

椰毒假单胞菌酵米面亚种 选择性培养基研究

四川省卫生防疫站(成都 610031)

何树森 吴乐 骆世银 欧章玉 蒋庚珍¹

摘要 根据椰毒假单胞菌酵米面亚种生理生化特性,在抑菌实验基础上,研制出以无机盐和无机氮源为基础,以有机碳源为限制因子的双抗生素合成培养基(PCFA)。该培养基抑杂菌性强,选择性高,最低检出菌量 6.3~89 个/ml,检出灵敏度较传统培养基 PDA 提高了 1000 倍以上。适于从杂菌含量高的自然环境样品中检出椰毒假单胞菌酵米面亚种,是该菌中毒检验和进行自然分布调查与污染源追踪的一种较为理想的分离培养基。

关键词 椰毒假单胞菌酵米面亚种 酵米面黄杆菌 培养基

椰毒假单胞菌酵米面亚种(*P. coodvenenas* subsp *fariniferenemtans* Men Q Wong et al 1987)¹俗称酵米面黄杆菌,是我国特有的对人民健康危害较大的食物中毒病原菌(2~4)。国内广泛采用 PDA 培养基进行分离检测,由于缺乏选择性,不能从杂菌量多的样品中有效检出。因此,研制出选择性强、鉴别力高的分离培养基对于开展食物中毒确诊和预防研究工作具有重要意义。

1 实验材料和方法

1.1 椰酵菌选择性培养基(PCFA)配方研究 (1)采用 Mueller Hinton 培养基测定硫酸多粘菌素 B 等 7 种抗生素对椰酵菌和杂菌代表菌的最低抑菌浓度(MIC),筛选出对椰酵菌不敏感而对杂菌敏感的二种抗生素作为 PCFA 抑菌剂。(2)配制 pH6.5 磷酸盐缓冲剂组成的无机盐液,进行椰酵菌对无机氮源和有机碳源的利用和生长实验,确定 PCFA 营养系统和指示剂。

1.2 PCFA 性能检测 (1)用涂布法将椰酵菌接种 PCFA 和 PDA 平板,经培养,观察菌落特征,测定大小和计数,测定该菌在 PCFA 上的生长率。(2)用常规方法将杂菌接种 PCFA 和 PDA 平板,比较两种培养基的抑菌谱。(3)将椰酵菌定量污染自然环境土壤样品(不含该菌),经稀释,接种 PCFA 和 PDA 平板,37℃ 培养 48~72h,计数可疑菌落,挑取高稀释度菌落纯化并进行生化和血清学鉴定,检测两种培养基的最低检出菌量。

1.3 PCFA 应用 将食物中毒和自然环境样品按文献²检验程序,用 PCFA 和 PDA 平板分离,经鉴定,比较两种培养基检出椰酵菌的阳性数。

2 结果与分析

2.1 PCFA 配方的确定 抑菌实验结果表明:硫酸多粘菌素 B 和林肯霉素对杂菌代表株大肠杆菌(G⁻)和金黄色葡萄球菌(G⁺)敏感,其 MIC 均为 1.56u;它们对椰

酵菌 Co14 生长无抑制性, MIC>400u。因此,选择上述两种抗生素作为 PCFA 抑菌剂。经生长实验得知:椰酵菌能在含一种有机碳源和铵盐及无机盐组成的合成培养基中生长良好。根据该菌生化特点,选择卫茅醇作为 PCFA 的主要碳源,所有椰酵菌菌株均能生长,而多数肠杆菌科细菌和其它常见杂菌不能代谢该醇,从营养角度限制杂菌生长。添加微量葡萄糖和胱氨酸,利于椰酵菌初期生长的代谢酶合成,同时又不影响卫茅醇作为碳源限制因子的作用。

经上述研究,确定 PCFA 配方如下:

KH₂PCl₄ 1.14g Na₂HPO₄ 0.7g NaCl 4g CaCl₂ 0.05g MgSO₄·7H₂O 0.2g FeSO₄·7H₂O 0.0005g NHCl 1g 卫茅醇 15g 葡萄糖 0.05g 胱氨酸 0.01g 硫酸多粘菌素 B 50000u 林肯霉素 30000u TTC 0.5g 琼脂粉 12g DH₂O1000mlpH6.5 8 磅 15min

2.2 椰酵菌在 PCFA 和 PDA 上的菌落大小 通过对 13 株椰酵菌的 65 个菌落直径测定,其平均大小在两种培养基上生长速度和形成的菌落大小是相似的,符合微生物培养与分离的要求。在 PCFA 培养基上 48h 和 72h 菌落大小分别为 0.91mm、1.76mm;在 PDA 培养基上 48h、72h 菌落大小分别为 1.02mm 和 1.70mm。

2.3 椰酵菌在 PCFA 平板上的培养特征 菌落圆形,边缘整齐,直径约 1~1.5mm,微凸、光滑、湿润、易于挑起,菌落红色或粉红色,平板无色透明。

2.4 椰酵菌在 PCFA 上的生长率 通过对 7 株不同来源的椰酵菌计数,得到 PCFA 相对 PDA 的生长率为 94.5~115.4%(T=0.309, P>0.70),进一步证实 PCFA 中的抑菌剂对椰酵菌个体生长无影响,其营养系统地适宜于该菌生长。

