

细菌测试片的冷水可凝凝固剂初步研究和应用

吴许文^{1,2,3} 吴清平^{2*} 张淑红² 黄汝添²

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 湖北 武汉 430071)

(2. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 微生物测试片具有携带方便、不用配制培养基的优点,为一种新型的检测工具。测试片的技术关键是冷水可凝胶,本文通过研究新的冷水可凝凝固剂(HKG)的保水性能、pH、强度、微生物利用及降解和抑菌效果,再组装成细菌菌落总数测试片,进行特异性和食品样品效果检验,并与倾注平板法比对,评价其作为微生物测试片凝固剂的可行性。结果显示 HKG 对 16 种微生物均无抑菌作用, pH 为中性,强度为 $340.31 \text{ g/cm}^2 \pm 48.71 \text{ g/cm}^2$; 具有良好的保水性能; HKG 在短时期(5 d)内不支持微生物生长,不被分解利用,在测试片和倾注培养法中 5 种测试菌株均可达相同的灵敏度($P = 0.438 > 0.05$),各菌株菌落数($P = 0.442 > 0.05$)和食品样品菌落数($P = 0.718 > 0.05$)比较在统计学上无显著差异。结果表明, HKG 能较好地应用于细菌测试片计数,并能提高检测效率。
关键词: 快速检测, 微生物测试片, 培养基凝固剂

Preliminary Study and Application on Cold Water Gelling Agent for Bacterial Testing Slip

WU Xu-Wen^{1,2,3} WU Qing-Ping^{2*} ZHANG Shu-Hong² HUANG Ru-Tian²

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Microbial testing slip is a new detection tool which is convenient to carry and free of media preparation. Since the key technique of the testing slip is cold water gelling agent, a new cold water gelling agent (HKG)'s water retention capacity, pH value, gels strength, source utilization by microorganisms and inhibition effect were tested in this assay. Furthermore, detection effect and specificity of HKG total plate count bacterial testing slip of food samples were compared with pour-plate method in order to evaluate its feasibility of gelling agent in microbial testing slip. HKG showed no antibacterial effect to 16 kinds of microorganisms, also the features of neutral pH, gels strength of $340.31 \text{ g/cm}^2 \pm 48.71 \text{ g/cm}^2$, good water retention capacity, HKG can not support the growth of microbe or be degrading by microorganism in short time (5 d). HKG testing slip had the same sensitivity ($P = 0.438 > 0.05$) as pour plate method in detection of 5 strains, the colony count of various test strains ($P = 0.442 > 0.05$)

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2008A0401001); 广州市农业科技项目(No. GZCQC0602FG001C)

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

收稿日期: 2009-04-20; 接受日期: 2009-07-02

and the colony count of food samples ($P = 0.718 > 0.05$) of HKG testing slip had no significant difference in statistics compared with pour plate method. As the gelling agent, HKG shows good performance in bacterial testing slip, and can also improve the detection efficiency.

Keywords: Rapid detection, Microbial testing slip, Gelling agent of medium

测试片检测法是从传统平板法简化和改进而成的一项检测新方法, 它是以纸片、凝胶或无纺布等代替琼脂作为培养基载体培养微生物的一种检测新技术。与传统方法相比, 其最大优点是省却了配制培养基和灭菌等繁重的准备工作; 直接将样品接种测试片, 适宜温度培养后计数, 使用后经灭菌便可弃置, 使用简便, 缩短检测时间且适合户外操作和检测设备缺乏的基层实验室; 另经产品化的培养基测试片可以减少配制培养基的差错(如配方复杂或需调节 pH 的培养基), 从而避免造成检验结果的误差。

测试片的培养基载体对检测效果有重要影响, 目前滤纸、冷水可凝胶和无纺布是 3 种主流载体, 其中冷水可凝胶因其透明、结构稳定、回收率高和容易挑菌等优点而使此类测试片的综合评价高于其他 2 种材质载体的测试片。冷水可凝胶是一类遇冷水可凝固的亲水性胶体, 能溶解于水, 并在一定条件下充分水化形成粘稠的溶液或胶体大分子物质^[1]。其化学成分为天然多糖及衍生物或氨基酸构成^[2], 它们一般不是微生物的营养成分, 只起固化培养基作用^[3]。全球领先测试片生产商美国 3M 公司正是使用冷水可凝胶作为其测试片的载体, 但其价格昂贵, 不适合国内一般实验室的常规使用^[4], 因此研发具有我国自主知识产权, 无毒、透明、稳定、不易被分解、胶强度和保水性好的微生物测试片冷水可凝胶, 具有重要意义。

