

显色培养基快速检测大肠菌群和大肠杆菌效果的研究

卢勉飞 吴清平 蔡芷荷 何天文

【摘要】 目的 评价大肠菌群(*Coliform*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)复合显色培养基(CCEA)的检测效果。方法 本实验室研究的显色培养基 CCEA 与经典培养基结晶紫中性红胆盐琼脂培养基(VRBA)和国外两种同类商品化显色培养基(Agar I 和 Agar II)作对比,分别对 11 种质控菌株、添加大肠杆菌或大肠菌群的 13 种无菌样品以及 4 种实际样品进行检测,对检测结果进行统计分析,以及观察对实际样品检测的符合率情况。结果 CCEA 具有良好的选择性;对 7 种质控菌株检验结果的分析,CCEA 与 VRBA 和 Agar II 比较无统计学意义;CCEA 比 Agar I 长出菌落数略多,有统计学意义。对 13 种无菌样品中添加大肠杆菌或大肠菌群检验结果的分析,CCEA 比 VRBA 长出菌落数略多,有统计学意义;CCEA 与 Agar I 和 Agar II 比较无统计学意义。对 4 种实际样品中大肠菌群检验结果的分析,CCEA 与 VRBA、Agar I 和 Agar II 比较无统计学意义;大肠菌群经验证总体符合率分别为 90%、71.88%、86.25% 和 81.25%,即符合率大小为 CCEA > Agar I > Agar II > VRBA。对 4 种实际样品中大肠杆菌检验结果的分析,CCEA 与 Agar I 和 Agar II 比较无统计学意义;大肠杆菌经验证总体符合率均为 100%。结论 本实验室研究试制的显色培养基 CCEA 优于经典培养基 VRBA 并与国外两种同类显色培养基 Agar I 和 Agar II 总体检测效果无统计学意义。

【关键词】 培养基; 大肠杆菌; 肠杆菌科

Evaluation on effects of chromogenic medium in rapid detection of *Coliform* and *Escherichia coli* LU Mian-fei, WU Qing-ping, CAI Zhi-he, HE Tian-wen. Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangzhou 510070, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the detective efficacy of Chromogenic *Coliform* and *Escherichia Coli* Agar (CCEA). **Methods** A new chromogenic medium CCEA prepared by Huankai laboratory was used to compare with a classical medium of violet red bile agar (VRBA), and other two Chromogenic media Agar I and Agar II by detecting separately 11 reference strains, thirteen sterile samples with *Coliform* or *E. coli* and other four samples, and the accordant rates of detection were observed. **Results** CCEA had the good selectivity. To seven kinds of quality strains in the resultant analysis, CCEA with VRBA and Agar I had not shown salience difference ($P > 0.05$), and CCEA with Agar II had significant difference ($P < 0.05$). CCEA showed more advantages than the Agar II. To thirteen sterile samples with *Coliform* or *E. coli* in resultant analysis, CCEA with Agar I and Agar II had shown no significant difference ($P > 0.05$), while CCEA with VRBA had significant difference ($P < 0.05$). CCEA might be more advantageous than the VRBA. In analysis of the four actual samples of *Coliform*, CCEA with VRBA, Agar I and Agar II showed no significant difference ($P > 0.05$). The accordant rates were 90%, 71.88%, 86.25% and 81.25% respectively, showing CCEA > Agar I > Agar II > VRBA. To two actual samples of *E. coli* in the resultant analysis, the CCEA with Agar I and Agar II had not shown significant difference ($P > 0.05$). The accordant rates were 100% respectively. **Conclusions** The CCEA might be more advantageous than the VRBA, having the same efficacy as with Agar I and Agar II.

