

显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用*

张淑红¹ 吴清平^{2**} 张菊梅² 郭伟鹏²

(广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)¹

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)²

摘要: 用显色培养基鉴定微生物是一种新的微生物快速检测技术, 该技术以生化反应为基础, 通过在培养基中加入细菌特异性酶的显色底物直接根据菌落颜色对菌种作出鉴定。常见食源性致病菌检测中, 李斯特菌显色培养基 (BCMTM *Listeria monocytogenes*, Rapid¹ LMONO agar, CHROMagarTM *Listeria*)、大肠杆菌显色培养基 (CHROMagarTM *Ecoli*)、沙门氏菌显色培养基 (Rambach agar)、金黄色葡萄球菌显色培养基 (CHROMagar *Staphylococcus aureus*) 等已被广泛应用于食品、医药和环境监测等领域, 极大提高了微生物检测的效率。但是, 显色培养基也存在一些假阳 (阴) 性等问题, 其设计尚待优化。

关键词: 显色培养基, 食源性致病菌, 快速检测, 应用

中图分类号: Q93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0108-04

Application of Chromogenic Media in some Food-borne Pathogenic Bacterial Rapid Detection*

ZHANG Shu-Hong¹ WU Qing-Ping^{2**} ZHANG Ju-Mei² GUO Wei-Peng²

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

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)²

Abstract: Microbial detection by chromogenic media is a new kind of microbial rapid detection technology, based on biochemical reaction, which may identify the bacteria according to the colony color through adding the bacterial special enzyme substrates to selective media. In food-borne pathogenic bacterial detection, *Listeria* chromogenic agar (BCMTM *Listeria monocytogenes*, Rapid¹ LMONO agar, CHROMagarTM *Listeria*), CHROMagarTM *Ecoli*, Rambach agar and CHROMagar *Staphylococcus aureus* were widely used in many fields such as food, medicine and environmental inspection. That improved the detection efficiency greatly. However, there are some problems like false positive or false negative to be perfected in chromogenic media now.

Key words: Chromogenic media, Food-borne pathogenic bacteria, Rapid detection, Application

随着生活水平的不断提高, 食品安全问题越来越受人们重视, 与食品安全密切相关的食品污染, 尤其是微生物造成的污染在自然界中处处可见。微生物检测已成为保障食品安全的重要举措。传统的检测方法费时费力, 已不能满足食品安全质控的需求。开发各种新型微生物快速检测技术, 提高微生物检测的速率和质量, 是有效预防和控制各种微生物感染, 保证人类健康发展的重要措施之一^[1-3]。用显色培养基鉴定微生物是在生化反应的基础上开发的新技术, 也是国内外研发的热点。其原理是将微生物胞内酶的种类及反应条件作为微生物分类鉴定的主要依据, 通过在分离培养基中加入

* 广东省科技计划资助项目 (No. 2004B33301003)

** 通讯作者 Tel: 020-87688132, E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2006-01-09, 修回日期: 2006-03-20

微生物特异性酶的底物, 该底物由发色基团和微生物可代谢物质组成, 通常无色, 但在特异性酶作用下游离出发色基团并显示一定颜色, 直接观察菌落颜色就可对菌种做出鉴定, 减少了对菌株进行纯培养和进一步生化鉴定的步骤^[4~7]。以下介绍几种常见食源性致病菌显色培养基的种类和应用现状。

1 常见食源性致病菌显色培养基的研究现状

1.1 李斯特菌 (*Listeria spp.*) 李斯特菌是一类个体较小的革兰氏阳性杆菌, 包括 7 个种, 其中只有单增李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 和绵羊李斯特菌 (*L. ivanovi*) 具有致病性。绵羊李斯特菌是动物致病菌, 被列为 90 年代 4 大致病菌之一, 是食品卫生行业的常检致病微生物^[8~12]。近年来, 许多国家致力于李斯特菌显色培养基的研究, 针对李斯特菌特有的肌醇磷酸磷脂酶 (PI-PLC) 和 β -D-葡萄糖苷酶 (β -D-glucosidase) 设计显色底物对李斯特菌进行快速检测。