本研究的冷水可凝胶以细菌的胞外多糖、植物多糖和高吸水性树脂为主要原料, 这些均为无毒、透明、易溶于水形成凝胶的材料, Jain R、Babbar SB 和孙永将它们应用于培养基中作为凝固剂并取得良好的效果^[3,5,6]。本研究通过测试 HKG 胶体性能和用于微生物测试片的效果进行研究, 并评价其用于测试片的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基及试剂: TTC(氯化三苯四氮唑)、生理

盐水、75%乙醇、营养琼脂、营养肉汤、碳酸氢钠由广东环凯微生物科技有限公司提供; 自行研发的冷水可凝胶(HKG)主要成分: 黄原胶、瓜尔豆胶、刺槐豆胶和聚丙烯酸钠分别由中山市恒和贸易有限公司和佛山市禾丰生物科技有限公司提供; HKG 基本培养基和葡萄糖基本培养基自行配制(成分为磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸铵、二水合柠檬酸钠、HKG/葡萄糖); HKG 菌落总数测试片的制备: 详见吴清平等“一种快速检测微生物的测试片及其制备方法应用”专利^[7]。

1.1.2 实验菌株: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 8099、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*) CMCC 50115、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (ATCC 6538、CMCC 26003、ATCC 25923)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CMCC 63501、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 9027、宋氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*) CMCC 51592、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*) CMCC 51105、副溶血型弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) ATCC 51329、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) CMCC 94002、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*) CMCC 49027、白假丝酵母菌(*Candida albicans*) ATCC 10231、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) GIM2.84、黑曲霉(*Aspergillus niger*) ATCC 16404 等标准株由广东省微生物研究所检测新技术研究发展中心提供。

1.1.3 主要仪器设备: BROOKFIELD LFRA-4500 凝胶强度测定仪、720 pH 计(Beckman)、生物安全柜(BHC-1100II)、DL-CJ-2N 超净工作台、GHP-9160 电热恒温培养箱、ES-215 全自动高压灭菌锅、AG245 型电子天平、电动漩涡混合器等。

1.1.4 检测样品: 实验所用样品熟食、茶叶、糕点等, 均采购自超市和市场。

1.2 实验方法

1.2.1 测试片法: 吸取 1 mL 新鲜制备的样品液, 翻开测试片的上层膜, 均匀滴于测试片中央, 然后小心盖上层膜, 稍倾侧纸片使检样液充满测试片的

培养区, 静置 1 min~2 min 待凝胶固化, 后 37°C 培养 24 h, 计数红色菌落。

1.2.2 倾注培养法: 按照 GB/T 4789.2-2003 操作规范步骤进行操作计数。

1.2.3 保水性和 pH 值测定: 将 0.025 g、0.05 g 和 0.075 g 的 HKG 和琼脂粉末分别放于 9 cm 平皿, 加入 5.0 g 去离子水, 混匀, 则其质量百分比分别为 0.5%、1% 和 1.5%, 待充分溶胀后, 放入 37°C 恒温培养箱并打开皿盖, 每 4 h 称量并计算剩余的水质量($M_1 =$ 现在质量 - 平皿和粉末质量), 同时按照上述方法以去离子水作为对照。并使用 720pH 计测定 HKG 各浓度的 pH 值。保水率 = 剩余的水质量/原来的水质量 $\times 100\% = (M_1/5.0) \times 100\%$ 。

1.2.4 强度测定: 以能固定微生物生长为标准, 滴加 1 mL 去离子水于 0.05 g HKG 剂粉末, 凝固后, 使用 BROOKFIELD LFRA-4500 凝胶强度测定仪测定凝胶强度, 同时测定 1.0% 琼脂平板强度, 制备 3 个样品做平行试验。使用测定仪参数设置: 触发点 3.0 g、距离 0.2 mm、速度 0.1 mm/s、圆柱形探头面积 1.266 cm²。强度公式为: 凝胶强度(g/cm²) = 测定读数/1.266。

