



蜡样芽孢杆菌显色培养基检测效果初步评价

卢勉飞¹, 姚华卓¹, 腾昆仑¹, 蔡芷荷¹, 吴清平^{2*}
(1.广东环凯微生物科技有限公司, 广州 510663;
2.广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要: 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种在环境中广泛存在, 极易污染食品及食品原料的细菌, 也是重要的食源性条件致病菌。目前, 国内检测食品中蜡样芽孢杆菌仍采用传统的方法, 其操作繁琐、特异性低。为提高检测效率, 开发出一种蜡样芽孢杆菌显色培养基(HKMCB), 与国外OXOID同类产品蜡样芽孢杆菌显色培养基(OXCB)及传统培养基MYP在特异性、选择性及灵敏度方面进行了比较和初步评价。结果显示, HKMCB显色培养基均具有较好的特异性, 优于传统培养基MYP。HKMCB及OXCB显色培养基均具有较好的选择性, 对非目标菌抑制率比传统培养基MYP高50%。8株蜡样芽孢杆菌在3种培养基上的生长率均大于0.8。经统计分析, 试验的3种培养基生长率差异不显著($P>0.05$)。结论: 利用显色培养基检测蜡样芽孢杆菌, 较常规的生化学检测方法具有较高的特异性和选择性, 检测效果良好。

关键词: 显色培养基; 蜡样芽孢杆菌; 检测效果

中图分类号: TS 201.3 文献标志码: A 文章编号: 1005-9989(2013)06-0313-05

Primary evaluation of the detecting effect for chromogenic *Bacillus cereus* medium

LU Mian-fei¹, YAO Hua-zhou¹, TENG Kun-lun¹, CAI Zhi-he¹, WU Qing-ping^{2*}
(1.Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangzhou 510663;
2.Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract: *Bacillus cereus* is an important food-borne opportunistic pathogen which widely exists in environment and food. Because of the deficiencies of complicated operation and low specificity in the general method of the isolation and identification of *B.cereus*, a new chromogenic medium (HKMCB) was designed in this assay. Through detecting the reference strains, the specificity, selectivity and sensitivity of HKMCB were studied and compared with OXCB and MYP. The results showed that the specificity of HKMCB were better than that of MYP. The selectivity of HKMCB was same as that of OXCB, and 50% higher than that of MYP for non target bacteria inhibition. The productivity of 8 strains on three culture were all above 0.8, After statistical analysis of these results, there are no significant difference among

收稿日期: 2012-11-12

*通讯作者

基金项目: 广东省重大科技专项(2012A080203014); 广州市发改委生物产业项目(2012B031000019)。

作者简介: 卢勉飞(1973—), 女, 高级工程师, 研究方向为微生物检测新技术研究。



three culture media ($P>0.05$) in this study. In conclusion, *B. cereus* chromogenic medium has a good effect in detecting *B. cereus* because it has high specificity and selectivity.

Key words: chromogenic media; *Bacillus cereus*; detecting effect

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)属于需氧杆菌,为革兰阳性粗大杆菌, (3~5) $\mu\text{m} \times$ (1~1.2) μm ,有椭圆形芽孢,能产生葡萄糖苷酶、卵磷脂酶、酪蛋白酶和葡萄糖苷酶,不发酵木糖和甘露醇。其芽孢能耐高温,至少需100 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min以上才能杀死,在28~35 $^{\circ}\text{C}$ 适宜温度可大量繁殖^[1-2]。它同昆虫病原菌苏云金杆菌(*B. thuringiensis*)、人畜病原菌炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)、蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)、韦氏芽孢杆菌(*B. weihenstephanensis*)组成芽孢杆菌属蜡样芽孢杆菌组(*B. cereus* group),它们的形态特征、生理生化特征非常相似,并有着极高的DNA同源性,是6个对人类活动有影响的菌种^[2-3]。蜡样芽孢杆菌是食品中最常检出的病原微生物,特别是含淀粉较多的各类食物更易受到该菌的污染。由于是条件致病菌,多数情况下,引起该类食物中毒的食品中蜡样芽孢杆菌的数量在 10^5 ~ 10^8 cfu/g,如污染菌量小则不足以致病^[4-7]。目前美国、澳大利亚和欧盟几个成员国都在其国内法规和法令中对各类食品中的蜡样芽孢杆菌数量有所限定。