1.1.1 PALCAM、OXFORD、LPM、MOX 培养基: PALCAM、OXFORD、LPM 和 MOX 是目前国外检测李斯特菌最常用的分离培养基, 用于对李斯特菌的 ISO 标准检验和计数^[9]。这类培养基以七叶灵为底物, 通过检测 β -D-glucosidase 来检测李斯特菌, 此酶能水解七叶灵产生七叶苷, 使李斯特菌在这些培养基上呈现黑色菌落。由于 β -D-glucosidase 在所有李斯特菌中都存在, 因此这类培养基不能对李斯特菌各个种进行有效区分。

1.1.2 BCM™ *listeria monocytogenes*: BCM™ *listeria monocytogenes* 是由瑞士 Biosynth 公司开发的李斯特菌显色培养基, 以 5-溴-4-氯-3-吡啶-肌醇磷酸 (X-IP) 为底物, 通过检测 PI-PLC 来检测李斯特菌。在培养基上, 非致病李斯特菌不含 PI-PLC, 不能水解 X-IP 菌落呈现白色, 而致病菌单增李斯特菌和绵羊李斯特菌能够产生 PI-PLC, 水解 X-IP 产生 X, 因此在培养基上形成蓝绿色菌落, 二者还可以通过鼠李糖产酸测试得到区分。利用 BCM-LMDS 新型检测系统可对李斯特菌各个种进行有效区分, 灵敏度和特异性达 97.6% 和 100%^[10]。目前这种培养基已商业化生产, 为该公司的专利产品。

1.1.3 Rapid' LMONO agar: Rapid' LMONO agar 是由法国 Bio-Rad 公司生产的单增李斯特菌显色培养基, 所用底物为 X-IP, 在此培养基上, 非致病李斯特菌形成白色菌落, 单增李斯特菌和绵羊李斯特菌都可水解 X-IP, 形成蓝绿色菌落。绵羊李斯特菌由于可使木糖发酵产酸, 因此在蓝色菌落周围产生黄色晕环, 单增李斯特菌菌落周围无晕环。这种培养基也能快速有效的分离鉴定单增李斯特菌, 其灵敏度和特异性都高于传统分离培养基^[11]。目前市场已有销售, 也是该公司的专利产品。

1.1.4 CHROMagar™ *Listeria*: CHROMagar™ *Listeria* 是法国 CHROMagar 公司开发的李斯特菌显色培养基, 以 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖吡喃糖苷酸 (X-glu) 和磷脂酰肌醇 (L-a-PI) 为底物, 利用 β -D-glucosidase 水解 X-glu 和 PI-PLC 水解 L-a-PI 的特性鉴定不同的李斯特菌。非致病菌只含 β -D-glucosidase, 在培养基上呈现蓝绿色菌落, 致病菌单增李斯特菌和绵羊李斯特菌同时含有两种酶所以呈现蓝绿色带白色晕环的菌落。用 CHROMagar™ *Listeria* 方法和传统的 ISO11290 方法对比检测牛奶中的单增李斯特菌, 结果表明, 这种培养基的灵敏度、选择性和特异性都明显优于传统的 PALCAM 和 OXFORD 平板, 并且能快速检测出样品中低浓度的单增李斯特菌^[11,12]。该培养基已经商业化生产。

1.1.5 ALOATM (*Agar Listeria according to ottaviani and agosti*): ALOATM是由意大利公司开发的李斯特菌显色培养基,其显色原理与 CHROMagarTM *Listeria* 类似,非致病菌在培养基上呈现蓝绿色菌落,致病菌单增李斯特和绵羊李斯特菌都呈现蓝绿色带白色晕环的菌落。在对 246 份畜禽肉样品的检测中,ALOATM 培养基的灵敏度和特异性分别为 99.3% 和 100%,明显高于 PALCAM (72.7%, 85.3%) 和 OXFORD (81.5%, 94.7%),大大提高了检测效率^[11]。目前该培养基已被许多检测机构采用。

