

阪崎肠杆菌显色培养基的应用研究

卢勉飞¹ 蔡芷荷¹ 吴清平^{2*} 刘云林²

(1. 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510070)

(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

摘要: 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是新近引起广泛关注的一种危险的条件致病菌,主要存在于婴幼儿奶粉、婴幼儿补充食品中。由于目前日常使用的传统检验方法存在检测周期长等方面的不足之处,本实验室研究设计出一种新的显色培养基(HKMCES),通过与 OXOID 公司的同类产品(OXCES)比较,分别应用于质控菌株、污染样品和实际样品的测试,对这 2 种显色培养基的灵敏度、特异性、检测效果以及前增菌方法进行了初步评价。结果表明,合适的增菌方法更有利于样品中阪崎肠杆菌的检出,本实验室研制的显色培养基和 OXOID 公司的显色培养基均具有较好的选择性和特异性,检测效果相当。这种新的显色培养基能使检测周期缩短,具有较好的应用价值。

关键词: 显色培养基, 阪崎肠杆菌, 应用研究

Application of *Enterobacter sakazakii* Chromogenic Medium

LU Mian-Fei¹ CAI Zhi-He¹ WU Qing-Ping^{2*} LIU Yun-Lin

(1. Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: *Enterobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen which has been isolated at low levels from powdered infant formulas. As there are deficiencies as more time in the general method of isolation and identification of *Enterobacter sakazakii*, a new chromogenic medium(HKMCES) was designed in this assay. Through detecting the reference strains, artificieally contaminated samples and natural samples, the sensitivity, specificity, detection effect and the way of pre-enrichment of HKMCSE were studied and compared with OXCSE. The results showed that the isolation of *E. sakazakii* was more efficiency after adequate pre-enrichment was applied. HKMCSE had the same selectivity and highly specificity as OXCSE. In conclusion, *Enterobacter sakazakii* chromogenic medium were invaluable which may shorten the detection periods.

Keywords: Chromogenic media, *Enterobacter sakazakii*, Application study

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)是新近引起广泛关注的一种危险的条件致病菌,研究表明婴儿

配方奶粉是引起婴幼儿脑膜炎、败血症和坏死性结肠炎的主要感染渠道^[1-4]。因此对婴儿奶粉及制品中

基金项目: 广东省科技攻关项目(No. 2006B20530002); 广州市农业科技项目(No. GZCQC0602FG001C)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87688132; ✉: wuqp203@yahoo.com.cn, lumianf@163.com

收稿日期: 2009-05-18; 接受日期: 2009-07-14

阪崎肠杆菌进行监测十分重要。阪崎肠杆菌传统的检测方法需要分离培养、镜检观察、生化鉴定等多个步骤,检测周期长,整个过程大约 6 d~7 d,且操作复杂,已不能满足食品中病原菌快速检测的现实需要,同时传统结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂培养基(VRBGA)的选择效果不明显,可疑菌落不易识别,当有其它的肠道菌群存在时会影响阪崎肠杆菌的检出,给检测技术人员带来极大的工作量与不确定性^[1]。

为有效控制病原的发生和扩散,准确及时的检测手段是预防和控制阪崎肠杆菌传播的关键。近年来,PCR法、金标试纸法、免疫法和特异性的显色生化鉴定技术等快速检验方法,已广泛应用,使阪崎肠杆菌的快速检测有了很大发展。但是这些技术也存在一定缺陷,如需要一定的设备、技术要求高、操作复杂、检测费用昂贵等,在基层检测机构不易推广。应用显色培养基鉴定细菌是一种新的快速检测方法,通过在培养基中加入细菌特异性酶的显色底物,直接观察菌落颜色就可对菌种作出初步鉴定,具有快速、简便和经济的特点^[1,5,6]。本实验室应用自主研发的HKM阪崎肠杆菌显色培养基与国外同类商品化产品对标准菌株和婴儿配方奶粉以及其他样品进行了测试,系统地研究和比较了培养基的性能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) ATCC51329及HK7402、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*) CMCC49027、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*) CMCC49005、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC9027及ATCC27853、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) CMCC50115、粘质沙雷伯氏菌(*Serratia marcescens*) HK7121、粪肠球菌(*Streptococcus faecalis*) ATCC29212、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538。

1.1.2 培养基及试剂:HKM阪崎肠杆菌显色培养基(HKMCSE)由本实验室研制,OXOID阪崎肠杆菌显色培养基(OXCSE)由英国OXOID公司提供,缓冲蛋白胨水(BP)和改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(MLST)由广东环凯微生物科技有限公司提供。

API20E鉴定条由法国生物梅里埃公司提供。

1.1.3 样品:试验所用样品均采集于市内超市,共10份,其中:婴儿配方奶粉5份、白木耳1份、黑木耳1份、燕麦粉1份、玉米粉1份、营养米粉1份。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备:HKM阪崎肠杆菌显色培养基和OXOID阪崎肠杆菌显色培养基均按配制说明书制备成平板备用。

