· 检验技术 ·

不同类型蛋白胨支持大肠菌群生长效果评价*

赵贵明[1], 赵勇胜[1], 葛秋慧[2], 杨海荣[1], 陈颖[1]

摘　要: 目的　快速、准确评价不同类型蛋白胨支持大肠菌群的生长效果, 为优化大肠菌群快速生长培养基选择适宜原材料。**方法**　选择不同类型的蛋白胨和大肠菌群代表性菌株, 应用全自动生长曲线测定仪进行浊度测量, 用原材料再配制培养基, 通过测定培养基支持大肠菌群的生长能力验证原材料筛选方法的可靠性。**结果**　多价蛋白胨支持大肠菌群生长能力较好; 大肠菌群快速生长的蛋白胨评估与配制培养基后的实验结果一致, 即培养 24 h 后最大 A 值均为 1.18。**结论**　不同类型蛋白胨支持大肠菌群的生长能力存在差异, 生长曲线测定仪可作为培养基原材料选择的有力工具。

关键词: 大肠菌群; 浊度测量; 蛋白胨; 生长评价

中图分类号: Q-331　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)05-0841-04　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-05-41

Evaluation on effect of different peptone media on growth of cultured califorms

ZHAO Gui-ming*, ZHAO Yong-sheng, GE Qiu-hui, et al (* *Chinese Academy of Inspection and Quarantine*, *Beijing* 100167, China)

Abstract: Objective　To evaluate the effect of different peptone media on the growth of cultured coliforms for selecting appropriate materials used in medium for rapid culturing of coliforms. **Methods**　Growth curves of representative coliform strains cultured with different types of peptone medium were obtained through analyzing logarithmic growth phase with Bioscreen. **Results**　Polypeptone and bacto tryptose showed better effect on the growth of all 4 tested strains among 8 tested peptones, with the same maximum absorbance value of 1.18 after 24 hour's culture in both cultures with different peptones and prepared media with those peptones. **Conclusion**　The effect of various peptones on the growth of coliforms is different and growth curve analysis could be used in the selection of medium material for coliforms culture.

Key words: coliform; turbidity measuring; peptone; growth evaluation

中国公共卫生 CPH

大肠菌群是反映食品卫生状况的重要指示菌, 同时也包括了致病性较强的大肠杆菌如 O157、O26、O45、O103、O111、O121 和 O145 等[1], 由于大肠菌群覆盖的属、种较多[2], 其生长需求也必然存在差异, 因此, 使该类菌均得到快速、均衡生长, 才能保证检测结果的准确性[3]。生长曲线测定方法是较为理想的方法[4], 本研究用全自动生长曲线测定仪测定了 8 种不同类型的蛋白胨对 4 种大肠菌群代表性菌株的生长曲线, 并通过月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(lauryl sulfate tryptone broth, LST)观察了产气情况, 评价不同类型蛋白胨支持大肠菌群生长效果, 验证全自动生长曲线方法筛选原材料的可靠性。

1　材料与方法

1.1　*实验菌株*　大肠埃希菌 IQCC10126, 阴沟肠杆菌 IQCC10461, 弗氏柠檬酸杆菌 IQCC10203, 肺炎克雷伯菌 IQCC10302(中国检验检疫微生物菌种保藏管理中心)。

1.2　*主要试剂与仪器*　明胶蛋白胨(gelysate peptone 货号: 211870); 细菌胨(bacto pepton 货号: 211677); 多价胨(polypeptone 货号: 211910); 细菌际胨(bacto proteose peptone 货号: 211684); 胰际胨(bacto tryptose 货号: 211713); 胰酪胨(trypticase peptone 货号: 211921); 胰酪胨(bacto tryptone 货号: 21705), M9 minimal salts, 胰酪胨大豆肉汤(tryptic soytone broth, TSB)、胰酪胨大豆琼脂(tryptic soytone agar, TSA)(以上均为美国 BD 公司产品)。大豆胨(批号: 20121228, 北京奥博星生物技术有限公司)。全自动生长曲线分析仪(芬兰 Bioscreen 公司)。

1.3　*方法*

1.3.1　菌株制备　将实验菌株接种于 TSB, 36 ℃培养 18 h 后, 再接种在 TSA 平板, 36 ℃培养 18 h 后, 挑取菌落用试验培养基, 制成均匀混悬液, 配制成 0.5 麦氏浊度备用。

1.3.2　测试培养基配制　测试原材料的培养基[5]:

* **基金项目**: 国家"十二五"科技支撑计划课题(2012BAD29B02); 国家质检总局科技计划项目(2012IK197)
作者单位: 1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2. 北京奥博星生物技术有限责任公司
作者简介: 赵贵明(1963-), 男, 山西人, 研究员, 本科, 研究方向: 食品微生物检测技术及检测方法标准化。
通讯作者: 陈颖, E-mail: chenyingcaiq@163.com
数字出版日期: 2016-5-19 16:26
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160519.1626.058.html

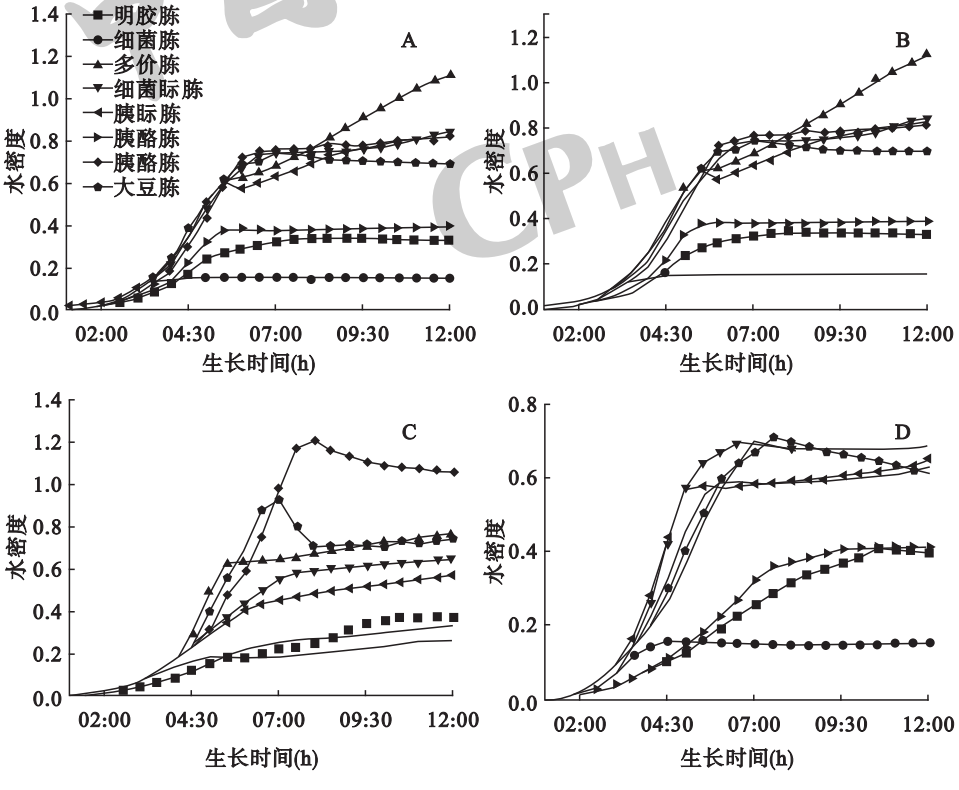
试验蛋白胨 1%；M9 培养基（Na_2HPO_4，33.9 g；KH_2PO_4，15.0 g；NaCl，2.5 g；NH4Cl，5.0 g）1.13%；葡萄糖 0.4%，按上述比例称量后，溶于 1 L 去离子水中，121 ℃高压 15 min。实际应用效果测试培养基：作为原材料制成大肠菌群测定培养基 LST，按照 GB/T 4789.3—2010 附录 A.1[5] 配制。

1.3.3　测试方法　将 0.5 麦氏浊度菌悬液与测试培养基以 1∶200 进行稀释（A 值 <0.02），培养温度为 36 ℃，测定间隔时间为 10 min，测定波长600 nm，连续测定 24 h。产气实验：将 8 种不同类型蛋白胨按照文献[5] 分别配制成 LST 肉汤培养基，成分：胰蛋白胨或胰酪胨 20.0 g，氯化钠 5.0 g，乳糖 5.0 g，K2$HPO_4$2.75 g，$KH_2PO_4$2.75 g，月桂基硫酸钠 0.1 g，蒸馏水 1 000 mL，pH 6.8 ± 0.2。

1.4　统计分析　4 株代表性实验菌株在原材料测试培养基（M9 培养基）、实际应用效果测试培养基（LST）A≥0.3 所需要的生长时间以及培养 24 h 的最终 A 值。应用 SPSS 19.0 软件，采用多组样本间差异显著性分析（Duncan test）方法对 8 种蛋白胨支持大肠菌群代表性实验菌株生长的 A 值达到 0.3 所需时间及最大 A 值进行单因素分析，$P < 0.05$ 有统计学意义。