1.1.6 OCLA (*Oxoid chromogenic Listeria agar*): OCLA 培养基是由英国 Oxoid 公司研制的李斯特菌显色培养基,显色原理与 CHROMagarTM *Listeria* 和 ALOATM 类似,以 x-glu 和 L-a-PI 为底物检测不同的李斯特菌,非致病菌在培养基上呈现蓝绿色菌落,致病菌单增李斯特和绵羊李斯特菌都呈现蓝绿色带白色晕环的菌落。该培养基尚待推广应用。

1.1.7 HKListeria (*HuanKai listeria chromogenic medium*): HKListeria 是由广东环凯微生物科技公司新开发的单增李斯特菌显色培养基,该培养基以 x-glu 和 L-a-PI 为底物,单增李斯特在此培养基上呈现蓝绿色带白色晕环的菌落。目前培养基正处于试用阶段。

1.2 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 利用大肠杆菌特异性酶检测鉴定大肠杆菌已十分普遍,大约 96% ~ 98% 的大肠杆菌产生 β -D-葡萄糖苷酸酶 (β -D-Gud),绝大部分沙门氏菌、志贺氏菌和耶尔森氏菌不能产生 Gud,因此利用 Gud 酶底物可以有效的检测大肠杆菌^[13,14]。目前开发的显色培养基常用酶底物有:5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡萄糖苷酸 (X-Gluc)、邻硝基酚 β -D 葡萄糖苷酸 (PNPG),底物被 Gud 水解后产生显色物质使菌落呈现特殊的蓝色或黄色^[10,11]。法国科玛嘉 CHROMagar *Ecoli* 是目前应用较广泛的大肠杆菌显色培养基,在这种培养基培养 24h 后,大肠杆菌呈现蓝色菌落;广东环凯公司已开发大肠杆菌显色培养基 HKEcoil,并在国内商品化生产。

1.3 沙门氏菌 (*Salmonella spp.*) 沙门氏菌也是一类重要的食源性致病菌,常规分离鉴定需要非选择性预增菌、选择增菌、选择分离平板鉴定等步骤,操作十分繁琐。德国 Merck 公司生产的显色培养基 Rambach agar 以丙烯乙二醇和 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D 半乳糖吡喃糖苷酸 (X-GAL) 为底物检测沙门氏菌,沙门氏菌能水解乙二醇产酸,不能水解 X-GAL,在培养基上产生特殊的红色菌落。临床检测结果表明其效果明显优于传统培养基 BS、SS,且假阳性率较低^[13]。这类培养基已商业化生产。

1.4 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 金黄色葡萄球菌也是重要的食源性致病菌,DNA 酶和凝固酶是其重要的标志酶。以甲苯胺蓝、甲基绿、丫啶橙和 5-溴-4-氯-3-吲哚-胸苷-3-磷酸等为显色底物(如 CHROMagar *Staphylococcus aureus*)或以 D-phe-pro-arg- β 奈胺为底物都能有效检测鉴定金黄色葡萄球菌^[10,11]。法国 CHROMagar 公司和瑞士 Fluck 公司都已研制出检测该菌的显色培养基并广泛应用于食品卫生行业。

2 显色培养基应用评价

用显色培养基检测微生物是一种新技术,直接根据菌落颜色就可对菌种作出鉴定,减少了进行补充试验的必要。与传统的检测方法相比,显色培养基的灵敏性、特异性和选择性都明显优于传统培养基,且节省时间、人力和资金投入,为食品微生物检测提供了新途径。国外这方面的研究开展比较早,法国 CHROMagar 公司 1974 年就开始致力于显色培养基的开发,至今已先后研制出针对沙门氏菌、大肠杆菌、李斯特菌和弧菌等各种微生物的显色培养基。之后,瑞士 Biosynth 公司、英国 Oxoid 公司、德国