1.2.2 显色培养基特异性的验证:将阪崎肠杆菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、粘质沙雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌接种在营养琼脂复苏24 h后,分别划线接种HKM阪崎肠杆菌显色培养基平板和OXOID阪崎肠杆菌显色培养基平板,37℃培养18 h~24 h。观察不同细菌在显色培养基上的菌落特征,比较2种培养基对阪崎肠杆菌的特异性反应。

1.2.3 阪崎肠杆菌在显色培养基上生长率和灵敏度检验:按以下菌种的组合,分别用种环挑取新鲜斜面1环,加入到10 mL 0.85%生理盐水中配成原液,然后进行10倍梯度稀释,取 10^{-5} ~ 10^{-6} 浓度混合菌液各0.1 mL,分别涂布HKM阪崎肠杆菌显色培养基平板和OXOID阪崎肠杆菌显色培养基平板,37℃培养18 h~24 h。观察阪崎肠杆菌在2种显色培养基生长情况,并对其进行菌落计数,比较阪崎肠杆菌在2种显色培养基上的生长率。

菌种组合:

1) 阪崎肠杆菌 ATCC51329 + 鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50115 + 粘质沙雷伯氏菌 HK7121 + 金黄色葡萄球菌 ATCC6538 + 铜绿假单胞菌 ATCC9027 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922;

2) 阪崎肠杆菌 HK7402 + 奇异变形杆菌 CMCC49005 + 普通变形杆菌 CMCC49027 + 粪肠球菌 ATCC29212 + 铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2.4 人工污染样品中阪崎肠杆菌的检测:取已确认无阪崎肠杆菌污染的奶粉样品4种,每种按无菌操作各称取100 g共6份,分别加到含有900 mL无菌水或缓冲蛋白胨水培养基(BP)增菌液的三角瓶中,其中每2份添加同一浓度的阪崎肠杆菌,共3个稀释度,混合均匀,37℃培养18 h。从无菌水前增菌液中各取1 mL添加到已灭菌的10 mL肠道菌增菌肉汤(EE)中,37℃培养18 h;从BP前增菌液中各取1 mL添加到已灭菌的10 mL MLST肉汤中,44℃培

养 18 h; 各取 1 环二次增菌液, 划线接种 HKM 阪崎肠杆菌显色培养基平板和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基平板, 37℃ 培养 24 h ± 2 h。比较 2 种培养基的分离率与检出限。

1.2.5 实际样品中阪崎肠杆菌检测: 取 100 g 奶粉置于 900 mL BP 增菌液的三角瓶中, 其它样品取 25 g 经处理后置于 225 mL BP 增菌液的三角瓶中, 37℃ 培养 18 h; 从前增菌液中各取 1 mL 添加到已灭菌的 EE 肉汤和 MLST 肉汤中, 分别在 37℃ 和 44℃ 培养 18 h; 吸取奶粉二次增菌液 1 mL 用生理盐水制成不同浓度的稀释液, 选取合适的稀释浓度 0.1 mL, 分别接种于 HKM 阪崎肠杆菌显色培养基平板和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基平板上, 每种培养基接种 3 块平板, 用 L 形棒均匀涂布菌液, 37℃ 孵育 24 h, 观察可疑菌落的形态特征。另外把奶粉样品和其它样品的二次增菌液分别划线在 HKM 阪崎肠杆菌显色培养基平板和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基平板上, 37℃, 孵育 24 h, 观察其分离效果。

1.2.6 分离鉴定: 将疑似菌落分离纯化, 用法国生物梅里埃公司 API20E 鉴定条进行生化鉴定和确认。

2 结果

2.1 显色培养基的特异性

显色培养基的特异性结果见表 1, HKM 阪崎肠杆菌显色培养基和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基均有较好的显色效果。两种显色培养基上阪崎肠杆菌菌落均呈现特异性的蓝绿色; 奇异变形杆菌和大肠埃希氏菌在该显色培养基上均为无色菌落, 普通变形杆菌和沙门氏菌均为灰黑色菌落, 铜绿假单胞菌均为黄绿色菌落, 粘质沙雷伯氏菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌在显色培养基无生长, 实验结果表明, 大部分肠道杆菌和金黄色葡萄球菌对阪崎肠杆菌的辨认无干扰作用, 阪崎肠杆菌显色培养基具有较高的选择性和特异性, 且两种显色培养基的特异性无明显差别。

2.2 阪崎肠杆菌在显色培养基上生长率和灵敏度检验

混合菌液涂布各平板灵敏度和生长率试验结果如表 2 所示, 结果显示, HKM 阪崎肠杆菌显色培养基和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基平板的阪崎肠杆菌检出率没有显著差异, 两种显色培养基可以达

