

应用分值计算法优选 SS 琼脂配方的研究

杨更发

黄怀京

(浙江省卫生防疫站 杭州 310009)

(浙江省临安市卫生防疫站 临安 311300)

摘要 用分值计算法对四批 SS 琼脂质量检测,分值均小于质控标准分值 56.125。主要问题是抑制大肠杆菌 (*E. coli*) 生长和促鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*),痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 生长的能力不够。调整 SS 琼脂配方中各试剂的用量进行筛选,结果表明:0.5% 胆盐抑制大肠杆菌 (*E. coli*) 能力达到分值质控要求,但对鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 的生长同样有抑制作用。0.3% 胆盐抑制大肠杆菌 (*E. coli*) 的能力不明显。0.07% 柠檬酸铁和 0.15% 柠檬酸钠有缓和胆盐对鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 的毒性,但对痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 作用不明显。

关键词 分值计算法,优选,SS 琼脂配方

分类号 Q93.335 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0113-16

RESEARCH ON OPTIMIZATION OF FORMULA OF SS AGAR WITH SCORING METHOD

Yang Gengfa

(Zhejiang Provincial Sanitary and Anti-epidemic Station, Hangzhou, 310009)

Huang Huaijing

(Lin'an Municipal Sanitary and Anti-epidemic Station, Lin'an Zhejiang, 311300)

Abstract Four batches of SS agar were qualified as substandard products with Scoring Method (score < 56.125). The main problem was weak ability in inhibiting the growth of *E. coli* and promoting the growth of *S. typhimurium* and *S. dysenteriae*. Tests for optimizing the formula of SS agar were conducted. Among these tests, the contents of some components were variant. The results showed that 0.5% cholate inhibited the growth of *E. coli* at an ideal level but also inhibited the growth of *S. typhimurium* and *S. dysenteriae*. 0.3% cholate had no obvious effects in inhibiting *E. coli*. 0.070% ferric citrate and 0.15% sodium citrate could lessen the toxicity of cholate to *S. typhimurium* with no effects in protecting *S. dysenteriae*.

Key words Scoring method, Optimization, SS agar formula

沙门氏菌-志贺氏菌琼脂培养基(简称 SS 琼脂)是分离肠道致病菌最常用的强选择性培养基,其内在质量优劣直接影响到肠道致病菌的检出率,该培养基的配方较多^[1~2],所使用的试剂多达 10 种以上,试剂配伍的比例、用量和试剂质量均直接影响培养基的质量。本次实验采用计算分值方法对 SS 琼脂进行检定比较,并调整配方内各种成分的用量,优选最佳的 SS 琼

脂配方,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 计数菌落和测量菌落直径

菌株为鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium* ATCC 50013)、痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*)

ATCC 12022) 和大肠杆菌 (*S. coli* ATCC 44131)。试验时将各菌株分别接种于营养肉汤中, 于 37℃ 培养 18~24h。取一接种环营养肉汤悬液, 接种营养琼脂, 37℃ 培养 18~24h。挑取单个菌落, 用肉汤制备菌悬液, 然后作 10^{-1} ~ 10^{-6} 稀释, 取 10^{-6} 稀释度菌悬液 0.1mL, 分别接种试验培养基和对照培养基平板上, 涂匀 (使菌落数为 50~100cfu/皿), 置 37℃ 培养 24h, 计算菌落数, 并测量单个菌落直径 (精确至 0.02mm)。

1.2 计算生长率

按下式计算生长率:

$$\text{生长率} = \frac{\text{试验培养基上的菌落数}}{\text{对照培养基上的菌落数}} \times 100\%$$

1.3 结果处理与判断^[3~4]

1.3.1 按下列公式分别计算生长菌株分值和受抑制菌株分值:

$$\text{生长菌株分值} = \left(1 + \frac{X - \mu}{\sigma}\right) \times 10 + (X - Y + 1) \times 5 + 5 + \frac{P - \pi}{\delta P}$$

$$\text{受抑制菌株分值} = \left(1 + \frac{\mu - X}{\sigma}\right) \times 10 + \{1 + (Y - X)\} \times 5 + 5 + \frac{\pi - P}{\delta P}$$

式中:

