

一种在菌落总数测定中防止芽胞杆菌 菌落弥漫生长的方法

郑连宝¹, 陈文祥¹, 嵇林风¹, 章小洪², 丁琦¹, 施华标¹

1. 德清县食品药品检验所, 浙江 德清 313200; 2. 丽水市食品药品与质量技术监督检验检测院, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 研究一种在菌落总数测定中利用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)有效防止芽胞杆菌弥漫生长的方法。方法 取适宜稀释度的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 在平板计数琼脂培养基中分别添加 0.01%、0.05%、0.08%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.8%、1.0% TTC 水溶液, 同时以不添加 TTC 的计数琼脂培养基作为对照, 观察细菌的生长状况。结果 TTC 浓度为 0.2%~0.3% 时, 能有效防止枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌在计数琼脂培养基上出现菌落弥漫生长, 同时对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的生长无显著影响。结论 菌落总数测定时, 在培养基中加入 0.2%~0.3% 浓度的 TTC, 可以有效防止芽胞杆菌菌落出现弥漫现象, 便于准确计数。

关键词: 菌落计数; 芽胞杆菌; 弥漫生长; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2019)22-2715-03

A method for preventing colony diffuse growth of *Bacillus* spp. in bacterial plate counting

* ZHENG Lian-bao, CHEN Wen-xiang, JI Lin-feng, ZHANG Xiao-hong, DING Qi, SHI Hua-biao

* Deqing Institute for Food and Drug Control, Huzhou, Zhejiang 313200, China

Abstract: Objective To develop a method for preventing the colony diffuse growth of *Bacillus* spp. effectively. **Methods** 0.01%, 0.05%, 0.08%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.8%, 1.0% of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) was respectively added into the plate counting agar to observe the growth of *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in appropriate dilution, and the plate counting agar with no TTC was taken as a control. **Results** The colony diffuse growth of *Bacillus* spp. could be effectively prevented on the plate counting agar with 0.2%–0.3% of TTC, while there was no significant effect on the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* under the same conditions. **Conclusion** Therefore, in the bacterial plate counting, 0.2%–0.3% of TTC could be added into the plate counting agar to prevent the colony diffuse growth of *Bacillus* spp. effectively and make the counting more accurate.

Key Words: Bacteria plate counting; *Bacillus* spp.; Colony diffuse growth; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

菌落总数作为食品微生物学检验的基础项目, 具有重要意义。它用来判定食品被细菌污染的程度及卫生质量, 反映食品在生产过程中是否符合卫生要求, 以便对被检样品做出适当的卫生学评价^[1]。随着食品工业发展, 食品种类越来越多, 生产原料品种越来越广, 加工工艺也越来越复杂, 但微生物的污染仍然无法避免, 特别是糕点、面点等含高淀粉类食品受芽胞杆菌污染的机率大^[2-5], 加工过程中难以彻底灭菌, 菌落计数时琼脂平板上就会出现菌落弥漫生长的现象, 导致菌落难以计数, 对菌落总数检验项目的准确性造成严重的干扰^[6]。

需氧细菌的新陈代谢作用能将 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)还原为红色的三苯甲臍(TPF), 使得菌落呈红色, 故可以将 TTC 作为细菌生长的指示剂, 同时 TTC 对细菌的生长有一定的抑制作用^[7-10]。因此, 可以利用 TTC 这一特性, 寻求抑制菌落弥漫生长的有效方法, 便于菌落计数^[11]。

为寻求更加有效的菌落总数测定方法, 便于菌落观察和计数, 本文以枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌为芽胞杆菌代表菌, 以大肠埃希菌为革兰阴性菌代表菌, 金黄色葡萄球菌为革兰阳性菌代表菌, 采用琼脂培养基中加入 TTC 的方法抑制芽胞杆菌菌落弥漫生长现象, 改进优化菌落总数测定方法。

基金项目: 德清县科技计划(农业类)项目(2016SK07)

作者简介: 郑连宝(1986-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事微生物检验方面的工作。

1 材料与方法

1.1 材料 平板计数琼脂培养基(批号:3105013)购

自广东环凯微生物技术有限公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)(分析纯,批号:531D037)购自北京索莱宝科技有限公司(Solarbio)。枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CMCC(B) 63501、蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* CMCC(B) 63303、大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC2-5922、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC(B) 26003 购自广东环凯微生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 1% TTC 的配制 称取 1 g TTC,加入 99 ml 蒸馏水,完全溶解后,用 0.22 μm 滤膜除菌,于 4 °C 冰箱中避光保存。

1.2.2 菌液制备 将枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌分别接种于营养琼脂斜面培养基上,置(36 ± 1) °C 培养 24 h。取上述斜面菌苔用灭菌 0.85% 生理制成菌悬液各 5 ml 置灭菌试管中充分混匀,分别制成菌液浓度为 $n \times 10^7$ cfu/ml,以上菌液依次作 10 倍稀释,制备成浓度不同菌悬液备用。

