China*, 2013, (5): 881–890.
- [13] 李娟, 张诗慧, 陈科, 等. 饮用天然矿泉水中粪链球菌检测的能力验证[J]. *食品安全导刊*, 2018, (15): 56, 58.  
Li J, Zhang SH, Chen K, *et al.* Verification of detection ability of *Streptococcus faecalis* in drinking natural mineral water [J]. *China Food Saf Magaz*, 2018, (15): 56, 58.
- [14] GB 8537-2018 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水[S].  
GB 8537-2018 National food safety standard-Drinking natural mineral water [S].
- [15] 邓梅清, 张菊梅, 郭伟鹏, 等. 矿泉水中铜绿假单胞菌污染状况调查研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(11): 2672–2673.  
Deng MQ, Zhang JM, Guo WP, *et al.* Study on contamination investigation of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water [J]. *Chin J Health Lab Technol*. 2009, 19(11): 2672–2673.

(责任编辑: 张晓寒)

## 作者简介



崔伟佳, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: micbio4789@163.com



崔淑华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品农产品安全检测。

E-mail: ftalab@163.com