

◇ 专论 ◇

一种选择性富集沙门菌培养基的研究

张萍^{1,2}, 董菁², 牛均婷², 孔佳蕾³

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009; 2. 芜湖市食品药品检验中心, 安徽 芜湖 241006;

3. 安徽省中医药高等专科学校, 安徽 芜湖 241000)

摘要:通过对多种抑制剂和促进剂的筛选, 设计制备了一种新的沙门菌选择性增菌培养基—SEBS 培养基, 采用螺旋平板计数法、平板计数法和全自动微生物分析系统评价了制备的培养基对沙门菌的选择性增菌效果。

关键词:沙门菌; 选择性增菌培养基; 螺旋平板计数法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.045

Study on a selective enrichment broth of *salmonella*

ZHANG Ping^{1,2}, DONG Jing², NIU Yuting², KONG Jiale³

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China;

2. Wuhu Food and Drug Inspection Center, Wuhu, Anhui 241006, China;

3. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract: Based on testing various inhibitors and promoters, a new selective enrichment broth of *Salmonella* was developed. The selectivity and enrichment of SEBS were evaluated by using spiral plate count method, plate count method and full automatic microbial analysis system.

Key words: *Salmonella*; Selective enrichment borth; Spiral plate count method

沙门菌(*Salmonella*)是一种普遍存在于自然界的革兰阴性杆菌, 是威胁公共卫生安全的一种重要的致病菌^[1-2], 食用了被沙门菌污染的食品或者药品, 可能导致中毒, 甚至引起伤寒、副伤寒、肠热症、败血症和胃肠炎等疾病^[3]。因此建立快速、准确的沙门菌的检测方法是预防和控制沙门菌疾病的关键。

目前食品和药品中检验沙门菌的法定标准方法通常为微生物培养法^[4-6], 该方法包括前增菌、选择性增菌、分离培养和生化鉴定等步骤, 样品通常需要 4~7 d 才能得出明确的检验结果。这样的方法虽然准确可靠, 但却费力耗时。为了建立一套快速的检测系统, 研究者们相继提出了多种方法, 如酶联免疫吸附测定(ELISA)^[7-8], 聚合酶链式反应(PCR)^[9-10], 基因芯片法^[11-12]等。一般来说, 很多样品中致病菌的数量远远低于这些快速方法的检测限, 而且经过一系列的加工程序后样品中的致病菌受到损伤, 如果快速检测方法不进行前增菌, 往往很难检测到这些少量和活力微弱的细菌。另外有些样品中的细菌已经死亡, 而分子生物学方法在进行检测时并不会将这些的死亡的细菌区分出来, 往往会产生假阳性的结果^[13]。因此在使用快速检测

方法时, 想要得到准确有效的结果, 对样品进行有效的前增菌步骤仍然是非常必要的^[14]。

通常沙门菌的增菌步骤有两步^[4-6]。第一步使用营养肉汤培养基(NB)、缓冲蛋白胨水培养基(BPW)和胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)等培养基对样品进行增菌, 这些培养基没有选择性, 不仅对沙门菌有很好的增菌效果, 对其他细菌也有很好的增菌效果。为了得到较为“纯净”的沙门菌液, 需要进行二次增菌以抑制除沙门菌外其他细菌的生长。虽然两步增菌提高了样本中沙门菌的检出率但同时也大大增加了检测时间, 增菌过程中非目标菌的大量繁殖, 不仅给后续的分离带来很大的难度, 同时也会抑制目标菌的正常生长。为了提高沙门菌的检测效率, 已经有研究者提出了几种选择性共增菌培养基用于沙门菌和其他致病菌的增菌^[15-16], 虽然在共增菌培养基中沙门菌能得到很好的增殖, 但是共增菌的风险也是显而易见的, 即共增菌株之间的相互抑制, 从而影响检验结果的准确性^[17]。本文以沙门菌为研究对象, 设计制备了一种能够选择性富集沙门菌的培养基, 实验表明该培养基对于提高沙门菌的检测效率有着实际的意义。

1 实验材料

1.1 标准菌株 乙型副伤寒沙门菌 (*Salmonella paratyphi B*) [CMCC(B) 50 094]、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) [CMCC(B) 44 102]、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26 003] 标准菌株冻干粉购自中国食品药品检定研究院,由本中心微生物实验室保藏;乙型副伤寒沙门菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌菌珠(每种细菌的菌珠规格有两个分别为 10^6 CFU/颗/瓶和 10^3 CFU/颗/瓶)购自北京三药科技开发公司,所有菌珠的菌株来源为中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)提供的 0 代菌种,传代代数为第 4 代。