【Key word】 Culture media; *Escherichia coli*; Enterobacteriaceae

大肠菌群是指一群在 37 °C 培养 24 h 能发酵乳

糖产酸产气、需氧和兼性厌氧的革兰阴性无芽胞杆菌,包括埃希菌属(大肠杆菌)、肺炎克雷伯菌属、柠檬酸杆菌属和肠杆菌属。大肠菌群主要来源于人畜粪便,故以它作为粪便污染的指标。若食品中大肠菌群数量越多,表示受粪便污染的程度越大,也就是

基金项目:广东省科技攻关项目资助课题(2005B60302011)

作者单位:510070 广州,广东环凯微生物科技有限公司(卢勉飞、蔡芷荷、何天文);广东省微生物研究所(吴清平)

受肠道中病原菌随粪便侵入的可能性越大,所以大肠群菌的检验用以评价食品的卫生质量,具有广泛的卫生学意义。经典的大肠菌群尤其是大肠杆菌的检测方法存在检测程序比较繁琐、检测周期长等缺点。显色培养法是近段时间发展的一种检测和鉴别细菌新技术,其原理是人工合成无色底物由产色基因和微生物可代谢物质两部分组成,在特异性酶作用下游离出产色基因显示特定颜色,这种利用显色底物来测定特殊酶的活性,可直接观察菌落颜色即可对菌株做出鉴定^[1-3]。这种敏感的方法提高了检测的速度和正确性,优于初期分离的培养基。省略了为鉴别而必须先分离出纯培养物的过程,而且选择合适的合成底物可实现对几个不同生化反应进行同时检测^[1,4]。

据报道,绝大多数大肠杆菌具有 β -葡萄糖醛酸酶,大肠菌群具有 β -半乳糖苷酶^[3]。依据此原理,本实验室试制的大肠菌群和大肠杆菌显色培养基(CCEA),与国外两种同类商品化显色培养基(Agar I 和 Agar II)均含有 β -D-半乳糖苷显色底物和 β -D-葡萄糖苷显色底物,大肠菌群和大肠杆菌利用不同的酶分别分解这两种底物,使不同色泽的色源游离出来显不同的色泽而区分大肠杆菌和其他的大肠菌群。这类显色培养基在国外已经广泛使用于食品中大肠菌群和大肠杆菌的同时快速检测,并已得到 FDA、AOAC 等官方的认可。大量的文献报道这种显色法具有高的敏感性和特异性,操作简便、快速,可大大节省人力和物力。为探讨显色法的实用价值,本实验室研究试制了 CCEA 培养基,并用该培养基与国外同类商品化产品以及经典方法测试了有一定代表性的菌株和食物样品,检测效果不错,现报告如下。

材料与方 法

一、材料

1. 培养基:大肠菌群和大肠杆菌显色培养基(CCEA,每 L 含蛋白胨 15 g、酵母膏粉 3 g、氯化钠 5 g、十二烷基硫酸钠 0.1 g、琼脂 12 g、混合色素 6.77 g,最终 pH 7.0 \pm 0.2)、结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)、国外显色培养基(Agar I)、国外显色培养基(Agar II)、乳糖发酵管、月桂基硫酸盐胰胨(LST)肉汤、色氨酸肉汤(靛基质试验)、Koser 枸橼酸盐肉汤 MR-VP 培养基、营养琼脂。

2. 测试菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、*E. coli* ATCC8739 *E. coli* GIM1.42、肺炎

克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)广临检-57、费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) ATCC8090、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogen*) CMCC45103、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*) CMCC45301、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*) CMCC50115、粪链球菌(*Streptococci faecalis*) CMCC32223、金黄色葡萄球菌(*Staphylococci aureus*) ATCC6538、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) GIM1.22。

