

抗干扰微生物检测技术研究*

吴清平^{1,2} 蔡芷荷² 张菊梅² 周小燕² 姚汝华¹

(华南理工大学 广州 510641)¹ (广东省微生物研究所 广州 510070)²

摘要: 在检测细菌、真菌和大肠菌群时,抗防腐剂型微生物培养基可消除样品中浓度为 2.0g/L(Kg)的山梨酸、山梨酸钾、苯甲酸及苯甲酸钠的干扰;抗消毒剂型微生物培养基可分别消除 150mg/L 二氧化氯、400mg/L 过氧乙酸、700mg/L 次氯酸钠及 180mg/L 过氧化氢的干扰;抗臭氧型微生物培养基可以消除 10.0mg/L 的臭氧和余氯的干扰。大样倾注平板法可以取 5mL 的样品,适用所有样品的检测;液体大样法可以取 100mL 的样品,适用于所有样品的检测及增菌,特别适用于无色液体样品;最小近似数法可以检出次大样中的细菌及真菌总数和大肠菌群数量,可以用于所有样品的检测,尤其适于有色样品的检测。

关键词: 抗干扰,检测技术,微生物培养基,大样倾注平板法,液体大样法

中图分类号: Q93335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0101-05

RESEARCHES ON ANTI-DISTURBANCE MICROBIAL MEASUREMENT TECHNIQUES

WU Qing-Ping^{1,2} CHAI Zhi-He² ZHANG Ju-Mei² ZHOU Xiao-Yan² RAO Ru-Hua¹

(South China University of Technology, Guangzhou 510641)¹

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)²

Abstract: In the bacterial, fungous and coliform bacterial measurement, the anti-preservative media can eliminate the disturbances of the preservatives 2.0g/L(Kg) sorbic acid, potassium sorbate, benzoic acid and sodium benzoate in the samples, the anti-disinfectant media can eliminate respectively the disturbances of the disinfectants 150mg/L chloride dioxide, 400mg/L peroxyacetic acid, 700mg/L sodium hypochlorite and 180mg/L hydrogen peroxide, and the anti-ozone microbial media can eliminate the disturbances of 10.0mg/L ozone and free chlorine. The big sample pouring plate method can take 5mL sample, suitable for the microbial detection of all kinds of samples. The liquid big sample method can take 100mL sample, suitable for the microbial detection and increasing microbial number of all kinds of samples, especially suitable for the no color liquid samples. The MPN method can measure the total number of the bacteria, fungi and coliform bacteria in the second big samples by applying fifteen tube method or nine tube method. It is suitable for the microbial measurement of all kinds of samples, especially suitable for the microbial measurement of the samples with color.

Key words: Anti-disturbance, Measurement technique, Microbial media, The big sample pouring plate method, The liquid big samples method

* 广东省重点科技攻关项目

收稿日期: 1999-01-11, 修回日期: 1999-08-15

在完成抗防腐剂型, 抗消毒剂型及抗臭氧型等三大系列抗干扰微生物培养基研究后, 进一步了解和掌握其使用范围和性能, 规范与之相匹配的抗干扰检测技术, 充分发挥这些培养基的抗干扰效能和潜能, 就成为抗干扰微生物培养基研究的进一步必然要求。根据这种情况, 本研究首先确立抗干扰微生物培养基可以消除的干扰物质及适用范围, 然后较详细地规范抗干扰微生物检测技术, 突出特点, 并摸索出适用范围。

1 材料与方法

1.1 干扰物质

1.1.1 防腐剂: 山梨酸(Sorbic acid)、山梨酸钾(Potassium sorbate)、苯甲酸(Benzoic acid)及苯甲酸钠(Sodium benzoate)。

1.1.2 消毒剂: 二氧化氯(Chlorine dioxide, CD)、过氧乙酸(Peroxyacetic acid, PA)次氯酸钠(Sodium hypochlorite, SH)、过氧化氢(Hydrogen peroxide, HP)。

1.1.3 臭氧(Ozone)。

1.2 测试菌株

见参考文献 [1]

1.3 试验用微生物培养基

见参考文献 [2]