1.2.5 抑菌试验: 将 16 种菌株(1.1.2)制备成 10⁶ CFU/mL 的新鲜菌悬液, 吸取菌液各 0.2 mL 于相应的琼脂平板中(副溶血型弧菌用 3.5 g/L NaCl 营养琼脂, 细菌用营养琼脂, 真菌用 PDA)涂布均匀; 分别称取 0.5 g、1.0 g、2.0 g HKG 粉末和 1 g 的琼脂粉末, 分别转移到 250 mL 三角瓶中, 各加入 100 mL 去离子水, 1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 15 min 后, 分别吸取上述溶液 20 μ L 到直径 5 mm 灭菌滤纸片, 载有 HKG 的 3 片纸片平均分布放置于平板中, 而载有琼脂纸片摆放于平板中央; 参照国家卫生部《消毒技术规范》2002 版 2.1.8 抗(抑)试验操作, 观察各浓度的 HKG 会否抑制微生物生长, 是否出现抑菌圈。

1.2.6 HKG 能否被微生物分解利用试验: 分别配制 HKG 粉末/葡萄糖为唯一碳源的基本培养基, 制备灭菌后, 倒平板备用, 将活化的大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白假丝酵母菌、酿酒酵母、黑曲霉以无菌生理盐水调至浓度为 10⁶ CFU/mL, 取一环分别划线接种于 HKG 基本培养基平板和葡萄糖基本培养基平板上; 恒温培养箱中特定温度培养, 观察两种平板的菌落生

长情况。

1.2.7 测试片的灵敏度测试: 制备大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌新鲜菌液, 各取 1 mL 于一支无菌试管中得到混合菌液, 以无菌生理盐水稀释 10³、10⁴、10⁵ 和 10⁶ 倍, 每个浓度梯度进行 3 个平行检测, 按 1.2.1 测试片法和 1.2.2 倾注培养法操作计数。

1.2.8 测试片的菌落计数: 制备大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌新鲜菌液并分别稀释至 10² CFU/mL, 按 1.2.1 测试片法和 1.2.2 倾注法进行 2 个平行检测, 培养后计数。

1.2.9 食品检测研究: 从超市和市场采集熟食, 茶叶和糕点等实际样品共 30 份, 参照 1.2.1 测试片法和 1.2.2 倾注培养法-菌落总数检测进行检测结果比对。

2 结果

2.1 凝胶保水性能和 pH 测定

由图 1 可以看出, 在 37°C 恒温培养箱开盖放置 16 h 后, 空白对照已经蒸发, 而 0.5% HKG 保水率最高, 为 14%; 其次是 1.5% 琼脂, 为 8%; 浓度为 0.5% 时, HKG 的保水性能较琼脂好, 而在 1.5% 时, 琼脂保水性能较 HKG 好。以上结果表明 HKG 具有一定的保水效果, 能稍延缓水分的蒸发。而 0.5%、1% 和 1.5% HKG 浓度的 pH 值分别为 6.93、7.02 和 6.98, pH 为中性。HKG 浓度的增加对 pH 影响不大。

2.2 凝胶强度测定

从表 1 形成凝胶强度的测定结果可知, HKG 平板和琼脂平板的凝胶强度无显著性差异, $t = -2.80$, $P = 0.107 > 0.05$, 因此, HKG 和琼脂具有相当的凝胶强度。

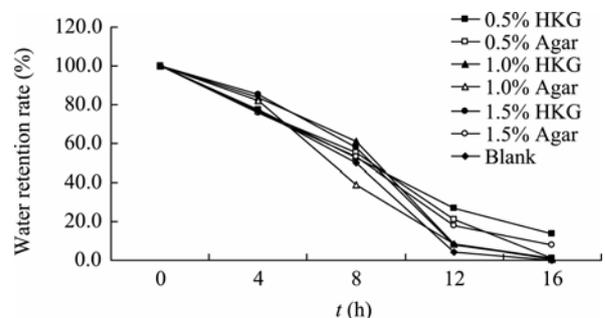


图 1 HKG 的保水性能

Fig. 1 Water retention of HKG

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

表 1 琼脂平板和 HKG 平板强度($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Gels strength of agar plate and HKG plate