2.5 PCFA 抑菌谱(表 1) 从表 2 得知:PCFA 抑菌谱广,对常见 G⁺杆菌、球菌和 G⁻杆菌的生长完全抑制,有利于从杂菌量多的样品中分离椰酵菌;PDA 无抑菌

性,一些肠杆菌呈粘液状扩散生长,易掩盖椰酵菌菌落的形成和分离。

表 1 PCFA 和 PDA 抑菌谱

菌株	PCFA	PDA
肠杆菌科(9种)	-	+
假单胞菌属(3种)	-	+
贪食黄杆菌	-	+
金黄色葡萄球菌(2株)	-	+
芽胞杆菌属(4种)	-	+
类炭疽杆菌	-	+

“+”表示生长,“-”表示未生长

2.6 PCFA 灵敏度 经人工定量污染土壤,用 PCFA 和 PDA 同时检测椰酵菌,其结果见表 2。

表 2 PCFA 和 PDA 的最低检出量(个/ml)

椰酵菌菌株	PCFA	PDA
椰毒假单胞菌	89	7600
Col4	18	36000
溶 3	31	200000
三一 1	6.3	6300
巫-1	28	24000
忠 3	10	10000

$T_1=57$ $T_2=21$ $P<0.01$

从表 2 可知:PCFA 从自然环境土壤样品中检出椰酵菌的灵敏度较 PDA 提高了 1000 倍以上。两法具有显著性差异。

2.7 PCFA 应用 两种培养基从各类样品中检出椰酵菌结果见表 3。

表 3 PCFA 和 PDA 从样品中检出椰酵菌比较

样品种类	数量(件)	阳性数	
		PCFA	PDA
中毒样品:			
糯玉米汤元粉	3	3	1
环境样品	12	1	0
自然环境样品:			
粮食	119	8	0
土壤	37	2	0
水	14	0	0

从表 3 可知:无论是食物中毒样品还是自然环境样品,PCFA 检出率均高于 PDA。特别是自然环境样品,杂菌种类多,数量大,椰酵菌数量少,在培养过程中生长较慢。因此,PDA 难于检出;而 PCFA 可抑制杂菌生长,其抑菌剂和营养构成有利于椰酵菌个体生长及菌落形成,在分离平板上形成较纯的椰酵菌菌落。

参 考 文 献

1. 孟昭赫,等. 酵米面黄杆菌与椰毒假单胞菌的对比研究. 卫生研究 1987;16(6):17.
2. 酵米面中毒病因研究协作组,酵米面中毒病因的研究. 中国医科学院学报 1980;2(2):77.
3. 刘秀梅,等. 变质银耳中毒的病因——实验研究. 卫生研究 1985;14(4):25.
4. 杨仲亚,等. 酵米面黄杆菌中毒的流行病学调查及其毒性研究. 预防医学情报杂志 1989;5(1):47.
5. 孟昭赫(主编). 食品卫生检验方法注解(微生物学部份). 北京:人民卫生出版社,1991;222.

(1994-06-27 收稿)

奶粉、奶油、灌肠类食品中肠球菌污染情况的调查

内蒙古卫生防疫站(呼和浩特 010020)刘惠彦 金晓亮 张冰冰 陈志林

肠球菌来源于人和动物的肠道,外环境中大量的肠球菌存在,在食品的产、供、销的各环节都可造成肠球菌的污染。我们对 113 份样品进行了肠球菌检验,结果报告如下。

样品来源:速溶全脂奶粉 40 份,采自我区各大乳品厂;灌肠类食品 37 份,均为呼市熟肉加工厂的产品,其中 10 份采于生产厂家,27 份采于个体零售摊点。奶油 20 份,由我区的呼伦贝尔盟乳品厂送样;其它类食品 16 份(奶茶粉、方便酥、方便粥等)均为临时送检样品。

检验方法:(1)肠球菌分离计数:将样品作 10 倍递次稀释,取 0.2ml。滴在叠氮钠-结晶紫-七叶苷琼脂表面,用“L”棒涂匀,37°C 温箱 24h,挑选有褐色圈的典型菌落进行计数,根据记数结果求出每克食品所含肠球菌数。(2)证实实验:挑 23 个计数的典型菌落,接种普通斜面,然后进行以下证实实验。革蓝氏染色,肠球菌为革蓝氏阳性球菌,成双排列,偶成短链;过氧化氢酶试验阳性;因 40%胆汁培养基中生长(37°C24h);45°C 生长试

验,将肠球菌接种在 6.5%NaCl 肉汤中,45°C24h 生长良好。(3)生化分型鉴定,根据以上结果确定为肠球菌的菌株,再做以下分型鉴定。PH9.6 肉汤生长试验;60°C 30min 生长试验;10°C 生长试验;亚硝酸钾生长试验;TTC 还原试验;七叶苷、山梨醇、甘露醇、密工糖、乳糖蔗糖分解试验。根据以上结果,按 D 群链球菌生化特性分类表进行分类鉴定,其中粪链球菌占 52.2%;类粪链球菌占 30.4%;坚韧链球菌占 17.4%。

实验结果:113 份样品 83 份检出肠球菌,菌量在 $10^2 \sim 10^7$ g。其中 40 份奶粉中 37 份检出肠球菌,阳性率 87.5%;37 份灌肠中 28 份检出肠球菌(在个体摊点采的 27 份样品全部检出肠球菌),阳性率 75.6%;奶油 20 份 9 份检出肠球菌,阳性率 45%;其它类食品(方便酥、方便粥、奶茶粉)16 份,11 份检出肠球菌,阳性率 68.8%。以上结果,与同时所做的大肠菌群检出情况相比较,除 27 份个体摊位的灌肠大肠菌群阳性外,其余均为阴性。

(1994-05-10 收稿 1994-06-03 修回)