Merck 公司等相继推出各自的系列显色培养基,有些已设计成微生物快速检测试剂盒,并申请了专利。但是,显色培养基也存在许多问题,(1)检测混合感染的微生物时,由于非目标菌的竞争作用,常常会造成目标菌漏检和检测结果假阴性,或由于非目标菌也存在特异性酶反应造成检测结果的假阳性,从而降低了显色培养基的灵敏性和特异性;(2)某种细菌不同血清型可能存在特异性酶反应的差异,结果在显色培养基上出现不同颜色的菌落,还需要辅助观察或传统生化试验才能对菌株作鉴定;(3)显色培养基中的抑菌剂在抑制杂菌生长的同时可能对目标菌产生一定的影响;(4)一些显色培养基在检测过程中只能对目标菌进行定性分析,还不能定量分析。因此,显色培养基的设计尚待优化。

3 讨论

近年来,世界各地不断发生微生物引起的食物中毒事件,各国对食品卫生安全的重视程度越来越高,微生物检测力度也在逐步加强。传统的检测方法费时费力,已经不能满足食品卫生安全质控的需求,人们不断尝试和改进检验技术和方法,研发各种新型微生物快速检测技术是一个必然趋势。一些大的标准化组织和检测机构如 ISO、AOAC、FDA 等都在不断推出实验室验证的新方法。鉴于显色培养基的众多优点,利用显色培养基对微生物进行检测,将是微生物快速检测技术的一个新研究方向。这方面,微生物特异性生化反应挖掘及特异性酶底物的设计合成将是显色培养基研究开发的关键,并将可能成为研发的重点。目前,我国在显色培养基方面的研究还比较薄弱,尚未开发出国产化的微生物快速检测系列显色培养基,食品、医药卫生行业所用的显色培养基基本都是国外产品。因此十分必要开发出具有自主知识产权的产品,以打破国外垄断市场的局面。另外,目前国外显色培养基在使用过程中也存在一些假阳性和假阴性等问题,有必要对现有的显色培养基进行改造或开发新的显色培养基,在借鉴国外产品的基础上寻找成本较低、使用方便、灵敏高效的显色培养基成品及试剂盒将是微生物快速检测新技术最有潜力的方向之一,并将具有十分广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 农生州. *Am thology of Medicine*, 2001, **20**: 520~522.
- [2] 郁庆福,蔡宏道,何晓青,等. *现代卫生微生物学*. 北京:人民卫生出版社,1995. 116~117.
- [3] 朱光富. *现代商检科技*, 1997, **1**: 59~63.
- [4] 吴清平,周艳红,蔡芷荷. *中国卫生检验杂志*, 2005, **15** (1): 124~126.
- [5] 余晓峰,徐慧群,吴忠仁,等. *安徽卫生职业技术学院学报*, 2003, **2** (1): 74~75.
- [6] 卢汉兴,车光,王红,等. *广西预防医学*, 2001, **7** (1): 44~46.
- [7] 夏晴. *日用化学品科学*, 1999, (增刊): 186~189.
- [8] 陈太基,袁宝君. *江苏预防医学*, 2002, **13** (4): 61~62.
- [9] 李卫华. *食品微生物实验手册*. 北京:中国轻工业出版社, 2003. 389~391.
- [10] Manafi M. *Int J Food Microbiol*, 1996, **31**: 45~58.
- [11] Manafi M. *Int J Food Microbiol*, 2000, **60**: 205~218.
- [12] Restaino L, Frampton E W, Schabert G. *Food Prot*, 1999, **62** (3): 244~248.
- [13] Enne de B. *Int J Food Microbiol*, 1998, **45**: 43~53.
- [14] Brenner K P, Rankin C C, Roybal Y R, et al. *Applied and Environ Microbiol*, 1993, **59** (11): 3534~3544.