1.2 培养基和试剂 NB、BPW、TSB、胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐(XLD)琼脂培养基、麦康凯(MAC)琼脂培养基、甘露醇氯化钠琼脂培养基(MSA)等培养基均购自北京三药科技开发公司;牛胆盐购自青岛高科园海博生物技术有限公司;柠檬酸钠、煌绿、孔雀绿、氯化镁、次硝酸铋、甘露醇、葡萄糖等购自中国国药集团化学试剂有限公司。

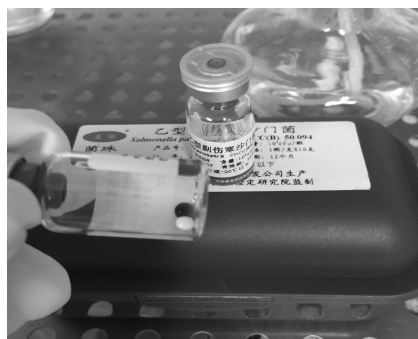
1.3 仪器与设备 生物安全柜 BSC-1300IIA2-AIRTECH(苏州安泰空气技术有限公司);全自动微生物分析系统 Vitek 2 Compact(法国生物梅里埃公司);全自动微生物平皿螺旋加样系统 IUL Jet 2(西班牙 IUL 公司);全自动菌落计数仪 Scan[®] 500(法国 interscience 公司);SHZ-A 水浴恒温振荡器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);立式压力蒸汽灭菌器 YM(上海三申医疗器械有限公司);Binder 恒温培养箱(德国 Binder);漩涡混合仪 VORTEX-GENIE G560E(美国 SCIENTIFIC INDUSTRIES 公司);梅特勒电子天平 AL-204(美国 METTLER TOLEDO 公司)。

2 方法

2.1 工作菌液的制备 在微生物实验研究中,通常需要选用一定浓度的菌悬液作为工作菌液,传统方法的制备过程包括标准菌株冻干粉的复壮、确认、传代、培养、多步稀释及计数等,通常要反复试验多次才能摸索得到合适浓度的菌悬液,实验耗时耗力。本实验采用了半定量的菌珠来制备工作菌液,实验时按照使用产品说明书用无菌生理盐水直接将菌珠溶解并稀释至所需浓度。半定量菌珠的使用可以省去传统菌液制备的多重步骤,大大节约了实验时间和成本。

实验中用标准菌株对商用菌珠的菌种进行了比对和确认,保证了实验的准确性。所有涉及阳性

菌的实验操作均在生物安全柜及阳性菌室(符合《中国药典》2015 版四部要求)中进行。见图 1。

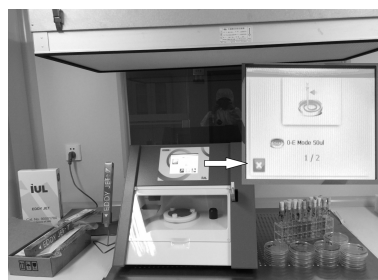


注:白色小球为菌珠、黑色小球为指示剂。

图 1 乙型副伤寒沙门菌的菌珠

2.2 菌悬液浓度的计数方法 本实验中菌悬液浓度的计数采用了两种方法进行,一种为平板菌落计数法,另一种为螺旋平板计数法。

平板菌落计数法是最常用的一种统计菌液中含菌浓度的方法^[6],而螺旋平板计数法是一种快速、简便的菌落计数的新方法^[7-8],具体实验步骤为:使用全自动螺旋平板加样系统(图 2)将增菌后的菌液接种在浇注好培养基的平板上,菌液接种后,菌落即分布在螺旋轨迹上,随半径的增加分布越来越稀。接种结束后,将平板置于规定的条件下进行培养,培养结束后采用全自动菌落计数系统对培养后的平板上的菌落进行计数。



注:加样量为每个平皿 50 μ L。

图 2 全自动螺旋平板加样系统

与传统的平板计数法相比,螺旋接种仪在接种过程中是全自动取样的,接种量精确,可以避免样本间的交叉污染,减少人员操作误差。它以阿基米德式螺旋线进行浓度递减式加样,可以在一块平皿上进行浓度跨度达 1 000 倍的接种,避免了传统方法中繁琐的稀释步骤,大大减少了稀释液和平皿的用量,这种方法在 1 h 内能接种 50 个左右的平板,极大地提高了工作效率。本实验中各增菌过程所得到的菌液浓度的测定均采用了螺旋平板计数法。