3. 无菌样品(13种):牛奶、果冻、芒果糕、方便面、蛋糕、鸡蛋、奶品、八宝粥、冰棍、饼干、饮料、苹果汁。

4. 模拟样品(无菌样品中添加质控菌株):牛奶 + (*E. coli* ATCC25922)、牛奶 + (*C. freundii* ATCC8090)、果冻 + (*K. pneumoniae* 广临检-57)、芒果糕 + (*K. pneumoniae* 广临检-57)、方便面 + (*K. pneumoniae* 广临检-57)、蛋糕 + [*E. coli* ATCC8739 + *E. cloacae* CMCC(B)45301]、鸡蛋 + (*E. coli* ATCC8739 + *E. cloacae* CMCC(B)45301)、奶品 + [*E. coli* ATCC25922 + *E. aerogen* CMCC(B)45103]、八宝粥 + (*E. coli* GIM1.42 + *K. pneumoniae* 广临检-57)、冰棍 + (*E. coli* GIM1.42 + *K. pneumoniae* 广临检-57)、饼干 + [*E. cloacae* CMCC(B)45301]、饮料 + [*E. aeroge* CMCC(B)45103]、苹果汁 + (*K. pneumoniae* 广临检-57)。

5. 实际样品(4种):鸡肉、猪肉、冰棍、冰淇淋。

二、实验方法

1. 测试菌株培养实验:将上述 11 种菌种复苏,分别挑取菌落置生理盐水进行连续 10 倍递减稀释,选择 3 个合适的稀释度,各取 1 ml,倾注法分别接种于上述 4 种培养基的平板上,各接种 3 个平板,37 $^{\circ}$ C,培养 24 h。

2. 模拟样品检测实验:按照 GB/T 4789.2-2003 对部分样品用营养琼脂进行细菌总数测定^[5],选取 13 种细菌总数为 0 的无菌样品。无菌样品用生理盐水作 1:10 稀释,各挑取新鲜菌种的菌苔置生理盐水中制成含菌量约 30~300 cfu/ml 的稀释液,各取一定量加到已经 10 倍稀释的上述 13 种样品中,混匀,然后各取 1 ml 倾注法分别接种于上述 4 种培养基的平板上,各接种 3 个平板,37 $^{\circ}$ C,培养 24 h。实验次数为 1 次,3 个重复。

3. 实际样品检测实验:4 种样品分别用生理盐水作连续 10 倍递减稀释,选择合适稀释度的样品液各取 0.1 ml 分别涂布法接种到上述 4 种培养基的平板上,各接种 3 个平板,37 $^{\circ}$ C,培养 24 h。我们将采用乳糖发酵管(GB/T 4789.3-2003)法,挑取每个

培养基平板上 10 个具有典型特征的菌落分别接种到乳糖发酵培养基, 37 °C, 培养 24 h, 观察产气情况, 并进行革兰染色, 对大肠菌群进行确认^[6]。采用商检法(SN 0169-92)法, 从 CCEA 平板、Agar I 平板和 Agar II 平板上分别挑取 10 个具有典型特征的菌落分别用一定量的生理盐水稀释, 分别接种于月桂基硫酸盐胰胨(LST)肉汤、色氨酸肉汤(靛基质试验)、Koser 枸橼酸盐肉汤和 MR-VP 培养基上, 37 °C, 培养 24 h, VP 和 LST 实验培养 48 h, MR 和 Koser 枸橼酸盐实验培养 96 h, 并同时进行了革兰染色, 对大肠杆菌进行确认^[6]。符合率为经验证为大肠菌群或大肠杆菌的菌落数与显典型色泽的菌落数之比。实验次数为 1 次, 3 个重复。

结 果

1. 测试菌株在 CCEA、VRBA、Agar I 和 Agar II 上培养结果比较: 在 CCEA 平板上, 大肠菌群和大肠杆菌菌落生长的典型性状分别为橙红色和蓝绿色; 在 VRBA 平板上, 大肠菌群和大肠杆菌生长菌落的典型性状均为红色; 在 Agar I 平板上, 大肠菌群和大肠杆菌生长菌落的典型性状为粉红色和绿色; 在 Agar II 平板上, 大肠菌群和大肠杆菌生长菌落的典型性状为淡蓝色和橙红色。