凝固剂 Gelling agent	琼脂平板 Agar plate	HKG 平板 HKG plate
Gels strength (g/cm^2)	395.61 \pm 21.96	340.31 \pm 48.71

2.3 抑菌试验结果

从表 2 可知, 微生物在特定平板上生长没有抑菌圈出现, 抑菌圈的直径均为 0 cm, 以上结果表明 HKG 不会抑制 16 种微生物的生长, 具有作为培养基凝固剂的基本条件。

表 2 抑菌效果试验
Table 2 Inhibition effect test

菌株 Strains	抑菌圈 Inhibition ring	菌株 Strains	抑菌圈 Inhibition ring	菌株 Strains	抑菌圈 Inhibition ring	菌株 Strains	抑菌圈 Inhibition ring
<i>Escherichia coli</i> 8099	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	<i>Shigella dysenteriae</i> CMCC 51105	-	<i>Proteus vulgaris</i> CMCC 49027	-
<i>Salmonella typhi</i> CMCC 50115	-	<i>Bacillus subtilis</i> CMCC 63501	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	-	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538、 <i>Staphylococcus aureus</i> CMCC 26003	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 51329	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GIM2.84	-
		<i>Shigella sonnei</i> CMCC 51592	-	<i>Listeria monocytogenes</i> CMCC 94002	-	<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positivity; -: Negativity.

2.4 HKG 能否被微生物分解利用试验

如表 3 所示, 在葡萄糖基本培养基上, 除了酿酒酵母和黑曲霉培养 2 d 开始生长外, 其他各菌株在 1.5 d 便开始生长; 而在 HKG 基本培养基上黑曲霉第 5 天开始生长, 其他菌株在第 6 天才开始生长。结果表明 HKG 在短时期内不支持微生物生长和被分解利用, 培养基的外观形态和质地保持完好。

2.5 HKG 菌落总数测试片的灵敏度测试

采用 HKG 菌落总数测试片和国标倾注培养法灵敏度比对结果如表 4, 对 30~300 之间的菌落数进行方差分析, $t = -0.961, P = 0.438 > 0.05$, 表明 HKG 测试片和倾注培养法上生长的菌落数无显著差异, 两种方法可以达到相同的检测限, 灵敏度相当。

表 3 试验菌株在 HKG/葡萄糖基本培养基上出现生长的时间

Table 3 Culture time of various test strains in HKG/glucose minimal medium

菌株 Strains	HKG 基本培养基(d) HKG minimal medium	葡萄糖基本培养基(d) Glucose minimal medium
<i>Escherichia coli</i> 8099	6	1.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	6	1.5
<i>Bacillus subtilis</i> CMCC 63501	6	1.5
<i>Salmonella typhi</i> CMCC 50115	6	1.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6	1.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GIM2.84	6	2
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	5	2

表 4 两种方法的灵敏度测定($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Detection of sensitivity by 2 methods

培养方法 Culture method	空白 Blank	稀释倍数 Dilution factor			
		10^3	10^4	10^5	10^6
HKG testing slip method	0	Uncountable	315 \pm 8.14	42 \pm 2.52	5 \pm 1.0
Pour-plate method	0	Uncountable	338 \pm 16.30	44 \pm 6.03	4 \pm 0.58

2.6 HKG 菌落总数测试片的菌落计数

采用 HKG 菌落总数测试片和国标倾注培养法进行比对各试验菌株菌落总数, 结果如表 5, $t = 0.804$, $P = 0.442 > 0.05$, 表明两种方法对 5 种菌的菌落计数无显著性差异。测试片培养效果见图 2。

表 5 两种方法测定试验菌株菌落总数($\bar{x} \pm s$, $n=2$)
Table 5 The number of various test strains by 2 methods

菌株 Strains	HKG 测试片法 (CFU/mL) HKG testing slip method	倾注培养法 (CFU/mL) Pour-plate method
<i>Escherichia coli</i> 8099	128 ± 25.46	132 ± 9.90
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	107 ± 21.21	120 ± 10.61
<i>Bacillus subtilis</i> CMCC 63501	90 ± 14.14	90 ± 4.24
<i>Salmonella typhi</i> CMCC 50115	236 ± 2.83	218 ± 16.97
<i>Pseudomonas aerugi-</i> <i>nosa</i> ATCC 9027	139.5 ± 2.12	110 ± 28.28