2.3 基础培养基的选择 实验取浓度为 10^6 CFU · L⁻¹沙门菌的工作菌悬液各 0.1 mL 分别接种至 10 mL 无菌 NB、TSB 和 BPW 中,在 37 ℃ 培养 8 h 后用螺旋平板计数法测定培养后的菌液浓度(图 3)。该实验重复 3 次,每次重复做两个平行样品。通过比较沙门菌在 3 种的培养基中的生长情况,选择细菌生长较为旺盛的培养基作后续研究。

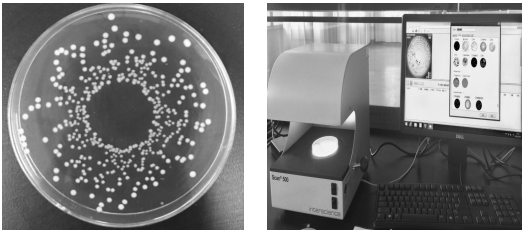


图 3 螺旋平板计数法计数沙门菌悬液

2.4 培养条件的优化 实验取 10^6 CFU · L⁻¹的沙门菌菌悬液 0.1 mL 接种至 10 mL 基础培养基中,按表 1 中的条件分别培养 8 h 后,测定菌悬液浓度,选择出最优的培养条件进行实验。

表 1 沙门菌增菌培养条件

样品号	培养条件
1	37 ℃ + 静置
2	37 ℃ + 振荡 100 r · min ⁻¹
3	37 ℃ + 振荡 200 r · min ⁻¹

2.5 选择性增菌培养基中添加成分的筛选 如果增菌培养基没有选择性,那么样本中高背景的非目标细菌也会大量的繁殖,这样不仅为后续的分离鉴定工作带来很大的干扰,同时也会抑制目标菌的正常生长。因此本实验考虑在培养基中添加适当的成分使得样品中的沙门菌能得到选择性富集。

根据文献报道及沙门菌鉴定培养基的原理^[19-20],本实验选择了以下几种添加成分进行实验:牛胆盐、煌绿、柠檬酸钠、氯化镁、磷酸二氢钾、孔雀绿、亚碲酸钠、次硝酸铋、甘露醇和葡萄糖。上述物质以一定的浓度加入到基础培养基中,再分别接入 10^5 CFU · L⁻¹的沙门菌悬液,同时以不含添加剂的培养基为空白对照,按规定条件培养 8 h 后,考察菌的生长情况。根据实验结果确定选择性增菌培养基的配方。

在实际检测过程中,样本中会含有多种细菌,而其中最为常见的为革兰阳性菌中的金黄色葡萄球菌和革兰阴性菌中的大肠埃希菌,本实验选择这两种菌作为非目标菌的代表考察了新的选择性增

菌培养基选择性增菌的效果。

2.6 沙门菌在沙门菌选择性增菌培养基(SEBS)中的增菌效果 取浓度为 10^7 CFU · L⁻¹的沙门菌菌悬液各 0.1 mL 分别接种至 10 mL SEBS、NB 和 RV 沙门菌增菌液体培养基^[6]中按规定条件培养,不同培养时间的培养物中菌液浓度用螺旋加样平板计数法计数。重复试验 3 次,每次试验平行重复 2 个。

2.7 SEBS 培养基对非目标菌生长的验证 将 10^8 CFU · L⁻¹的非目标菌菌悬液各 0.1 mL 接种至 10 mL SEBS 及 NB 中按规定条件培养,取培养物用螺旋加样平板计数法计数。此外将 10^6 CFU · L⁻¹的目标菌和 10^7 CFU · L⁻¹非目标菌各 0.1 mL 同时接种至 10 mL SEBS 培养基中,按规定进行培养,然后将培养物接入到各菌株的显色培养基中进行平板计数,判断沙门菌生长受影响情况。

2.8 人工污染样品的检测 人工污染食品样本的检测方法:取 1 mL 浓度为 10^5 CFU · L⁻¹沙门菌液加入到 25 mL 牛奶(根据 GB4789.4-2010 方法检测不含沙门菌)中,置于灭菌袋中,混匀,室温处理 15 min,加入 225 mL SEBS 培养基,混匀,按规定条件培养,同法制得另外 4 个不同批次的人工污染牛奶的样品,同时以未接种菌液的牛奶样品做阴性对照。