1.4 抗干扰微生物培养基的研究方法

1.4.1 干扰物质浓度的测定: 防腐剂浓度的测定: 见参考文献 [3], 消毒剂浓度的测定: 见参考文献 [4], 臭氧浓度的测定: 见参考文献 [5]。

1.4.2 抗干扰微生物培养基可以消除的干扰物质及适用范围测定: 测定方法参照吴清平等^[2]的方法。

1.4.3 抗干扰微生物检测技术: 大样倾注平板法, 液体大样法, 最小近似数法(MPN法)。

2 结果

2.1 抗干扰微生物培养基可以消除的干扰物质及适用范围

2.1.1 抗干扰微生物培养基可以消除的干扰物质及其浓度: 本研究经过测试, 抗防腐剂型微生物培养基可消除样品中浓度为 2.0g/L(Kg)的苯甲酸、苯甲酸钠、山梨酸和山梨酸钾的干扰; 抗消毒剂型微生物培养基可消除浓度分别为二氧化氯 150mg/L、过氧乙酸 400mg/L、次氯酸钠 700mg/L及过氧化氢 180mg/L的干扰; 抗臭氧型微生物培养基可以消除浓度为 10.0mg/L的臭氧和余氯的干扰(表 1)。

2.1.2 抗干扰微生物培养基的适用范围: 抗干

表1 抗干扰微生物培养基可以消除的干扰物质及其浓度

抗干扰培养基	可以消除的干扰物质	可以消除的干扰物质的浓度
抗防腐剂型微生物培养基	苯甲酸、苯甲酸钠	2.0g/L(kg)
	山梨酸、山梨酸钾	
抗消毒剂型微生物培养基	二氧化氯	150mg/L
	过氧乙酸	400mg/L
	次氯酸钠	700mg/L
	过氧化氢	180mg/L
抗臭氧型微生物培养基	臭 氧	10.0mg/L
	余 氯	

扰微生物培养基的适用范围见表 2。

2.2 抗干扰微生物检测技术

2.2.1 抗干扰微生物检测技术的特点及适用范围: 抗干扰微生物检测技术的特点及适用范围见表 3。

2.2.2 抗干扰微生物检测技术的具体操作方

法:

(a)大样倾注平板法: 抗干扰微生物培养基除可用于 1mL(g)样品的普通倾注平板法外, 其突出的优点是可以扩大样品为 5mL(g)进行倾注平板法检测, 并不受一定浓度的防腐剂、消毒剂及臭氧等的干扰, 使检测灵敏度大大提