7 种大肠菌群可以在这 4 种培养基上正常生长, 并表现出典型特征; 因这 4 种培养基均具有良好的选择性, 3 种革兰阳性细菌在这 4 种培养基上均不能正常生长情况; 鼠伤寒沙门菌为革兰阴性细菌, 均可在这 4 种培养基上正常生长, 但不表现出大肠菌群典型的性状, 可以与大肠菌群相区别。

对 7 种大肠菌群在 CCEA 和其他 3 种培养基上生长的菌落平均数进行 *t* 检验分析, CCEA 与 VRBA 和 Agar II 比较无统计学意义 ($P > 0.05$); CCEA 比 Agar I 长出菌落数略多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2. 模拟样品在 CCEA、VRBA、Agar I 和 Agar II 上检测结果比较: 对 13 种无菌样品中添加的大肠菌群在 CCEA 和其他 3 种培养基上生长的菌落平均数进行 *t* 检验分析, CCEA 比 VRBA 长出菌落数略多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CCEA 与 Agar I 和 Agar II 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

3. 实际样品中大肠菌群和大肠杆菌在 CCEA、VRBA、Agar I 和 Agar II 上检测结果比较: 对 4 种实际样品中的大肠菌群在 CCEA 和其他 3 种培养基上万方数据

表 1 七种大肠菌群在 CCEA、VRBA、Agar I 和 Agar II 培养基上培养结果

测试菌株	菌落平均数 (cfu/ml)			
	CCEA	VRBA	Agar I	Agar II
<i>E. coli</i> ATCC25922	37	77	14	26
<i>E. coli</i> ATCC8739	149	152	139	123
<i>E. coli</i> GIM1.42	159	141	131	144
<i>K. pneumoniae</i> 广临检-57	165	175	156	188
<i>C. freundii</i> ATCC8090	125	131	114	91
<i>E. cloacae</i> CMCC(B)45301	210	145	180	141
<i>E. aerogen</i> CMCC(B)45103	208	214	204	237
CCEA $t(6)_{0.05}$		0.21	4.20*	1.14

注: 查表 $t(6)_{0.05} = 2.45$, 上表 *t* 值大于 2.45, 则表示检验差异有统计学意义; 反之, *t* 值小于 2.45, 则表示检验差异无统计学意义。* 表示 CCEA 稍好

表 2 13 种模拟样品中的大肠菌群在 CCEA、VRBA、Agar I 和 Agar II 培养基上培养结果

组合	菌落平均数 (cfu/ml)			
	CCEA	VRBA	Agar I	Agar II
1	27	26	30	25
2	48	41	45	47
3	97	89	109	94
4	80	86	90	85
5	99	78	90	88
6	80	74	58	76
7	74	62	60	68
8	22	26	19	19
9	35	30	34	18
10	45	44	33	22
11	195	185	197	194
12	110	105	116	107
13	119	91	114	108
CCEA $t(12)_{0.05}$		2.73* ^a	1.02	2.08

注: 查表 $t(12)_{0.05} = 2.18$, * 表示 CCEA 稍好

生长的菌落平均数进行 *t* 检验分析, CCEA 与 VRBA、Agar I 和 Agar II 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 大肠菌群经验证总体符合率分别为 90%、71.88%、86.25% 和 81.25%, 即符合率大小为 CCEA > Agar I > Agar II > VRBA。在检验样品鸡肉时, 在 Agar I 平板中, 除显色的大肠菌群外, 还有 52.7% 是无色菌, 经国标法进行验证, 证明这 52.7% 的无色菌均为大肠菌群, 故用 Agar I 检测实际样品鸡肉时, 显色的大肠菌群有 0.97×10^5 cfu/g, 加上不显色的大肠菌群共有 2.05×10^5 cfu/g, 即用 Agar I 检测实际样品鸡肉时, 会存在严重的漏检(表 3)。

对两种实际样品中的大肠杆菌在 CCEA 和其他两种培养基上生长的菌落平均数进行 *t* 检验分析, CCEA 与 Agar I 和 Agar II 比较差异无统计学意义