2　结　果

2.1　实验菌株在不同蛋白胨配制 M9 培养基中的生长曲线测定（图 1）　大肠杆菌和阴沟肠杆菌生长情况非常相似；柠檬酸杆菌和克雷伯氏菌之间以及与大肠杆菌、阴沟肠杆菌相比生长情况不同。8 种蛋白胨支持大肠菌群的生长能力大致可划分为 2 组，多价胨、细菌际胨、胰际胨（bacto tryptose）、胰酪胨（bacto tryptong）和大豆胨培养 24 h 后的 A > 0.6，支持大肠菌群生长较好能力，而明胶蛋白胨、细菌胨；胰酪胨（trypticase peptone）培养 24 h 后的 A < 0.4，支持大肠菌群的生长能力相对较差。

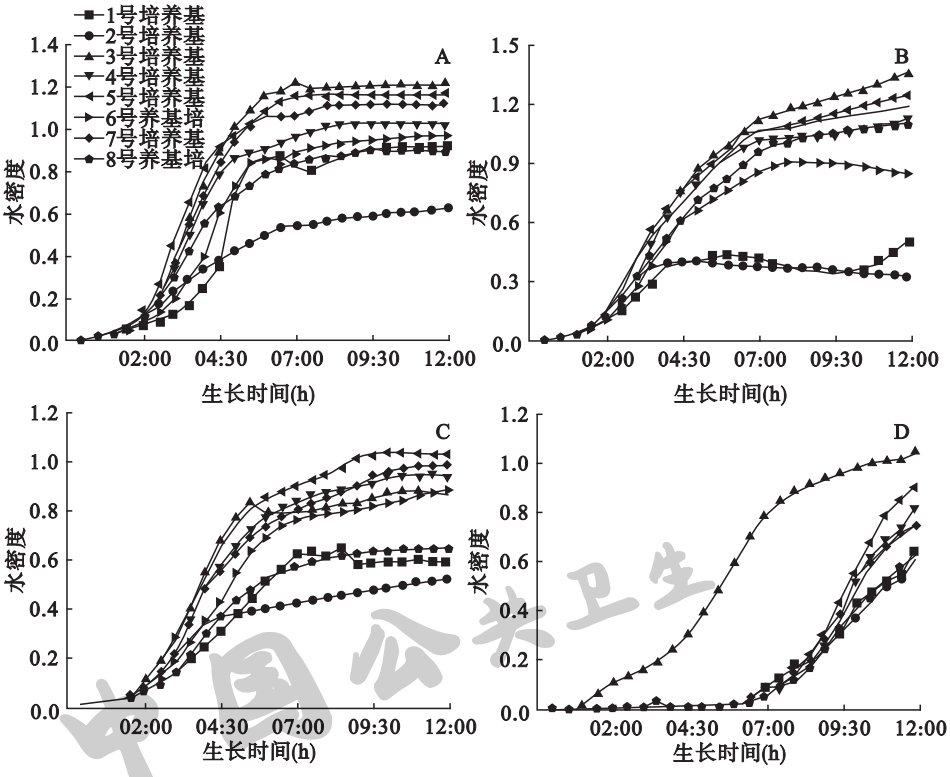


注：A 为大肠埃希菌 IQCC10126，B 为阴沟肠杆菌 IQCC10461，C 为弗氏柠檬酸杆菌 IQCC10203，D 为肺炎克雷伯菌 IQCC10302。

图 1　大肠菌群 4 个代表性菌株在 M9 培养基中 36 ℃培养 12 h 的生长曲线

2.2　实验菌株在不同蛋白胨配制的 LST 培养基中的生长曲线测定（图 2）　与 M9 培养基中的生长情况相比，大肠菌群 4 种代表性菌株在 LST 培养基中生长情况总体好于 M9 培养基，表现在培养 24h 后的 A 均超过 0.4，但总体趋势与 M9 培养基中生长情况一致，即多价胨、细菌际胨、胰际胨（bacto tryptose）、胰酪胨（bacto tryptong）和大豆胨培养好于明胶蛋白胨、细菌胨；胰酪胨（trypticase peptone）。