人工污染药品样本的检测方法:取 10 g 胃苏颗粒(根据中国药典 2015 版四部 1106 方法检测不含沙门菌),置于 100 mL SEBS 中,混匀,取 1 mL 浓度为 10^5 CFU · L⁻¹沙门菌液加入到上述样品溶液中,混匀,按规定条件培养,同法制得另外 4 个不同批次的人工污染胃苏颗粒的样品,同时以未接种菌液的样品做阴性对照。

培养结束后,从上述样品中取少量培养物划线接种于沙门菌显色培养基 XLD 平板上,观察培养结果,如有典型菌落,则用全自动微生物分析系统进行鉴定。

3 结果

3.1 基础培养基的选择 计数结果为 1.3×10^6 CFU · L⁻¹沙门菌的工作菌悬液各 0.1 mL 分别接种至 10 mL 无菌的 NB、TSB 和 BPW 中,37 ℃ 培养 8 h 后取出,用螺旋平板计数法检测增菌后的菌液浓度,结果如图 4 所示。沙门菌在 3 种培养基中均有生长,培养结束时菌液浓度都有大幅提高,在 TSB 和 NB 肉汤中的增殖要大于 BPW,考虑到增殖效果以及简单经济性,本实验选择了 NB 肉汤作为基础培养基,其成分为:蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 3.0 g、氯化钠 5.0 g 和葡萄糖 1.0 g。

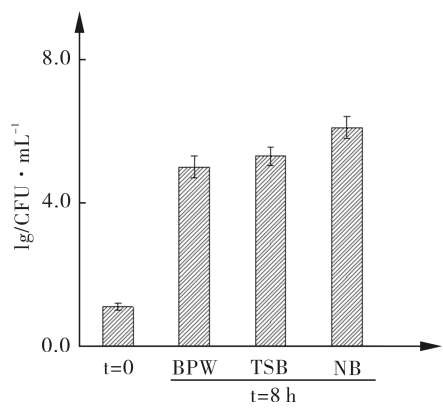


图4 沙门菌在3种基础培养基中的生长情况

3.2 培养条件的优化 沙门菌在不同培养条件下的生长情况如图5所示。在静置培养的条件下,沙门菌的生长滞后,而在振摇方式下沙门菌在4 h后就进入了对数生长期,在8 h后浓度即可到达 10^9 CFU · L⁻¹。这可能是因为静置时菌液会逐渐沉积在培养基的底部堆叠在一起从而致使部分细菌得不到充足的养分而导致菌株生长比较缓慢。而振摇的方式能使细菌充分的分散于培养基中,保证每个菌体生长都能充分均匀的利用到培养基的养分,另外振荡的方式也可以使细菌在生长代谢过程中产生的热量能充分的散发出去,使培养基始保持正常的温度。根据实验结果,本实验选择细菌的培养方式为在 37 ℃ 下振摇 100 r · min⁻¹。

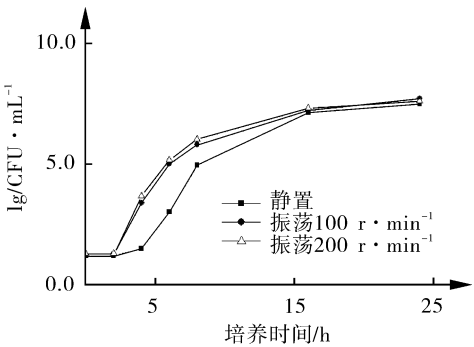


图5 沙门菌在不同培养条件下的生长情况

3.3 选择性增菌成分的确定 参照《中国药典》2015 版四部《非无菌产品微生物限度检查》中的微生物回收方法^[6],用微生物回收率来评价添加成分对沙门菌和非目标菌生长的影响,结果如表2。从表2可知,牛胆盐和柠檬酸钠对金黄色葡萄球菌有很强的抑制作用,在一定浓度范围内,金黄色葡萄球菌几乎不能生长,而对沙门菌和大肠杆菌的生长几乎没有影响。高浓度的氯化镁对金黄色葡萄球菌的生长有明显的抑制作用,而对于沙门菌和大肠埃希菌的生长几乎没有影响。次硝酸铋对于金黄色葡萄球菌的抑制也很强烈,同时能明显的抑制沙

