

食品卫生微生物学检验培养基质量分析

张颖辉^{1,2,3} 吴清平^{2*} 张菊梅² 刘秀梅⁴ 蔡芷荷⁵

(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)

(4. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所 北京 100050)

(5. 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510663)

摘 要: 为探讨培养基 ISO 国际标准对国内培养基质控的等效性, 选择国内外 4 家培养基生产厂家的霉菌培养基、酵母菌培养基和显色培养基, 从质控菌株生长率、抑菌效果等方面进行质量分析对比试验。生长率质控标准菌株在各种霉菌培养基、酵母菌培养基上的生长率均值均大于 0.5, 在显色培养基上的生长率均值均大于 0.7, 符合 ISO 国际标准。经统计分析, 试验的 4 家培养基厂家生产的培养基质量水平差异不显著($P > 0.05$), 这为将新出台的培养基国家标准拟等效采用培养基 ISO 国际标准提供了基础材料和依据。

关键词: 培养基, 生长率, 抑菌效果, 质量, 食品卫生

Quality Analysis of Microbial Culture Media for Food Hygienic Detection

ZHANG Ying-Hui^{1,2,3} WU Qing-Ping^{2*} ZHANG Ju-Mei² LIU Xiu-Mei⁴ CAI Zhi-He⁵

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

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

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

(4. Institute for Nutrition and Food Safety Chinese Centers for Diseases Control and Prevention, Beijing 100050, China)

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

Abstract: To explore the equivalence of ISO culture media standards for domestic culture media quality control, fungus culture and chromogenic media were chosen from four domestic and foreign manufacturers, compared in quality control strain productivity ratio and bacteriostatic effect. The productivity ratios of productivity reference stains on fungus culture are all above 0.5, and that on chromogenic media are all above 0.7, which comply with ISO international standards. After statistical analysis of these results, there are no significant difference among these culture media ($P > 0.05$) chosen from the four culture media manufacturers in this study, which provide basic materials and basis for new national standard that is about to published to equivalent adopting ISO culture media standards.

基金项目: 广东省科技计划项目资助(No. 2004B80502003, 2005B80501007)

* 通讯作者: Tel: 86-20-87688132; E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn, zhangyinghui132@163.com

收稿日期: 2009-04-14; 接受日期: 2009-06-16

Keywords: Culture media, Productivity ratio, Bacteriostatic effect, Quality, Food hygiene

培养基是当前我国乃至全球微生物检验经典方法中所必须采用的生化试剂,其质量好坏直接影响实验结果。目前我国还没有一个系统的且适合我国食品卫生微生物学待检测现实的培养基质量控制标准,以致各相关单位采用的标准不一致,影响了检验结果的可比性与稳定性^[1]。我国拟基本采用 ISO 培养基标准内容与结构,综合参考国内外已有的相关培养基标准制定的食品卫生微生物学检验培养基质量控制的国家标准即将出台^[2-14]。本文以 ISO 的培养基质控方法^[11,12]——定量的生长率试验和定性的选择性试验,以国外专业培养基厂家的培养基作为对照培养基,对国内外 4 家培养基生产厂家生产的用于霉菌和酵母菌检验^[15]的孟加拉红琼脂培养基、PDA、OGY(Oxytetracycline glucose yeast extract Agar, 土霉素葡萄糖酵母抽提物琼脂培养基)和 Yeast dextrose chloramphenicol agar(酵母葡萄糖氯霉素琼脂培养基),以及 Aliz-gal 琼脂培养基、大肠菌群显色培养基、大肠杆菌显色培养基、蜡样芽孢杆菌显色培养基等显色培养基进行了微生物生长率方面的质量比对,为培养基国标的制订提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

1.1.1 生长率质控标准菌株:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 9763、白色念珠菌(*Canidia albicans*) ATCC 10231、桔青霉(*Penicillium citrinum*) AS 3.2788、黑曲霉(*Aspergillus flavus*) ATCC 16404、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) CMCC(B) 45103、柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) ATCC 8090、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) CMCC(B) 63303。

1.1.2 选择性质控标准菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、大肠埃希氏菌(*Escherichia coil*) ATCC 25922、粪链球菌(*Enterococcus faecals*) CMCC(B) 32223、粪肠球菌(*Enterococcus faecals*) ATCC 29212、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CMCC(B) 63501。