目前,我国常规检测方法选用的MYP传统培养基,由于配制时需用鸡蛋制作卵黄添加到基础培养基中,存在操作麻烦和容易污染的不足,给检测技术人员带来极大的工作量,不但影响工作效率,而且不利于及时诊断和治疗,不能满足食品中病原菌快速检测的现实需要^[5]。另外,利用卵磷脂酶分解培养基中的卵黄产生过大的沉淀带,导致菌落之间会蔓延连接而难以计数的缺点,给检测结果带来极大的不确定性^[8]。

显色培养基是根据酶的特征设计的对微生物进行快速检测的一种分离培养基,基本原理是:在分离培养基中加入检测某些菌种的特异性酶底物,该底物为人工合成,由产色基团和微生物可代谢物质组成,通常为无色,但在特异性酶作用下游离出发色基团并显示一定颜色,直接观察菌落颜色即可对菌种做出初步鉴定,具有快速、简便和经济的特点,为蜡样芽孢杆菌快速检测构建了一个技术平台^[9-10]。本实验室应用自主研发的蜡样芽孢杆菌显色培养基与国外同类商品化产品对

质控菌株进行了测试,以比较培养基的性能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)CMCC(B)63303;蜡样芽孢杆菌AS1.229;蜡样芽孢杆菌AS1.196;蜡样芽孢杆菌AS1.0230;蜡样芽孢杆菌HK001;蜡样芽孢杆菌HK002;蜡样芽孢杆菌HK003;蜡样芽孢杆菌HK004;枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)DTB70105;枯草芽孢杆菌DTB70106;枯草芽孢杆菌1.22;枯草芽孢杆菌CMCC(B)63501;枯草芽孢杆菌黑色变种(*B. subtilis* var-*niger*)ATCC9372;苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)ATCC10792;巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)ATCC14945;蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*)ATCC10206;短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)DTB70104;环状芽孢杆菌(*B. circulans*)DTB70103;粪肠球菌(*Streptococcus faecalis*)ATCC29212;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC6538;大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)ATCC25922;产气肠杆菌(*E. aerogenes*)CMCC(B)45103;阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)CMCC(B)45301;费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)ATCC8090。

1.1.2 培养基及试剂 HKM蜡样芽孢杆菌显色培养基(HKMCB):本实验室研制;OXOID蜡样芽孢杆菌显色培养基(OXCB):英国OXOID公司;MYP平板、营养琼脂斜面、胰酪胨大豆琼脂(TSA)平板:广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 美国SBI公司AP4000全自动螺旋接种仪,杭州迅数HR3菌落计数仪。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备 HKM蜡样芽孢杆菌显色培养基和OXOID蜡样芽孢杆菌显色培养基按配制说明书制备成平板备用。

1.2.2 特异性试验 采用半定性方法进行。

将上述24株菌采用营养琼脂复苏,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后,分别划线接种培养基平板,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养18~24 h。观察不同细菌在平板上的菌落特征,比较各种培养基对试验菌株的特异性。



1.2.3 选择性试验 采用半定量方法进行。

将枯草芽孢杆菌等16株非目标菌采用营养琼脂复苏, 30 ℃培养24 h后, 分别用接种环挑取1环, 加入到30 mL 8.5 g/L生理盐水中配成原液($n \times 10^8$ cfu/mL), 分别用1 μ L接种环取选择性测试工作菌悬液1环, 在待测培养基平板表面划6条平行直线(如图2), 同时接种3个平板, 30 ℃培养18~24 h。培养后按以下方法对培养基计算生长指数G。每条有比较稠密菌落生长的划线则G为1, 每个培养皿上最多为6分。如果仅一半的线有菌落生长, 则G为0.5。如果划线上没有菌落生长或生长量少于划线的一半, 则G为0。记录每个平板的得分总和便得到G。非目标菌在待测培养基上生长指数 $G \leq 1$, 则选择性良好。