表2 抗干扰微生物培养基与普通微生物培养适用范围对照表

抗干扰微生物培养基			普通微生物培养基	
新名称	对照名称	适用范围	名称	适用范围
抗防腐剂型细菌平板计数琼脂培养基	抗防腐剂型营养琼脂培养基	适合于带有防腐剂的食品、饮料及保健品等的细菌总数的抗干扰测定用, 亦可供一般细菌培养用。	营养琼脂培养基	供细菌总数测定、保存菌种及纯培养用
抗防腐剂型真菌平板计数琼脂培养基	抗防腐剂型虎红琼脂培养基	适合于带有防腐剂的食品、饮料及保健品等的真菌总数的抗干扰测定用, 亦可供一般真菌培养用。	虎红琼脂培养基	供分离霉菌及酵母菌用
抗防腐剂型细菌大样检测液体培养基	抗防腐剂型营养肉汤培养基	适合于带有防腐剂的食品、饮料及保健品等的细菌抗干扰检测用, 亦可供一般细菌的液体培养用。	营养肉汤培养基	供细菌增菌培养用
抗防腐剂型真菌大样检测液体培养基	抗防腐剂型霉菌液体培养基	适合于带有防腐剂的食品、饮料及保健品等的真菌抗干扰测定用, 亦可供一般真菌增菌和培养用。	霉菌液体培养基	供霉菌培养及增菌用
抗防腐剂型大肠菌群测定液体培养基	抗防腐剂型乳糖胆盐发酵培养基	适合于带有防腐剂的食品、饮料及保健品等的大肠菌群的抗干扰检测。	乳糖胆盐发酵管培养基	供大肠菌群测定用
抗消毒剂型细菌平板计数琼脂培养基	抗消毒剂型营养琼脂培养基	适合于带有消毒剂的食品、饮料及保健品和包装物等的细菌总数的抗干扰测定用, 亦可供一般细菌培养用。	营养琼脂培养基	供细菌总数测定、保存菌种及纯培养用
抗消毒剂型真菌平板计数琼脂培养基	抗消毒剂型虎红琼脂培养基	适合于带有消毒剂的食品、饮料及保健品和包装物等的真菌总数的抗干扰测定用, 亦可供一般真菌培养用。	虎红琼脂培养基	供分离霉菌及酵母菌用
抗消毒剂型细菌大样检测液体培养基	抗消毒剂型营养肉汤培养基	适合于带有消毒剂的食品、饮料及保健品和包装物等的细菌抗干扰检测用, 亦可供一般细菌的液体培养用。	营养肉汤培养基	供细菌增菌培养用
抗消毒剂型真菌大样检测液体培养基	抗消毒剂型霉菌液体培养基	适合于带有消毒剂的食品、饮料及保健品和包装物等的真菌抗干扰测定用, 亦可供一般真菌增菌和培养用。	霉菌液体培养基	供霉菌培养及增菌用
抗消毒剂型大肠菌群测定液体培养基	抗消毒剂型乳糖胆盐发酵培养基	适合于带有消毒剂的食品、饮料及保健品和包装物等的大肠菌群的抗干扰检测。	乳糖胆盐发酵管培养基	供大肠菌群测定用
抗臭氧型细菌平板计数琼脂培养基	抗臭氧型营养琼脂培养基	适合于带有臭氧的食品、饮料及保健品等的细菌总数的抗干扰测定用, 亦可供一般细菌培养用。	营养琼脂培养基	供细菌总数测定、保存菌种及纯培养用
抗臭氧型真菌平板计数琼脂培养基	抗臭氧型虎红琼脂培养基	适合于带有臭氧的食品、饮料及保健品等的真菌总数的抗干扰测定用, 亦可供一般真菌培养用。	虎红琼脂培养基	供分离霉菌及酵母菌用
抗臭氧型细菌大样检测液体培养基	抗臭氧型营养肉汤培养基	适合于带有臭氧的食品、饮料及保健品等的细菌抗干扰检测用, 亦可供一般细菌的液体培养用。	营养肉汤培养基	供细菌增菌培养用
抗臭氧型真菌大样检测液体培养基	抗臭氧型霉菌液体培养基	适合于带有臭氧的食品、饮料及保健品等的真菌抗干扰测定用, 亦可供一般真菌增菌和培养用。	霉菌液体培养基	供霉菌培养及增菌用
抗臭氧型大肠菌群测定液体培养基	抗臭氧型乳糖胆盐发酵培养基	适合于带有臭氧的食品、饮料及保健品等的大肠菌群的抗干扰检测。	乳糖胆盐发酵管培养基	供大肠菌群测定用

表3 抗干扰微生物检测技术的特点及适用范围

检测方法	特点	适用范围
大样倾注平板法	可以取5mL的样品进行检测, 得出准确的菌数。	可以用于所有样品的检测
液体大样法	可以取100mL的样品进行检测, 能判断样品的带菌与否, 亦可用于增菌。	可以用于所有样品的检测及增菌, 特别适用于无色液体样品如矿泉水及饮用纯水的检测。
最小近似值法 (MPN法)	可以按15管法或9管法检测出次大样中的细菌及真菌总数和产大肠菌群的数量。	可以用于所有样品的检测, 尤其适于有色样品的检测。

高。具体的操作方法是: (1) 参照抗干扰培养基说明, 配制抗干扰微生物培养基, 准备直径 9cm 的培养皿及其它配套用品, 然后灭菌。(2) 在无菌室中将已混合并分散好的 5mL (g) 样品置于灭菌的培养皿中; (3) 倾注灭菌后冷却到 50℃ ~ 55℃ 的培养基 5mL 至带有样品的培养皿中, 摇匀混合, 冷却后倒置; (4) 置一定条件下培养, 观察计算菌落数。(b) 液体大样检测法: 有些食品饮料的含菌量较低, 但由于其所含防腐剂的抑菌效果不其理想, 一定时间后微生物复苏后出现超标, 或由于类似矿泉水、饮用纯水等不含防腐剂, 但生产出来时含有臭氧, 且通常菌数少, 因此在产品出厂前常规方法检测不出含菌量, 甚至采用大样倾注平板法, 样品的取样量仍不够时, 样品的带菌与否就显得比带有具体多少更为重要, 这时可采用液体大样法来检测。具体的操作方法是: (1) 参照抗干扰培养基说明配制 50mL/瓶三料抗干扰微生物培养基, 分装到 250mL 三角瓶中, 并准备其它配套用品, 然后灭菌; (2) 在无菌室中, 将已混合并分散好的 100mL (g) 样品加入到装有冷却后的 50mL/瓶三料培养基的 250mL 三角瓶中, 摇匀混合后置一定条件下培养; (3) 检测无色样品如矿泉水、饮用纯水等时, 细菌及酵母可用波长 $\lambda = 650\text{nm}$, 测定吸光度 (ABS), 霉菌则可直接数出数量; 检测带有颜色的样品如酸奶、果汁等时, 可以采用普通或大样倾注平板法对液体大样法的检测样进行检查, 判断其中是否带菌。(c) 最小近似数法 (MPN 法): 对于大样倾注平板法显得取样量不够时, 可以采用液体大样检测法来弥补, 但其又带来样品含菌量不能准确定量的问题 (除无色样品中的霉菌数量