2.7 HKG 菌落总数测试片检测食品样品结果

食品样品检验结果如表 6 所示, 使用 HKG 菌落总数测试片和国标倾注培养法分别对 30 份样品检测, 结果表明这 2 种方法检测的菌落总数无显著性差异, $t = 0.365$, $P = 0.718 > 0.05$, 无显著性差异, HKG 测试片适合用于食品的菌落总数检测。

表 6 食品样品检测结果
Table 6 The detection results by 2 methods in
food samples

样品 Samples	份数 Quantity	HKG 测试片 (CFU/mL) HKG testing slip method	倾注培养法 (CFU/mL) Pour-plate method
Tea leaves	12	31 ± 28.52	29 ± 24.63
Cooked foods	12	51 ± 24.49	53 ± 25.47
Cakes	6	50 ± 31.34	48 ± 31.92
Summation	30		



图 2 大肠杆菌(左)和鼠伤寒沙门氏菌(右)菌落在测试片上生长

Fig. 2 Colony growth of *Escherichia coli* 8099(left) and *Salmonella typhi* CMCC 50115(right) on the testing slip

3 讨论

本研究的 HKG 遇冷水便可凝固, 具有一定的保水性能, 延缓水分的蒸发; pH 值为中性; 强度和琼脂无显著差异; 在短时期(5 d)内不支持微生物生长和被分解利用, 不会因微生物代谢使变形影响培养基的结构; 在抑菌试验中, HKG 对 16 种菌株均无抑菌作用, 适合用于大部分微生物的生长培养。HKG 具有无毒、不易被分解、凝胶强度和保水性好的优点。

HKG 用于细菌测试片作菌落总数计数, 与国标

倾注法比对, 两种方法可以达到相同的检测限, 灵敏度相当; 各试验菌株菌落计数和食品样品检测结果无显著性差异。进行枯草芽孢杆菌菌落培养时, 倾注培养法菌落容易扩散影响计数, 在 HKG 测试片上生长的芽孢杆菌菌落直径约 1 mm, 小于平板上的菌落直径, 因而可准确计数, 可能是由于测试片上生长空间和营养有限, 芽孢杆菌菌落不易扩散生长; 而测试片在进行大肠杆菌培养时, 因为该菌产气易使培养基裂开变形, 影响菌落生长, 数菌落时需要仔细观察计数。

HKG 为国内首个用于测试片的冷水可凝固

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

剂载体,经试验表明其具有优良的特性,能配合多种培养基使用,在后续的研究中将继续与陆桥、Difco 和 Oxiod 等知名品牌培养基进行复配,观察其效果。使用 HKG 组装的测试片,相对市面上同类型产品,具有透明度高,菌落数达到 300 CFU 仍能准确计数,可以两面观察以免计数遗漏和易于挑菌的特点,方便进行下一步分离鉴定工作,改善了现有测试片的不足;随着 GB4789/2008 在今年 3 月颁布,把测试片法作为新的检测方法之一,测试片应用渐变广泛,只需将显色培养基直接与 HKG 混合,即可制成各种相应用途的微生物测试片,如透过规模化生产,能降低使用进口测试片产品的成本,因而具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 吴剑锋, 吴 晖, 吴涛凡, 等. 几种亲水性胶体凝胶特性研究. 广州食品工业科技, 2004, 20(4): 159-161.
- [2] 屠用利. 食品胶的应用与开发. 食品工业, 2004, 3: 32-34.
- [3] 孙 永. 食品卫生微生物快速测试卡的研制. 中国科学院研究生院(武汉病毒研究所)硕士学位论文, 2007.
- [4] 吴毓薇, 吴许文, 吴清平, 等. 食品卫生微生物测试片检测技术进展. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12): 2832-2834.
- [5] Jain R, Babbar SB. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for in vitro multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. *Current Science*, 2005, 88(2): 292-295.
- [6] Babbar SB, Jain R. Xanthan gum: an economical partial substitute for agar in microbial culture media. *Current Microbiology*, 2006, 52: 287-292.
- [7] 吴清平, 吴许文, 黄汝添, 等. 一种快速检测微生物的测试片及其制备方法应用. 中国: 200910007917.3. 2009.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师名课”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!