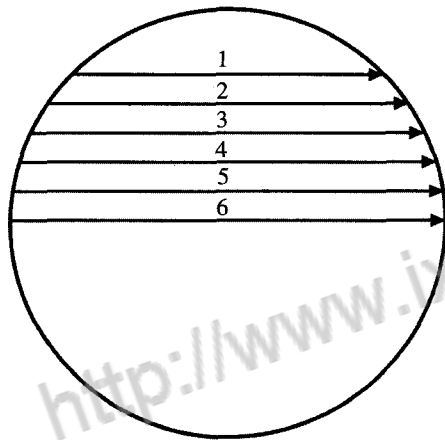


图1 非目标菌半定量划线法接种模式图

1.2.4 生长率试验 采用定量方法进行。

将8株蜡样芽孢杆菌采用营养琼脂复苏, 30 ℃培养24 h后, 分别用接种环挑取新鲜菌苔1环, 加入到10 mL 0.85%生理盐水中配成原液, 然后进行10倍梯度稀释, 取蜡样芽孢杆菌浓度为 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL的菌液0.1 mL用全自动螺旋接种仪分别接种于HKMCB平板、OXCB平板和MYP平板, 各菌液同时接种参比培养基TSA平板, 计数测试菌株的实际接种活菌量, 每种平板进行3个重复, 30 ℃培养18~24 h。观察蜡样芽孢杆菌在4种培养基上的生长情况, 并对其菌落计数, 比较蜡样芽孢杆菌在3种培养基上的生长率。

选择菌落数适中的平板进行计数, 按下列公式计算生长率 P_R 。

$$P_R = N_s / N_0$$

式中: P_R 为生长率;

N_s 为待测培养基平板上得到的平均菌落数;

N_0 为参比培养基平板上获得的平均菌落数。

目标菌在培养基上应呈现典型的生长。选择性计数固体培养基上目标菌的生长率一般不小于0.7。

1.2.5 数据分析方法 数据分析采用SPSS18.0软件。

2 结果

2.1 特异性试验

培养基的特异性结果见表1。对8株蜡样芽孢杆菌, HKMCB显色平板和MYP平板均有较典型的菌落特征。显色培养基上蜡样芽孢杆菌菌落均呈现特异性的蓝绿色, 其他杂菌除苏云金芽孢杆菌在显色培养基上为蓝绿色外, 其余菌均无色, 可与蜡样芽孢杆菌明显区分; MYP平板上蜡样芽孢杆菌菌落均呈现特异性的粉红色, 菌落周围有晕浊圈, 其他杂菌苏云金芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌均显示与蜡样芽孢杆菌同样的特征, 而巨大芽孢

表1 试验菌株在2种培养基上的特异性试验

菌株	HKMCB	MYP
蜡样芽孢杆菌CMCC(B)63303	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌AS1.229	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌AS1.196	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌AS1.0230	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌HK001	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌HK002	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌HK003	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蜡样芽孢杆菌HK004	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
苏云金芽孢杆菌ATCC10792	蓝绿色	粉红色, 有晕浊圈
蕈状芽孢杆菌ATCC10206	无色	粉红色, 有晕浊圈
巨大芽孢杆菌ATCC14945	无色	粉红色, 无晕浊圈
短小芽孢杆菌DTB70104	无色	黄色
枯草芽孢杆菌DTB70105	无色	黄色
枯草芽孢杆菌DTB70106	无色	黄色
枯草芽孢杆菌CMCC(B)63501	无色	黄色
枯草芽孢杆菌1.22	无色	黄色
枯草芽孢杆菌黑色变种ATCC9372	无色	黄色
环状芽孢杆菌DTB70103	无色	黄色
金黄色葡萄球菌ATCC6538	无色	黄色
粪肠球菌ATCC29212	无色	黄色
大肠埃希氏菌ATCC25922	无色	无色
产气肠杆菌CMCC(B)45103	无色	无色
阴沟肠杆菌CMCC(B)45301	无色	无色
费氏柠檬酸杆菌ATCC8090	无色	无色



杆菌也显示粉红色,但菌落周围无晕浊圈,其余杂菌或显示黄色或无色。试验结果表明,在显色培养基上,绝大部分芽孢杆菌类和肠道菌对蜡样芽孢杆菌的辨认无干扰作用,蜡样芽孢杆菌显色培养基具有较高的特异性;而在MYP平板上,除苏云金芽孢杆菌外,蕈状芽孢杆菌与蜡样芽孢杆菌具同样的特征,不能区分。

2.2 选择性试验

培养基的选择性结果见表2。试验结果显示, HKMCB显色平板和OXCB显色平板均有较好的选择效果。2种显色培养基上非目标菌生长均受到一定程度的抑制,除苏云金芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌G>1外,其余14株菌均G≤1,非目标菌的抑制率为87.5%。在MYP平板上16株非目标菌仅有6株G≤1,非目标菌的抑制率为37.5%,其余10株菌均为G>3。综合评价,蜡样芽孢杆菌显色培养基对非目标菌抑制率比MYP高50%,具有较高的选择性。