表 1 各种试验株在显色培养基上的特异性试验结果
Table 1 The specificity of test strains on the chromogenic media

菌株 Strains	HKMCSE	OXCSE
阪崎肠杆菌 ATCC51329	蓝绿色	蓝绿色
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC51329		
阪崎肠杆菌 HK7402	蓝绿色	蓝绿色
<i>Enterobacter sakazakii</i> HK7402		
鼠伤寒沙门氏菌 CMCC50115	灰黑色	灰黑色
<i>Salmonella typhimurium</i> CMCC50115		
大肠埃希氏菌 ATCC25922	淡黄色	淡黄色
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922		
普通变形杆菌 CMCC49027	灰黑色	灰黑色
<i>Proteus vulgaris</i> CMCC49027		
奇异变形杆菌 CMCC49005	灰黑色	灰黑色
<i>P. mirabilis</i> CMCC49005		
铜绿假单胞菌 ATCC9027	无色	无色
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027		
铜绿假单胞菌 ATCC27853	黄绿	黄绿
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853		
粘质沙雷伯氏菌 HK7121	受抑制	受抑制
<i>Serratia marcescens</i> HK7121		
粪肠球菌 ATCC29212	受抑制	受抑制
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC29212		
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	受抑制	受抑制
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538		

到相同的灵敏度和检测限; 而且在 HKM 阪崎肠杆菌显色培养基和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基平板上阪崎肠杆菌仍呈特殊的蓝绿色菌落, 其他肠道菌受抑或呈现灰黑色、淡黄色或呈无色菌落。表明在混合菌液中其他肠道菌基本不影响阪崎肠杆菌的检测, 显色培养基对阪崎肠杆菌的特异性高, 抗干扰能力强。

2.3 人工污染样品中阪崎肠杆菌的检测

显色培养基对人工污染样品的检测结果见表 3, HKM 阪崎肠杆菌显色培养基和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基对人工污染样品中阪崎肠杆菌的检出率没有差异, 两种培养基可以达到相同的检测限, 对 4 份奶粉用 BP-MLST 增菌体系, 检测灵敏度均可以达到(1~10) CFU/100 g 奶粉, 而且竞争性抑制了奶粉中杂菌的生长; 而用无菌水-EE 增菌体系, 对伊利奶粉和三鹿奶粉检测灵敏度均为 < 409 CFU/100 g 奶粉, 且无法抑制奶粉中杂菌的生长。说明 BP-MLST 增菌体系优于无菌水-EE 增菌体系。

2.4 实际样品中阪崎肠杆菌检测

在检测的 10 份实际样品中, 仅有 2 份出现可疑菌落, 经 API20E 鉴定条鉴定后, 确认 1 份奶粉为阳性样品。HKM 阪崎肠杆菌显色培养基和 OXOID 阪崎肠杆菌显色培养基对该奶粉均可显示可疑菌落,

表 2 两种组合中的阪崎肠杆菌在显色培养基上的灵敏度试验结果
Table 2 The sensitivity of *Enterobacter sakazakii* on the chromogenic media

菌株 Strains	HKMCSE (mm)	HKMCSE (CFU/mL)	OXCSE (mm)	OXCSE (CFU/mL)
阪崎肠杆菌 ATCC51329 <i>Enterobactersakazakii</i> ATCC51329	1.68	8.22×10^9	1.80	5.20×10^9
阪崎肠杆菌 HK7402 <i>Enterobacter sakazakii</i> HK7402	1.75	6.00×10^9	1.77	2.58×10^9

表 3 人工污染样品中阪崎肠杆菌的检测结果
Table 3 The detection of *Enterobacter sakazakii* in artificially contaminated samples

奶粉品牌 Milk powder of manufacturer	增菌体系 System of enrichment	接种量(CFU) Inoculum	HKMCSE	OXCSE
雅士利奶粉 Milk powder of Yashili	BP-MLST	409	绿-蓝绿色菌落, 无杂菌	
		43		
		1~10		
	无菌水-EE	409		
		43		
		1~10		
南山奶粉 Milk powder of Nanshan	BP-MLST	409	绿-蓝绿色菌落, 无杂菌	
		43		
		1~10		
	无菌水-EE	409		
		43		
		1~10		
伊利奶粉 Milk powder of Yili	BP-MLST	409	绿-蓝绿色菌落, 无杂菌	
		43		
		1~10		
	无菌水-EE	409		
		43		
		1~10		
三鹿奶粉 Milk powder of Shanlu	BP-MLST	409	绿-蓝绿色菌落, 无杂菌	
		43		
		1~10		
	无菌水-EE	409		
		43		
		1~10		

注: * 阪崎肠杆菌在 HKMCSE 和 OXCSE 平板上的典型菌落特征为蓝绿色。

Note: The colour of typical colonies of *E. sakazakii* is blue-green on HKMCSE and OXCSE agar plate.