表 3 四种实际样品中的大肠菌群在 CCEA、VRBA、Agar I 和 Agar II 培养基上培养结果

实际样品	菌落数 (cfu/g)			
	CCEA	VRBA	Agar I	Agar II
鸡肉	1.99×10^5	1.90×10^5	$0.97(2.05) \times 10^5$	2.17×10^5
猪肉	4.20×10^3	1.60×10^3	3.00×10^3	4.60×10^3
冰棍	0.97×10^4	0.96×10^4	0.98×10^4	0.94×10^4
冰淇淋	1.28×10^5	1.51×10^5	1.14×10^5	1.10×10^5
CCEA $t(3)_{0.05}$		0.32	1.38(1.11)	0.03
总体符合率 (%)	90.00	71.88	86.25	81.25

注:查表 $t(3)_{0.05} = 3.18$,括号内为加上不显色的大肠菌群数量和 t 值

($P > 0.05$);大肠杆菌经验证总体符合率均为 100% (表 4,图 1)。

表 4 两种实际样品中的大肠杆菌在 CCEA、Agar I 和 Agar II 上培养基培养结果

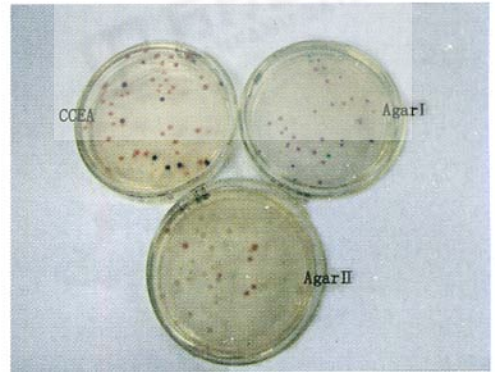
实际样品	菌落数 (cfu/g)		
	CCEA	Agar I	Agar II
鸡肉	1.22×10^5	0.68×10^5	1.29×10^5
猪肉	6.30×10^2	4.70×10^2	6.00×10^2
CCEA $t(1)_{0.05}$		1.84	0.4
总体符合率 (%)	100	100	100

注:冰棍和冰淇淋样品中未发现有大肠杆菌。查表 $t(1)_{0.05} = 12.7$

本实验室试制的显色培养基 CCEA 优于经典方法 VRBA,与国外同类产品 Agar I 和 Agar II 相比,检验效果差异无统计学意义。

讨 论

显色法可直接观察菌落颜色,可以把检测、计数和鉴定一次完成。这些基于酶的实验方法具有简便、快速、准确和检出率高的优点。从上述 4 种实际样品 SN 法与显色法比较检测所得到的菌落数和符合率数据可见,再次验证了显色法的优点。在用显色法检测上述实际样品时,在验证过程中,测试菌株阴沟肠杆菌产气慢,40~48 h 才会产气,实际样品中出现一些可疑菌落在乳糖发酵管生长时超过 24 h 后才产气,但经鉴定为大肠菌群,如用国标 MPN 法时会判定为大肠菌群阴性,因此国标 MPN 法有存在漏检的情况。由于大肠杆菌 O157 不具有大多数大肠杆菌所具有的 β -D-葡萄糖苷酶,因此其在 CCEA、Agar I 和 Agar II 平板上生长时并无大肠杆菌的特



	CCEA	Agar I	Agar II
大肠菌群	橙红色	紫红色	淡蓝色
大肠杆菌	蓝绿色	绿色	橙红色

图 1 实际样品中的大肠菌群和大肠杆菌

性,不能与非大肠杆菌的大肠菌群区分,如要求检测大肠杆菌 O157 时,应选用其他的培养基。

参 考 文 献

- [1] 马绪荣,苏德模主编. 药品微生物学检验手册. 北京:科学出版社. 2000:467-468.
- [2] 卢勉飞,吴清平,刘云林,等. 特异性酶反应在食源性致病病菌检测中的应用. 中国卫生检验杂志,2005,15:354-356.
- [3] 张军民,周贵民. 临床细菌检验快速方法应用进展. 中华医学检验杂志,1998,21:325-327.
- [4] Brenner KP, Rankin CC, Roybal YR, et al. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli in water. Appl Environ Microbiol, 1993, 56: 3534-3544.
- [5] 中华人民共和国国家标准. GB/T 4789. 3-2003 食品卫生微生物学检验大肠菌群测定.
- [6] 中华人民共和国进出口商品检验行业标准. SN 0169-92. 出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法.