门菌的生长,高浓度的情况下大肠埃希菌的生长也被明显抑制。较高剂量的甘露醇对于金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的生长有明显的抑制作用,而沙门菌在此条件下生长良好。煌绿在低剂量下对于金黄色葡萄球菌就有很强的抑制作用。孔雀绿对3种细菌的抑制作用都非常强烈。亚硝酸钠对大肠埃希菌的抑制强烈,较低剂量就会完全抑制它的生长,对金黄色葡萄球菌也有明显的抑制作用,而沙门菌的生长状况在可接受的范围之内。

向培养基中添加目标菌可利用的碳源和营养物质,有利于目标菌的复活和生长。葡萄糖是最常见的一种促进细菌生长的成分,甘露醇可以作为碳源为细菌的生长提供营养物质,从表中可以看出加入一定量的葡萄糖和甘露醇都可以促进沙门菌的生长。

表2 各添加成分对3种细菌生长影响

添加剂	浓度/g · L ⁻¹	金黄色葡萄球菌/%	大肠埃希菌/%	沙门菌 ^a /%
牛胆盐	1.5	—	98.880	99.870
	2.0	—	101.210	100.100
	3.0	—	105.410	103.170
柠檬酸钠	3.0	—	70.110	105.880
	5.0	—	64.850	83.530
	8.0	—	66.210	67.640
氯化镁	29.0	0.560	91.250	96.420
	58.0	0.210	90.750	92.420
次硝酸铋	1.0	0.026	45.170	6.510
	2.0	0.002	20.660	0.570
	3.0	0.001	9.140	0.071
甘露醇	1.0	81.670	55.110	94.520
	2.0	76.670	47.590	111.940
	3.0	45.830	36.250	100.970
煌绿	0.010	1.450	87.560	98.420
	0.015	1.290	82.250	97.390
	0.025	0.770	80.500	104.830
孔雀绿	0.030	—	—	—
	0.040	—	—	—
	0.060	—	—	—
	—	—	—	—
亚硝酸钠	1×10^{-4}	21.700	—	84.110
	2×10^{-4}	15.310	—	70.510
	3×10^{-4}	6.330	—	51.250
葡萄糖	1.0	40.560	90.210	106.710
	2.0	60.110	105.200	110.560
	3.5	80.440	103.110	120.380

注:^a 微生物的回收率;评价各添加成分对3种细菌生长影响,公式为:(细菌在含添加剂NB中的菌液浓度/细菌在空白NB中的菌液浓度) × 100%,“—”表示未检出。

综合考虑以上的添加物质对沙门菌生长的影响,以能够使沙门菌生长良好同时对其他非目标菌的生长有明显的抑制作用为标准,实验选择了牛胆盐、柠檬酸钠和亚硝酸钠为抑制剂,甘露醇和葡萄糖为促进剂。

3.4 SEBS培养基的制备 根据上述实验我们配制了一种新的沙门菌选择性增菌培养基SEBS:称取NB肉汤19.0 g、牛胆盐1.5 g、柠檬酸钠5.0 g、葡萄糖3.5 g和甘露醇2.0 g,用适量的实验用水溶解

后,定容至 1 000 mL 后在 121 ℃ 灭菌 15 min,冷却后矫正 pH 值为(7.0 ± 0.2),临用前加入用无菌水配制的 0.1 g · L⁻¹亚碲酸钠溶液 1 mL。

3.5 SEBS 的增菌效果

3.5.1 SEBS 培养基对沙门菌的增菌效果 沙门菌在 SEBS、营养肉汤和 RV 培养基中的生长情况如图 6 所示。沙门菌在 SEBS 肉汤中生长时 8 h 就能达到近 10¹⁰ CFU · L⁻¹ 的浓度,与在营养肉汤中的生长情况类似,说明在 SEBS 肉汤中的沙门菌的扩增效率高。而在 RV 肉汤中,尽管沙门菌进入生长期和生长速度与在上述的两种培养基中相当,但是 16 h 后的菌浓度要低于 SEBS 和 NB 肉汤。