其检出率没有显著差异, 两种培养基可以达到相同的检测限, 且无论用 EE 肉汤 37°C 或在 MLST 肉汤 44°C 增菌, 灵敏度均无差异; 在白木耳样品中用 EE 37°C 增菌时, 两种培养基均分离出现假阳性菌落, 经 API20E 鉴定条鉴定后确认为非阪崎肠杆菌。将可疑菌落的 $10^3 \sim 10^4$ /mL 的菌悬液接种在 EE 增菌液中 44°C 培养 24 h, 该菌不生长。结果显示, 增菌液在 37°C 培养时, 在显色培养基上分离可能会出现假

阳性的菌落, 如增加 44°C 培养的步骤, 即可排除此干扰。

3 讨论

我国在 2008 年 10 月前还没有阪崎肠杆菌检测的国家标准, 国内检测阪崎肠杆菌多采用 2002 年 USFDA 的推荐方法。2005 年我国虽颁布了 SN/T1632.1 行业标准, 其分离培养阪崎肠杆菌的方法

<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

也基本沿用了 FDA 的推荐方法。其增菌培养采用 36°C 的培养条件, 然后以 VRBGA 为分离培养基, 再经胰蛋白酶大豆琼脂培养基的色素鉴定、API-20E 和氧化酶进行鉴定^[7-9]。这种方法由于检测周期长等缺点已远远不能满足现代检测要求^[3]。显色培养基法的原理是使用适当的荧光或显色底物, 在细菌特异性酶作用下, 产生荧光或显示一定颜色, 用紫外灯观察细菌产生的荧光或直接观察菌落颜色, 减少对菌株进行纯培养和生化鉴定步骤, 可以把检测、计数和初步鉴定一次完成, 大大缩短了检测周期^[1,2,5,6]。国外发达国家对显色培养基研究和应用日趋普遍, 我国也于 2008 年 11 月颁布了食品中阪崎肠杆菌的标准检验方法, 显色培养基首次进入我国的国家标准。由此可见, 显色培养基具有广泛的应用前景。

本研究应用自主研发的阪崎肠杆菌显色培养基进行检测, 取得满意的实验结果。

在人工污染样品的检测中, 不同厂家奶粉样品检出率存在较大的差异, 其原因可能是奶粉在生产加工的过程中添加剂成分不同, 某些成分可能抑制了阪崎肠杆菌的生长, 在检测过程中如无有效的增菌方法, 则可能降低显色培养基的敏感性。

本实验结果显示, 显色培养基也有一定的缺陷, 由于某些肠道细菌(如变形杆菌等)也会含有与阪崎肠杆菌相同的 α -D-葡萄糖苷酶, 或奶粉在生产加工的过程中添加的有机或无机成分种类多且复杂, 影响了酶与底物的反应, 在没有高效的前增菌条件下, 会出现的假阳性和假阴性现象。从而干扰目标菌的检测。但是显色培养基的这些缺陷可以通过改变增菌培养条件等方法弥补而取得良好的分离、鉴定效果。

综上所述, 显色培养基在微生物检测中的应用, 可大大提高检出率和节省检测时间。但要进一步提高阪崎肠杆菌显色培养基的特异性和灵敏度, 还需对这些显色培养基进行继续改良, 或建立如本研究效果相当或更高效的样品前增菌办法。

参 考 文 献

- [1] 杨万颖, 祝仁发, 李传礼, 等. 婴儿食品中阪崎肠杆菌检测方法的改进. 检验检疫科学, 2008, **18**(2): 39-42.
- [2] Joshua BG, Jeffrey LK, Larry RB. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol*, 2005, **104**(1): 1-34.
- [3] 李秀梅, 裴晓燕, 郭云昌. 中国安徽阜阳劣质婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌的污染. 中国食品卫生杂志, 2005, **17**(1): 10-12.
- [4] 吴清平, 叶应旺, 郭伟鹏, 等. 阪崎肠杆菌的生物学特性及其检测技术. 微生物学通报, 2006, **33**(6): 99-103.
- [5] 卢勉飞, 吴清平, 刘云林, 等. 特异性酶反应在食源性致病菌检测中的应用. 中国卫生检验杂志, 2005, **15**(3): 354-356.
- [6] 吴清平, 周艳红, 蔡芷荷. 卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用. 中国卫生检验杂志, 2005, **15**(1): 124-126.
- [7] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, *et al*. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J App Microbiol*, 2003, **95**(5): 967-973.
- [8] Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol*, 2003, **14**: 443-454.
- [9] Cawthorn DM, Botha S, Witthuhn RC. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Int J Food Microbiol*, 2008, **127**(1-2): 129-138.