以上菌株均由广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.2 培养基

孟加拉红琼脂培养基和 PDA 分别由广东环凯微生物科技有限公司(广州)、北京陆桥技术有限责任公司(北京)、中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心(上海)和 Oxoid(英国)提供,分别编号为 A、B、C、D, OGY 由 Oxoid 提供, Yeast dextrose Chloramphenicol agar 由中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心提供, Aliz-gal 琼脂培养基、大肠菌群显色培养基、大肠杆菌显色培养基和蜡样芽孢杆菌显色培养基由广东环凯微生物科技有限公司(广州)提供,以 Oxoid 提供的沙氏葡萄糖琼脂培养基和 BD(美国)提供的胰蛋白胍大豆琼脂培养基作为对照培养基^[12]。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液制备:取试验菌株培养物少许,通过血细胞计数板计数分别制成 10^4 CFU/mL~ 10^6 CFU/mL 的活菌悬液,依次作 10 倍递减稀释液,制备成一系列菌浓度不同的菌悬液,待用^[16]。

1.3.2 培养基制备:分别将 4 家培养基按要求称量,溶于一定量的蒸馏水中, 1.01 MPa 灭菌 15 min。

1.3.3 培养基检验:取 3 个适宜稀释度的菌悬液 1 mL 于灭菌平皿中,每个稀释度做 2 个平皿,倾注培养基,混匀,待琼脂凝固后倒置于 25°C~28°C 培养箱培养, 3 d 后开始观察计数,计算生长率,共培养观察 5 d。阴性对照组以 1 mL 0.85%生理盐水代替菌悬液。试验重复 3 次。

1.3.4 生长率:将适量生长率质控标准菌株分别接种至测试培养基及对照培养基中,比较两者菌落总数的比值,采用定量的方法评价培养基的微生物学性能。生长率 P_R 的计算见式(1)。

$$P_R = \frac{N_s}{N_0} \quad (1)$$

式中:

N_s ——从一个或多个待测培养基平板上得到的菌落总数;

N_0 ——从一个或多个规定的参考培养基平板上获得的菌落总数(该菌落总数应 ≥ 100 CFU)。

参照 ISO 等标准,合格霉菌和酵母菌培养基上质控标准菌株的生长率不得低于 0.5,合格显色培养基上的质控标准菌株的生长率不得低于 0.7^[12]。

1.3.5 选择性: 在选择性培养基的定性试验中, 选择性质控标准菌株的生长应该全部被抑制。

2 结果

2.1 霉菌培养基、酵母培养基的质量比对研究
计数生长率质控标准菌株酿酒酵母、白色念珠菌、桔青霉、黑曲霉在霉菌培养基以及酵母培养基和对照培养基沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的菌落数, 生长率均值均大于 0.5, 符合 ISO 国际标准; 选择性质控标准菌株金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌的生长全部被抑制; 各培养基的阴性对照均未长菌。对质控标准菌株在国内外 4 个厂家的孟加拉红琼脂培养基、PDA 上的生长率经 Levene 方差齐性检验, 结果差异不显著($P > 0.05$), 即酿酒酵母、白色念珠菌、桔青霉、黑曲霉于国内外 4 家不同厂家生产的孟加拉红琼脂培养基、PDA 上的生长差异不显著, 结果详见表 1。

2.2 显色培养基质量分析研究
计数大肠埃希氏菌、产气肠杆菌、柠檬酸杆菌和蜡样芽孢杆菌等质控菌株在相应显色培养基和对照培养基胰蛋白胨大豆琼脂培养基上生长的菌落数生长率均大于 0.7, 符合 ISO 国际标准; 选择性质控标

准菌株金黄色葡萄球菌、粪链球菌的生长全部被抑制; 各培养基的阴性对照均未见菌落生长, 结果详见表 2。

3 讨论

本研究选择了国内外 4 家培养基生产厂家的霉菌培养基、酵母培养基和部分显色培养基, 从质控菌株生长效果、抑菌效果等方面进行质量分析研究, 数据表明实验所用培养基质量均符合 ISO 国际标准, 试验的 4 家不同培养基厂家生产的这些培养基质量水平不存在统计学上的显著差异($P > 0.05$), 这为将新出台的培养基国家标准拟等效采用培养基 ISO 国际标准提供了基础材料和依据。

培养基的 ISO 国际标准有完备的系统性和良好的结果判断可操作性, 且符合我国培养基质量的具体情况, 对于国内的培养基同样是良好的质控标准, 有很好的等效性。我国拟基本采用 ISO 培养基标准内容与结构, 综合参考国内外已有的相关培养基标准, 依据我国食品卫生微生物学待检测现实的培养基质量控制的国家标准将出台, 将为培养基厂家和相关部门提供系统而完备的培养基质控依据。