X: 为试验培养基上菌落直径均值

Y: 为对照培养基上菌落直径均值

P: 为生长率

μ 和 σ : 为本实验室菌落直径的质控数据

π 和 δP : 为本实验室生长率的质控数据

1.3.2 检定 SS 琼脂的质控数据: 用同一批原料, 按各种 SS 配方, 制备 SS 琼脂, 进行生长率 (抑制率) 和菌落直径测定。

选择质量佳的营养琼脂作为对照培养。

选择优于 83 年全国 SS 琼脂鉴定参考标准 (沙门氏菌 (*Salmonella*) 生长率 > 70%; 痢疾志贺氏菌 (*Shigella*) 生长率 > 40% 和大肠杆菌 (*Escherichia* > 85%); 和食品卫生微生物检验用干燥培养基生产质控和质量标准 (菌落直径: 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) > 1.8mm, 痢疾

志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) > 1.5mm 的 SS 配方, 制备多批干燥培养基。

用鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*), 痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 等三株标准菌株, 在各批号的 SS 琼脂上测定生长率、抑制率、菌落直径, 然后数据进行统计处理, 计算各菌株的平均菌落直径 (μ), 菌落直径标准差 (σ), 总体率 (π) 和率的标准误 (δp)。

本实验室质控数据: 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*): $\mu = 2.087$ $\sigma = 0.417$ $\pi = 101.13$ $\delta p = 3.411$; 痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*): $\mu = 1.502$ $\sigma = 0.537$ $\pi = 64.96$ $\delta p = 8.98$; 大肠杆菌 (*E. coli*): $\mu = 1.449$ $\sigma = 0.442$ $\pi = 14.796$ $\delta p = 3.118$;

1.4 本实验室检定 SS 琼脂质量控制标准分值^[4]

用三株标准菌株分别对质量佳的各批干燥培养基 (SS 琼脂) 进行生长率、菌落直径检测。用生长菌株分值和受抑制菌株分值的计算公式进行计算, 经统计处理, 确定本实验室质量控制标准分值。鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*): 15.355, 痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*): 13.175, 大肠杆菌 (*E. coli*): 27.595, 合计总分值: 56.125。

2 结果

2.1 SS 琼脂质量检定比较

本次实验对四个批号的 SS 琼脂进行检定, 分值计算结果表明: 总分值均小于 56.125, 未能达到质控分值要求。只有 1 和 2 号两个批号的 SS 琼脂上的鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 小计分值达到质控标准要求。四个批号的 SS 琼脂对大肠杆菌 (*E. coli*) 抑制能力和促进鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 等的的能力均较差, 见表 1。

2.2 SS 琼脂配方的优选

根据四个批号的 SS 琼脂质量分值所示的不足之处, 对胆盐、柠檬酸钠、柠檬酸铁铵、柠檬酸铁、硫代硫酸钠、中性红、煌绿等的用量进行调整, 组成 9 个不同的配方, 见表 2。实验结果表明: 除 8 号 (89.765) 和 9 号 (103.82) 两个配方

表1 4个批号的SS琼脂检定比较

培养 基号	鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>			痢疾志贺氏菌 <i>S. dysenteriae</i>			大肠杆菌 <i>E. coli</i>			合计 分值
	菌落	检出	分	菌落	检出	分	菌落	检出	分	
	直径	率		直径	率		直径	率		
	(mm)	(%)	值	(mm)	(%)	值	(mm)	(%)	值	
1	1.742	99.02	5.673	1.643	79.14	19.08	2.496	97.14	-25.015	-0.324
2	2.237	90.44	17.503	1.67	100.0	22.545	2.126	97.14	-14.795	25.253
3	1.721	64.43	-2.776	0.979	65.99	3.791	1.837	84.72	-6.137	5.122
4	1.859	57.71	0.747	1.08	67.02	6.291	2.143	91.67	-16.819	-11.275

表2 9个SS琼脂配方中各种试剂用量

试剂名称	培养基中试剂用量 (μg/g%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
胆 盐	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.5	0.42	0.43
柠檬酸钠	0.16	0.15	0.15	0.25	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
柠檬酸铁			0.07	0.05	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
硫代硫酸钠					0.37	0.37	0.35	0.35	0.35
中性红							25(mg)		
煌 绿							0.025(mg)		

表3 9个配方的SS琼脂检定比较

配 方 号	鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>			痢疾志贺氏菌 <i>S. dysenteriae</i>			大肠杆菌 <i>E. coli</i>			合计 分值
	菌落	检出	分	菌落	检出	分	菌落	检出	分	
	直径	率		直径	率		直径	率		
	(mm)	(%)	值	(mm)	(%)	值	(mm)	(%)	值	
1	1.541	69.0	-8.143	0.894	65.67	4.094	1.754	89.89	-9.348	-13.397
2	1.552	79.33	4.795	1.039	65.72	4.354	1.914	77.53	-7.943	-8.383
3	2.062	97.03	19.126	1.05	77.63	4.429	1.767	94.35	-6.628	16.927
4	2.136	94.12	15.805	1.121	73.56	5.653	1.857	98.71	-10.738	10.719
5	1.919	34.04	6.729	1.351	87.83	8.312	1.612	66.39	6.492	21.533
6	2.073	61.70	5.103	1.128	65.03	6.073	2.17	60.17	-6.928	4.248
7	2.008	68.33	5.505	0	0	-25.559	0	0	74.899	54.846
8	2.008	85.08	10.416	0.981	61.39	4.45	0	0	74.899	89.765
9	2.212	97.02	22.528	1.006	73.52	6.392	0	0	74.899	103.82