外), 在这种情况下, 可采用液体次大样法即最小近似数法 (MPN 值法), 对样品进行检测, 其具体的操作方法是: (1) 按国标大肠菌群数量测定方法配制抗干扰微生物培养基 (测定大肠菌群数量试管中要加入小倒管, 测定细菌及真菌总数则无需在试管中加入小倒管), 并准备其它配套用品, 然后灭菌; (2) 在无菌室中, 将已混合并分散好的样品按国标大肠菌群数量测定方法加入到测定系统中, 然后置一定条件下培养; (3) 检测大肠菌群数量按国标大肠菌群数量测定方法观测计算; (4) 检测无色样品如矿泉水、饮用纯水等的细菌及酵母菌总数可用波长为 650nm, 测定吸光度 (ABS) 或用肉眼观察是否变浑浊来确定阳性管数量, 霉菌则可直接用肉眼观察是否产生絮状物来确定阳性管数量, 然后查 MPN 值表得出细菌、酵母及霉菌的总数; (5) 检测带色样品如酸奶、果汁等, 则阳性管数量的判断要采用普通或大样倾注平板法来确定, 然后查 MPN 值表即可得出样品的细菌及真菌总数。

3 讨论

经过几年的研究, 目前我们已较系统地研究出抗干扰微生物培养基, 并建立起其相应抗干扰微生物检测新技术, 它们可广泛地应用于食品、饮料、矿泉水、蒸馏水及自来水的细菌、霉菌及酵母菌总数和大肠菌群数量的抗干扰测定。抗干扰微生物培养基有抗防腐剂型、抗消毒剂型和抗臭氧型三大系列, 每个系列有细菌平板计数琼脂培养基、细菌大样检测液体培养基、真菌平板计数琼脂培养基、真菌大样检测液体培养基和大肠菌群测定培养基。这种抗

干扰微生物培养基及其检测技术最重要的特点是可排除防腐剂、消毒剂和臭氧的干扰,取大样本将样品中受到抑制的微生物检测出来;当样品含有干扰物质时,采用大样倾注平板法和液体大样法检测其中的微生物,抗干扰微生物培养基的细菌、真菌和大肠菌群的检出率大大高于普通微生物培养基。再则,这种抗干扰微生物培养基及其检测技术同样适用于不含防腐剂、消毒剂和臭氧的样品检测,应用范围很广。

据广东省科技情报所的科技查新报告,目前国内外均未见有与本研究相类似的工作报告。抗干扰微生物培养基经广东省卫生防疫站检测结果表明,当检测不残留防腐剂和消毒剂

的样品时,抗干扰培养基与普通培养基检出细菌和真菌的能力无显著差异,但在检测残留防腐剂和消毒剂的样品时,抗干扰培养基检出细菌和真菌的能力大大高于普通培养基。

参 考 文 献

- [1] 吴清平,蔡芷荷,张菊梅等. 微生物学通报,2000,27(1)
- [2] 吴清平,蔡芷荷,张菊梅等. 微生物学通报,1999,26(2):175~179.
- [3] 李明元主编. 高效液相色谱法及其在仪器分析中的应用. 北京:北京大学出版社,1989,97~118.
- [4] 黄伟坤等编著. 食品检验与分析. 北京:轻工业出版社,1989,139~190.
- [5] 丘藤良等编,雷席珍译. 最新饮料工艺学. 广州:广东科技出版社,1985,408~409.