表2 试验菌株在3种培养基上的选择性试验

菌株	G		
	HKMCB	OXCB	MYP
苏云金芽孢杆菌ATCC10792	6	6	6
巨大芽孢杆菌ATCC14945	0.5	0.5	0.5
蕈状芽孢杆菌ATCC10206	2	2	5
短小芽孢杆菌DTB70104	0.5	0.5	6
枯草芽孢杆菌DTB70105	0.5	0.5	6
枯草芽孢杆菌DTB70106	0.5	0.5	5
枯草芽孢杆菌CMCC(B)63501	1	0.5	3
枯草芽孢杆菌1.22	1	1	3
枯草芽孢杆菌黑色变种ATCC9372	1	1	5
环状芽孢杆菌DTB70103	0.5	0.5	0.5
金黄色葡萄球菌ATCC6538	0	6	6
粪肠球菌ATCC29212	6	3	6
大肠埃希氏菌ATCC25922	0.5	0.5	0.5
产气肠杆菌CMCC(B)45103	1	1	1
阴沟肠杆菌CMCC(B)45301	1	1	1
费氏柠檬酸杆菌ATCC8090	1	1	1

2.3 生长率试验

8株蜡样芽孢杆菌在不同培养基生长率比较如表3所示。结果显示,3种培养基的生长率差异不存在统计学意义P=0.275(P>0.05),各平板以及各菌的生长率均达到0.8以上,各种菌在3种平板上的大小无明显差异。结果表明,对蜡样芽孢杆菌的检出情况, HKMCB、OXCB和MYP平板没有显著差异,3种培养基可以达到相同的灵敏度和检

测限。

表3 蜡样芽孢杆菌在3种培养基上的生长率试验

菌株	P _R		
	HKMCB	OXCB	MYP
蜡样芽孢杆菌CMCC(B)63303	0.83	0.85	0.81
蜡样芽孢杆菌AS1.229	0.86	0.80	0.85
蜡样芽孢杆菌AS1.196	0.83	0.84	0.82
蜡样芽孢杆菌AS1.0230	0.92	0.95	0.82
蜡样芽孢杆菌HK001	0.94	0.88	0.88
蜡样芽孢杆菌HK002	0.81	0.80	0.82
蜡样芽孢杆菌HK003	0.88	0.84	0.88
蜡样芽孢杆菌HK004	0.87	0.85	0.86

3 讨论

对蜡样芽孢杆菌建立起鉴别性显色快速检测技术,实现对致病菌的快速检测,可以大大地降低工作量、节省人力和物力,因而在食品安全中对提高食品质检控水平和效率具有十分重要的意义。近年来,国外商品化的显色培养基,已被许多国家的政府和检测机构采用,应用于食品、临床和环境监测等领域,给检测工作提供了很大方便,但由于成本因素国内一般厂家较少使用进口产品。我国已分别于2008年、2010年及2012年修订了食品安全国家标准 食品微生物学检验^[8],显色培养基开始逐渐进入我国的食品卫生标准,即将推出的食品微生物学检验-蜡样芽孢杆菌检验GB4789.14—2012及美国FDA Bacteriological Analytical Manual Chapter 14 Bacillus cereus-2012.2中建议:用显色培养基替代MPY琼脂进行蜡样芽孢杆菌的分离与计数。与国际及国家标准接轨的良好应用环境,必将会进一步促进显色检测技术在全国范围内得到更广泛的应用。目前,国内外已有不少应用显色培养基进行蜡样芽孢杆菌分离的文献报导^[9-16]。

随着社会的不断进步,显色培养技术也在日新月异地进行着更新换代。本实验室研究团队相继研究开发出具有自主知识产权的第一代及第二代蜡样芽孢杆菌显色培养基。本研究发现显色培养基对酶的特异性是相对的,其他芽孢杆菌类和某些肠道细菌(如粪肠球菌、肠杆菌等)也含有与蜡样芽孢杆菌相同的β-D-葡萄糖苷酶,在显色培养基上也会显示出同样的色泽,造成对目标菌的干扰(第一代)。第二代蜡样芽孢杆菌显色培养基选择的是具有更高特异性的磷脂酶,除个别芽孢杆菌如苏云金芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌外,其余芽