2.3　蛋白胨支持大肠菌群菌株生长单因素分析（表 1、2、3）　大肠杆菌、阴沟肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌和肺炎克雷伯氏菌在 8 种不同类型蛋白胨配制的 M9 培养基、LST 培养基中测定 A 值达到 0.3 时的生长时间和生长 24 h 时的测定 A 值。应用 SPSS 19.0 软件分析，对大肠菌群在 M9 培养基和 LST 培养基中的生长情况进行合并分析，采用多组样本间差异性分析（Duncan test）方法，测定A值达到0.3



注：E 为大肠埃希菌 IQCC10126，F 为阴沟肠杆菌 IQCC10461，G 为弗氏柠檬酸杆菌 IQCC10203，H 为肺炎克雷伯菌 IQCC10302。

图 2　大肠菌群 4 个代表性菌株在 LST 培养基中 36 ℃培养 12 h 的生长曲线

表 1　大肠菌群代表性菌株在 M9 培养基中生长曲线测定 A 值

M9 培养基		大肠杆菌	阴沟肠杆菌	弗氏柠檬酸杆菌	肺炎克雷伯氏菌
明胶胨	生长时间[a]	490	380	520	470
	最大 A	0.51	0.41	0.47	0.42
细菌胨	生长时间	830	–	–	–
	最大 A	0.46	0.21	0.27	0.21
多价胨	生长时间	250	260	280	270
	最大 A	1.31	1.36	1.01	1.02
细菌际胨	生长时间	260	260	300	250
	最大 A	1.05	1.06	0.78	0.82
胰际胨	生长时间	240	260	310	250
	最大 A	0.91	0.97	0.74	0.84
胰酪胨	生长时间	350	300	590	410
(trypticase peptone)	最大 A	0.55	0.54	0.54	0.53
胰酪胨	生长时间	310	270	300	280
(bacto tryptone)	最大 A	0.84	1.00	1.12	0.77
大豆胨	生长时间	280	260	290	280
	最大 A	0.93	0.77	0.93	0.72

注：a 为 A≥0.3 所需生长时间，单位 min，– 为 24 h 后的生长 A 值仍 <0.3。

时的生长时间无明显差异，然而在生长 24 h 时的测定 A 值方面存在差异明显，说明蛋白胨的种类对于肠菌群的生长有很大影响，可优先选择 3 号蛋白胨即多价蛋白胨。

表 2　大肠菌群代表性菌株在 LST 培养基中生长曲线测定 A 值

LST 培养基		大肠杆菌	阴沟肠杆菌	弗氏柠檬酸杆菌	肺炎克雷伯氏菌
明胶胨	生长时间[a]	250	210	270	560
	最大 A	0.88	0.79	0.74	0.86
细菌胨	生长时间	220	180	220	550
	最大 A	0.72	0.37	0.65	0.84
多价胨	生长时间	170	160	190	250
	最大 A	1.28	1.53	0.98	0.95
细菌际胨	生长时间	180	180	200	550
	最大 A	1.08	1.28	0.90	1.01
胰际胨	生长时间	160	170	190	530
	最大 A	1.31	1.44	1.03	1.12
胰酪胨	生长时间	210	190	220	620
(trypticase peptone)	最大 A	1.03	0.98	0.94	0.92
胰酪胨	生长时间	170	160	210	610
(bacto tryptone)	最大 A	1.18	1.33	1.05	0.92
大豆胨	生长时间	180	180	240	570
	最大 A	0.82	1.24	0.68	1.06

2.4　产气实验　观察产气量是测定大肠菌群的特征性指标，按照文献[5]用不同蛋白胨配制的 LST 培养基中进行了产气观察，结果产气量大小趋势与生

中国公共卫生 CPH

长曲线状况基本一致,即多价胨、细菌际胨、胰际胨(bacto tryptose)、胰酪胨(bacto tryptone)和大豆胨培养好于明胶蛋白胨、细菌胨;胰酪胨(trypticase peptone)。

表 3　不同类型蛋白胨支持大肠菌群生长能力比较($\bar{x} \pm s$)

蛋白胨	*A* 值	蛋白胨	*A* 值
明胶胨	0.64 ± 0.20	胰际胨	1.05 ± 0.24
细菌胨	0.47 ± 0.24	胰酪胨(trypticase peptone)	0.75 ± 0.23
多价胨	1.18 ± 0.22	胰酪胨(bacto tryptone)	1.03 ± 0.18
细菌际胨	1.00 ± 0.16	大豆胨	0.89 ± 0.19