表 1 标准菌株在培养基上的生长率均值
Table 1 Average productivity of reference stains on media

培养基 Media	生长率均值 Average productivity			
	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	桔青霉 <i>Penicillium citrinum</i>	黑曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>
孟加拉红琼脂培养基 Rose bengal agar	A 1.13	0.87	0.83	0.92
	B 1.04	0.91	0.85	0.94
	C 0.95	0.91	0.99	0.88
	D 1.24	0.86	0.97	1.02
P 值 P value	0.39	0.95	0.30	0.48
马铃薯葡萄糖琼脂培养基 Potato dextrose agar	A 1.30	0.93	0.93	1.00
	B 1.23	0.92	0.98	1.02
	C 1.10	1.02	1.01	0.96
	D 1.12	1.16	0.92	0.93
P 值 P value OGY	0.71	0.05	0.71	0.64
(95%置信区间) Oxytetracycline glucose yeast extract agar (95% confidence interval)	1.04 (0.68,1.41)	1.19 (0.81,1.56)	0.96 (0.76,1.17)	1.00 (0.77,1.23)
酵母葡萄糖氯霉素琼脂培养基 (95%置信区间) Yeast dextrose chloramphenicol agar (95% confidence interval)	0.80 (0.23,1.26)	0.97 (0.83,1.11)	1.00 (0.87,1.14)	1.13 (0.46,1.80)

表2 标准菌株在显色培养基上的生长率
Table 2 Productivity of reference stains on chromogenic media

培养基 Media	菌株 Reference stains	实验次数 Times			生长率均值 (95%置信区间) 95% confidence interval
		1	2	3	
Aliz-gal 琼脂培养基 Aliz-gal agar	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	0.93	0.75	0.89	0.86 (0.62,1.09)
	产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	0.88	0.98	1.08	0.98 (0.73,1.23)
大肠菌群显色培养基 Chromogenic coliform agar	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	0.82	0.79	1.11	0.91 (0.46,1.35)
	柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	1.03	1.26	1.06	1.12 (0.81,1.43)
大肠杆菌显色培养基 Chromogenic <i>E. coli</i> agar	大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	0.82	0.73	0.78	0.78 (0.67,0.88)
	蜡样芽孢杆菌显色培养基 Chromogenic <i>Bacillus cereus</i> agar	1.14	0.79	1.81	0.91 (0.43,1.40)

参 考 文 献

- [1] 吴清平, 孟凡亚, 蔡芷荷, 等. 微生物培养基质量控制技术和标准. 微生物学通报, 2006, 33(6): 128-132.
- [2] Curtis GDW. A review of methods for quality control of culture media, *International Journal of Food Microbiology*, 1985, 2: 13-20.
- [3] NCCLS. NCCLS document M22-A2 (ISBN 56238-316-7), 1996, 16(16).
- [4] Otto V. Mycological culture media and its quality control. *American Journal of Medical Technology*, 1977, 43(4): 345-348.
- [5] JFM 000AA, Appendix A. Testing methods for use in quality assurance of culture media, *International Journal of Food Microbiology*, 1985, 2: 133-136.
- [6] The International Committee for Food Microbiology and Hygiene, Working Party for Culture Media (ICFMH, WPCM). Quality assurance and quality control of microbiological culture media, 1984.
- [7] NCCLS. NCCLS document M22-A3 (ISBN 1-56238-536-4), 2004, 24 (19).
- [8] 卫监发. 食品卫生微生物检验用干燥培养基生产质控和质量标准. 1993, 第7号.
- [9] WS/T232-2002. 商业性微生物培养基质量检验规程.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部. 北京: 化学工业出版社, 2005, pp.附录 89-附录 98.
- [11] ISO/TS 11133-1: 2000. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media-Part 1: General guideline on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- [12] ISO/TS 11133-2: 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media-Part 2: Practical guideline on performance testing of culture media.
- [13] SN/T 1538.1-2005. 培养基制备指南. 第1部分: 实验室培养基制备质量保证通则.
- [14] SN/T 1538.2-2007. 培养基制备指南. 第2部分: 培养基性能测试使用指南.
- [15] GB/T 4789.15-2003. 食品卫生微生物学检验. 霉菌和酵母计数.
- [16] GB/T 4789.2-2003. 食品卫生微生物学检验. 菌落总数测定.