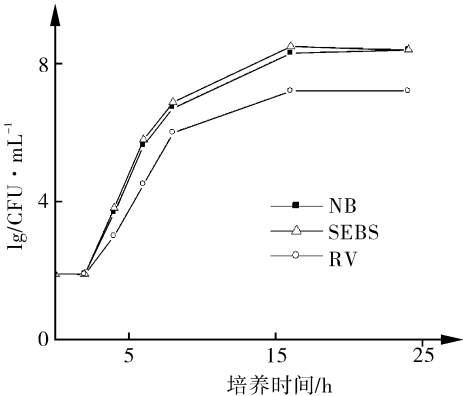


图 6 沙门菌在 SEBS 培养基中的增菌效果

3.5.2 非目标菌在 SEBS 中的生长情况 由表 3 可知,金黄色葡萄球菌在 SEBS 培养基中完全不能生长,大肠埃希菌在 SEBS 培养基中的生长也受到很大的抑制。而沙门菌即使在有非目标菌同时存在的情况下,它在 SEBS 中的生长仍然不受影响,8 h 后浓度可达到近 10⁹ CFU · L⁻¹。证明 SEBS 对于沙门菌的生长具有很好的选择性增菌效果。

表 3 非目标菌在 SEBS 肉汤中的生长情况

菌株	菌液浓度(lg 值)	菌液浓度(lg 值,t = 8 h, $\bar{x} \pm s$)	
	(t = 0 h)	NB 肉汤	SEBS 培养基
金黄色葡萄球菌	2.15	7.81 ± 0.046	—
大肠埃希菌	2.39	8.47 ± 0.035	3.10 ± 0.077

注:“—”表示未检出。

3.5.3 人工污染样品的检测 “2.8”项下的 10 批人工污染的食品和药品的样本,在 37 ℃ 100 r · min⁻¹振摇培养 8 h 后,取培养物划线接种于 XLD 平板上,均有特征菌落生长,挑取典型菌落用全自动微生物分析系统检测,显示为沙门菌阳性,阴性对照均为阴性。

4 讨论

每年由沙门菌造成的食物中毒事件层出不穷,建

立快速、准确的沙门菌的检测方法可以有效的预防和控制沙门菌对公众卫生安全的不良影响。现有标准的两步增菌方法不仅过程繁琐而且大大拉长了整个检验时间。一些快速检测方法通常没有预增菌的过程,再加上方法本身的灵敏度的限制,常常会造成一些假阴性的结果。因此研究一种培养基能有效对沙门菌增菌又能选择性的抑制非目标菌的生长非常有意义。

本文建立的 SEBS 是一种复合增菌培养基,它以 NB 为培养基的基础,在满足沙门菌生长需求的情况下,添加了牛胆盐 1.5 g · L⁻¹、柠檬酸钠 5.0 g · L⁻¹、葡萄糖 3.5 g · L⁻¹、甘露醇 2.0 g · L⁻¹和 0.1 mg · L⁻¹亚碲酸钠,其中牛胆盐、柠檬酸钠可以抑制革兰阳性菌的生长,而亚碲酸钠对肠杆菌的生长有很好的抑制作用,同时加入的葡萄糖和甘露醇作为生长促进因子,保持细胞的良好生长。这样的组成不仅可以较好的抑制以金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌为代表的背景微生物,而且有效的保证了 SEBS 培养基对沙门菌的选择性增菌效果。

SEBS 培养基的应用可以将常规的对沙门菌的两步增菌合并在一个步骤中实现,对于含菌量在 10³ ~ 10⁵ CFU · L⁻¹ 的沙门菌的人工污染样品,经 8 h 增菌后就能鉴定样品是否染菌,这样不仅可以大大的缩短沙门菌的检验时间也提高了检验效率和准确性。

本实验中引入了半定量菌珠、并将全自动螺旋平板加样系统、全自动计数方法及全自动微生物鉴定方法等现代化的微生物实验方法进行联合运用,大大提高了实验的效率和准确度,为今后此类的科学研究提供了一个很好的方法学参考。

参考文献

[1] 庞心怡,满朝新,赵玥明,等. 环介导等温扩增技术快速检测肉中沙门氏菌[J]. 中国食物与营养,2015,21(8):12-15.

[2] 罗荣,任秀,崔生辉. 食品中沙门氏菌快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(4):1468-1472.

[3] European Food Safety Authority (EFSA). The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 [R]. EFSA,2013.

[4] ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of Salmonella spp[S]. Iso International Standard,2002.

[5] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验 GB4789.4-2010 [S],2010.

[6] 国家药典委员会. 中国药典(四部) [S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.

[7] MACIOROWSKI KG, HERRERA P, JONES FT, et al. Cultural and immunological detection for Salmonella spp in animal feeds-A review [J]. Veterinary Research Communications,2006,30(2):127-137.