3　讨　论

蛋白胨是培养基制作最重要的基础材料,实验结果发现,不同来源原料和相同原料采用不同制作工艺生产出的产品对不同大肠菌群的生长支持能力存在差异,国标《食品微生物学检验粪大肠菌群计数》(GB 4789.39 – 2013)[6] 指定 LST 培养基使用的蛋白胨为胰蛋白胨或胰酪胨,但是胰蛋白胨或胰酪胨在促大肠菌群生长效果并不完全相同,胰酪胨优于胰蛋白胨,然而同样都是胰酪胨,bacto tryptone 要好于 trypticase peptone,这提醒技术人员在日常工作中,要了解蛋白胨的特性和适用范围,合理选择原材料。大肠菌群 4 种代表性菌株在 8 种不同类型蛋白胨配制的 LST 培养基和 M9 培养基中生长情况及产气量大小趋势一致,但在 LST 培养基中生长总体情况好于 M9 培养基,这可能与 LST 中营养成分浓度大幅度提高有关。本次实验的测试培养基使用的 M9 培养基,由磷酸盐、NaCl、葡萄糖和蛋白胨组成,磷酸盐为缓冲系统,氯化钠维持渗透压,微量葡萄糖为细菌生长提供碳源,满足了细菌生长的基础条件,而且与 LST 培养基相比,通过生长曲线测定,M9 培养基更能灵敏反应蛋白胨支持目标菌的生长能力,因此,用 M9 培养基筛选原材料较为适宜。微生物生长曲线由实验数据绘制[7],可以采用测定 A 值的浊度法或直接计数法[8],但是要精确得到对数生长期的数据则需要根据微生物曲线方程,然而要得出曲线方程无论采取哪种方法都比较繁琐[9-10],本研究按照测定 A 值递增进行区段分析,方法简单,但是非常实用,能够达到分析的目的。

微生物检验新方法的研究或制定新标准,必然离不开培养基,尤其是开发新配方时必须仔细选择适宜的蛋白胨,我国培养基原材料生产厂家由于缺乏准确的质控方法[11-12],不仅不能保证不同批次产品质量一致,还无法对产品分类,另外,在疯牛病出现之后,国外不断开发以植物蛋白质为来源的新型蛋白胨替代动物源性产品,而我国原材料及培养基生产厂家缺乏准确、高通量的检测手段,使我们在原材料的开发方面与国外差距加大。相信自动化生物曲线测定方法将在培养基原材料选择、质量控制及新产品开发中发挥作用。

参考文献

[1] Kalchayanand N, Arthur TM, Bosilevac JM, et al. Chromogenic agar medium for detection and isolation of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from fresh beef and cattle feces[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(2): 192 – 199.

[2] Fiello M, Mikell AT, Moore MT, et al. Variability in the characterization of total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli* in recreational water supplies of North Mississippi, USA[J]. Environmental Contamination and Toxicology, 2014, 93(2): 133 – 137.

[3] Maheux AF, Boudreau DK, Bisson MA, et al. Molecular method for detection of total coliforms in drinking water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(14): 4074 – 4084.

[4] Zlosnik JE, Gunaratnam LC, Speert DP. Serum susceptibility in clinical isolates of Burkholderia cepacia complex bacteria: development of a growth-based assay for high throughput determination[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2(67): 1 – 10.

[5] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.3 – 2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S]. 北京,标准出版社,2010 年.

[6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.39 – 2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 粪大肠菌群计数[S]. 北京,标准出版社,2014 年.

[7] 郑冰婷,董泓宏,张树辉,等. 嗜热链球菌生长曲线的绘制[J]. 大家健康,2013,7(8):197 – 197.

[8] 李晶晶,刘瑛,成家杨,等. 深圳海域 6 株破囊壶菌的生长特性及油脂成分分析[J]. 微生物学通报,2015,42(1):17 – 23.

[9] 杨改强,霍丽娟,丁庆伟,等. 时域有限差分法模拟微生物生长曲线[J]. 太原科技大学学报,2009,30(4):355 – 358.

[10] 张振男,郁二蒙,谢骏,等. 不同脆化阶段草鱼肠道菌群动态变化、血清酶指标及生长性能[J]. 农业生物技术学报,2015,23(2):151 – 160.

[11] 李卫华,赵贵明,张建军,等. 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[S]. 北京,标准出版社,2005。

[12] 中华人民共和国卫生部. WS/T 232 – 2002 商业性微生物培养基质量检验规程[S]. 北京,标准出版社,2002。

收稿日期: 2015-01-12　　(吴少慧编辑　刘铁校对)

中国公共卫生 CPH