孢杆菌基本上不具有该种酶。对于苏云金芽孢杆菌,目前还没有任何一个生化反应可以把它与蜡样芽孢杆菌相区分,两者表型上的区别仅仅在于后者在芽孢形成时能产生位于芽孢膜外的伴孢晶体,可用显微镜观察。据文献报导,炭疽芽孢杆菌虽然也会在显色培养基上显出与蜡样芽孢杆菌和苏云金杆菌同样的色泽,但时间是在48 h后,且菌落边缘会有一圈白色,可与蜡样芽孢杆菌和苏云金杆菌相区别^[14]。

参考文献:

- [1] 解菁,宋纪文.蜡样芽孢杆菌食物中毒分析[J].实用医技杂志,2003,10(12):1492-1492
- [2] 周帼萍,袁志明.蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J].食品科学,2007,28(3):357-360
- [3] Drobniwski FA. *Bacillus Cereus*, *Bacillus Cereus* and Related Species[J]. *Clinical Microbiology Reviews*,1993,6(4):324-338
- [4] 吴瑞琪.一起蜡样芽孢杆菌污染饮水机引起的中毒事件分析[J].中国学校卫生,2008,28(6):564-564
- [5] 王巧能,杨润枝.一起蜡样芽孢杆菌引起食物中毒检验分析报告[J].中国卫生检验杂志,2007,17(5):954-954
- [6] 段红英,王沁思,丁程光,等.一起蜡样芽孢杆菌食物中毒的调查分析[J].长治医学院学报,2007,22(4):257-258
- [7] 王新元.蜡样芽孢杆菌中毒的泛化趋势与防范理念的强化[J].延安大学学报,2009,7(2):17-19
- [8] GB4789.14—2012.食品安全国家标准 食品微生物学检验-蜡样芽孢杆菌检验[S].北京:中国标准出版社
- [9] 卢勉飞,吴清平,刘云林,等.特异性酶反应在食源性致病菌检测中的应用[J].中国卫生检验杂志,2005,15(3):354-356
- [10] 张淑红,吴清平,张菊梅,等.应用显色培养基检测食品中蜡样芽孢杆菌的初步研究[J].现代预防医学,2009,36(4):622-624,634
- [11] C K Marston, C Beesley, L Helsel, et al. Hoffmaster Evaluation of two selective media for the isolation of *Bacillus anthracis*[J]. *Letters in Applied Microbiology*
- [12] European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in food stuffs[J]. *The EFSA Journal*,2005,175:1-48
- [13] R Reissbrodt, A Raßbach, B Burghardt, et al. Assessment of a New Selective Chromogenic *Bacillus cereus* Group Plating Medium and Use of Enterobacterial Autoinducer of Growth for Cultural Identification of *Bacillus* Species[J]. *J Clin Microbiol*,2004,42(8):3795-3798
- [14] M A Juergensmeyer, B A Gingras, L Restaino, et al. A Selective Chromogenic Agar That Distinguishes *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*[J]. *Journal of Food Protection*,2006,69(8):2002-2006
- [15] H Peng, V Ford, E W Frampton, et al. Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium[J]. *Food Microbiology*, 2001,18:231-238
- [16] R Reissbrodt, A Raßbach, B Burghardt, et al. Assessment of a new selective chromogenic *Bacillus cereus* group plating medium, and use of enterobacterial autoinducer of growth for cultural identification of *Bacillus* species[J]. *J Clin Microbiol*,2004,42(8):3795-3798

本刊启事

食品科技网站(<http://www.e-foodtech.net/>)投稿功能已经开通,2010年10月1日起邮箱不再执行收稿工作,邮箱自动回复将提示您登录投稿平台,请各位作者注意邮箱的自动回复。投稿流程可以登录食品科技博客(<http://blog.sina.com.cn/shipinkj>)参考。审稿期仍为两个月,您可以通过您的稿件编号等信息在平台进行稿件进度及结果的查阅。

如果您的稿件录用后(一定是确定已录用的稿件,如果您的稿件在录用之前需要修改,请您用您的稿件编号登录,在平台上投送修改稿)编辑需要您修改或补充资料,请您将补充的资料或是修改稿件发送至原收稿邮箱。另外我刊没有启用中国知网的采编平台,请您不要到知网投稿,以免耽误您稿件的审阅。某些代发论文网站与我社均毫无联系,请您注意以免上当受骗。