(收稿日期:2006-07-14)

(本文编辑:刘群)

显色培养基快速检测大肠菌群和大肠杆菌效果的研究

作者: [卢勉飞](#), [吴清平](#), [蔡芷荷](#), [何天文](#), [LU Mian-fei](#), [WU Qing-ping](#), [CAI Zhi-he](#),
[HE Tian-wen](#)

作者单位: [卢勉飞,蔡芷荷,何天文,LU Mian-fei,CAI Zhi-he,HE Tian-wen\(510070,广州,广东环凯微生物科技有限公司\)](#), [吴清平,WU Qing-ping\(广东省微生物研究所\)](#)

刊名: [中华预防医学杂志](#) **ISTIC|PKU**

英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF PREVENTIVE MEDICINE](#)

年,卷(期): 2007,41(4)

被引用次数: 1次

参考文献(6条)

1. [马绪荣,苏德模](#) [药品微生物学检验手册](#) 2000
2. [卢勉飞,吴清平,刘云林](#) [特异性酶反应在食源性致病菌检测中的应用](#)[期刊论文]-[中国卫生检验杂志](#) 2005(3)
3. [张军民,周贵民](#) [临床细菌检验快速方法应用进展](#)[期刊论文]-[中华医学检验杂志](#) 1998(6)
4. [Brenner KP, Rankin CC, Roybal YR](#) [New medium for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli in water](#) 1993
5. [GB/T 4789.3-2003](#). 中华人民共和国国家标准食品卫生微生物学检验大肠菌群测定 2003
6. [SN 0169-1992](#). 出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法中华人民共和国进出口商品检验行业标准 [期刊论文]- 1992

本文读者也读过(5条)

1. [刘振,于隼,肖强,刘沛,何艳玲,李瑾,LIU Zhen, Yu Huan, XIAO Qiang, LIU Pei, HE Yan-ling, LI Jin](#) [一种有效检测沙门菌的显色培养基的研究](#)[期刊论文]-[中国食品卫生杂志](#)2007, 19(6)
2. [逯玉,马黎宁](#) [牛羊屠宰场鲜肉中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌的检测报告](#)[期刊论文]-[上海畜牧兽医通讯](#) 2008(5)
3. [卢勉飞,蔡芷荷,吴清平,朱海明,何天文,LU Mian-fei,CAI Zhi-he,WU Qing-ping,ZHU Hai-ming,HE Tian-wen](#) [显色培养基快速检测沙门菌效果的研究](#)[期刊论文]-[中国卫生检验杂志](#)2008, 18(12)
4. [张淑红,吴清平,张菊梅,郭伟鹏,ZHANG Shu-Hong,WU Qing-Ping,ZHANG Ju-Mei,GUO Wei-Peng](#) [显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用](#)[期刊论文]-[微生物学通报](#)2006, 33(6)
5. [黄小平,王瑜,Huang Xiao-ping,WANG Yu](#) [应用显色荧光方法检测牛奶或水中大肠菌群和大肠杆菌](#)[期刊论文]-[中国乳品工业](#)2005, 33(7)

引证文献(1条)

1. [朱敏,冉陆,沈圣,邱晋,张立实,裴晓方](#) [多重PCR快速检测致泻大肠埃希菌](#)[期刊论文]-[中华预防医学杂志](#) 2010(4)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhyfyx200704016.aspx