的总分值达到质控标准要求外,其他 1~7 号的 7 个配方总分值均小于 56.125,未能达到分值质控指标要求,见表 3。

2.3 不同剂量胆盐的SS琼脂检定比较

本次实验采用四种胆盐浓度比较。结果表

明:0.42%和0.43%胆盐浓度的SS琼脂,总分值为 89.765 和 103.82,达到分值质控标准。0.5%胆盐的SS琼脂分值为 54.846(<56.125),虽然大肠杆菌 (*E. coli*) 的小计分值已达到质控标准要求,但对鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和

痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 生长有一定抑制力。而采用 0.3% 胆盐配制的 SS 琼脂总分值 (21.533<56.125) 和抑制大肠杆菌 (*E. coli*) 生长的分值 (6.492<27.595) 均未达到分值质控标准要求, 见表 2、表 3。

2.4 不同剂量的柠檬酸钠和硫代硫酸钠的 SS 琼脂检定比较

实验结果表明: 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 在含有 0.15% 柠檬酸钠的 SS 琼脂上生长分值 (19.126) 明显高于含 0.35% 柠檬酸钠和 0.37% 硫代硫酸钠的 SS 琼脂生长分值 (6.729)。而痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 在这两种 SS 琼脂上生长分值 (4.429 和 8.312), 均未达到质控标准分值要求, 但无明显差别。

3 讨论

培养基的质量优劣直接影响致病菌的检出。它的质量检测, 目前采用指示菌接种培养基观察生长情况的定性方法, 虽然可以判断培养基的质量, 但要正确评价培养基质量优劣和优选培养基的配方就存在一定的难度。本次实验应用分值计算法对 SS 琼脂的质量和优选配方进行研究。该方法是采用三株指示菌, 在培养基上生长的菌落直径、菌落差和生长率, 与质量控制数据比较计算分值的综合评价。查阅 1986.1~1996.9 Medline CD-ROM 文献库中相关文献 84 篇和 1983.1~1996.8 的国内文献库中相关文献 10 篇, 未见有类似分值计算法评价干燥培养基质量方法的报道。

从市场收集四个批号的 SS 琼脂进行质量检测, 计算分值研究所的不足之处, 调整柠檬酸钠、硫代硫酸钠、胆盐、柠檬酸铁等试剂的用量, 组成 9 个不同的 SS 配方, 应用分值计算方法进行筛选研究。结果表明, 胆盐等 4 种试剂

对抑制大肠杆菌 (*E. coli*), 促进鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 生长所使用的剂量相互之间密切相关。采用 0.3% 胆盐对大肠杆菌 (*E. coli*) 抑制能力弱 (分值为 6.492<27.595), 而 0.5% 胆盐不利于鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) (分值为 5.505<15.355) 和痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) (分值为 -25.559<13.175) 的生长, 最佳的用量为 0.42% 和 0.43%。但胆盐的质量和用量还直接影响柠檬酸钠和硫代硫酸钠的使用剂量, 当胆盐的浓度下降时, 柠檬酸钠对大肠杆菌 (*E. coli*) 的抑制作用发挥不明显。在 0.07% 柠檬酸铁及不含硫代硫酸钠的情况下, 增加柠檬酸钠的用量, 有缓和胆盐对鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 的毒性, 而对痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 无明显变化。

9 号配方是本次实验中筛选的最佳配方, 总分值已达到质控标准要求 (103.82>56.125), 但从鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 和痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 的分值显示, 该配方中还存在两个不足之处: (1) 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 的生长率未能达到最佳要求; (2) 促进痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*) 的生长和缩短其每代增殖的时间还不够, 这两个问题有待进一步研究解决。值得指出的是干燥培养基生产企业在更换原料时, 必须进行检测, 调整原料用量。

参考文献

- [1] 陈天寿, 严德喜, 李根生等. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995, 350.
- [2] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 150.
- [3] 杨更发, 朱敏. 中国消毒学杂志, 1996, 13: 84~87.
- [4] 杨更发. 浙江预防医学, 1998, 10: (2) 70~71.