1.2.3 不同含量 TTC 计数琼脂培养基 将平板计数琼脂灭菌后,待冷至 46 °C,分别按每 100 ml 培养基加入无菌(0.01%、0.05%、0.08%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.8%、1.0%)TTC 溶液 1 ml,最终浓度分别为 0.0001 g/ml、0.0005 g/ml、0.0008 g/ml、0.001 g/ml、0.002 g/ml、0.003 g/ml、0.004 g/ml、0.005 g/ml、0.008 g/ml、0.01 g/ml,摇匀混匀备用。

1.2.4 计数琼脂平板的制备和培养 参照国家标准 GB 4789.2—2016 操作,用 1 ml 灭菌吸管分别取上述细菌稀释液于 2 组灭菌平板内各 1 ml,将 46 °C 水浴中含不同浓度 TTC 的计数琼脂(包括不含 TTC 的对照组和覆盖组)注入平板内 20 ml,并转动平板使混合均匀。覆盖组,可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基(4 ml),凝固后翻转平板,同时分别将平板计数琼脂 20 ml 注入灭菌平板及加有 1 ml 灭菌生理盐水平板内作空白和试剂对照,待琼脂凝固后翻转平板,置 36 °C 培养箱内培养 48 h,观察结果 [12]。

1.3 统计学处理 利用 SPSS 18.0 软件,采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 TTC 对细菌生长的影响 当枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌液稀释浓度分别为 10^{-5} 和 10^{-6} 时,菌落数在适宜计数范围(30 cfu/ml ~ 300 cfu/ml)。从表 1 可知,不同浓度 TTC 对细菌生长呈现不同的抑制效果。低浓度 TTC 对菌落总数计数无显著影响。即 TTC 浓度为 0.01% ~ 0.1% 时,枯草芽胞杆菌对照组菌落总数为 1.1×10^7 cfu/ml;0.01% 组为 1.0×10^7 cfu/ml,0.05% 组为 1.0×10^7 cfu/ml,0.08% 组为 9.8×10^6 cfu/ml,0.1% 组为 1.0×10^7 cfu/ml,上述浓

度 TTC 下枯草芽胞杆菌菌落总数差异无统计学意义($\chi^2 = 1.600, P = 0.449$);蜡样芽胞杆菌对照组菌落总数为 5.6×10^7 cfu/ml,0.01% 组为 5.7×10^7 cfu/ml,0.05% 组为 5.4×10^7 cfu/ml,0.08% 组为 5.5×10^7 cfu/ml,0.1% 组为 5.6×10^7 cfu/ml,上述浓度 TTC 下蜡样芽胞杆菌菌落总数差异无统计学意义($\chi^2 = 0.600, P = 0.896$);而 TTC 浓度为 0.2% ~ 0.3% 时,2 种芽胞杆菌菌落总数出现一定量的增加,并出现超过对照组和覆盖组菌落数量的现象;但当 TTC 浓度达 0.4% 以上时,两菌菌落总数呈显著下降现象,菌落生长出现显著抑制作用。

当大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌菌液稀释浓度为 10^{-5} 时,菌落数在适宜计数范围(30 cfu/ml ~ 300 cfu/ml),TTC 浓度达 0.5% 以上时,金黄色葡萄球菌菌落总数呈显著下降现象,菌落生长出现显著抑制作用。

表 1 不同浓度 TTC 下菌落总数测定的结果(cfu/ml)

组别	枯草芽胞杆菌		蜡样芽胞杆菌		大肠埃希菌		金黄色葡萄球菌	
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}
对照组	111 ⁺	13	++	56 ⁺	258	20	248	27
覆盖组	81	10	++	58 ⁺	/	/	/	/
0.01%	100 ⁺	10	+++	57 ⁺	253	21	260	25
0.05%	101 ⁺	10	+++	54 ⁺	268	24	253	23
0.08%	98 ⁺	16	+++	55 ⁺	258	25	269	28
0.1%	103 ⁺	11	++	56 ⁺	245	25	255	26
0.2%	131	18	589 ⁺	60	237	22	268	25
0.3%	123	13	567 ⁺	59	231	20	258	24
0.4%	88	8	391	40	248	21	241	25
0.5%	85	8	27	3	243	23	167	15
0.8%	70	4	-	-	253	23	-	-
1.0%	25	2	-	-	240	18	-	-

注: + 代表计数平板菌落有一定的蔓延现象,星号越多越严重;- 代表计数平板无肉眼可见菌落;/ 代表无实验数据。

2.2 不同浓度 TTC 对枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌落形态的影响 不同浓度 TTC 对枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌落形态也呈现出 3 种状态。TTC 浓度为 0.01% ~ 0.1% 时,菌落颜色由粉色向红渐增,菌落形态和直径大小与对照组类似,计数平板上均呈现菌落弥漫生长现象;TTC 浓度为 0.2% ~ 0.3% 时,菌落颜色愈红,菌落形态与直径大小接近对照组,但计数平板上菌落弥漫生长现象基本消失;而 TTC 浓度达 0.4% 以上时,菌落颜色由红向朱红渐增,菌落直径渐缩至针眼大小,同时计数平板上菌落弥漫生长现象消失。枯草芽胞杆菌覆盖组菌落形态均为圆圈状,菌落无弥漫生长现象;蜡样芽胞杆菌覆盖组菌落形态多为细小点状形态,但明显有菌落出现弥漫生长现象,而

上述两菌的对照组菌落均呈现弥漫状态(图 1、图 2)。

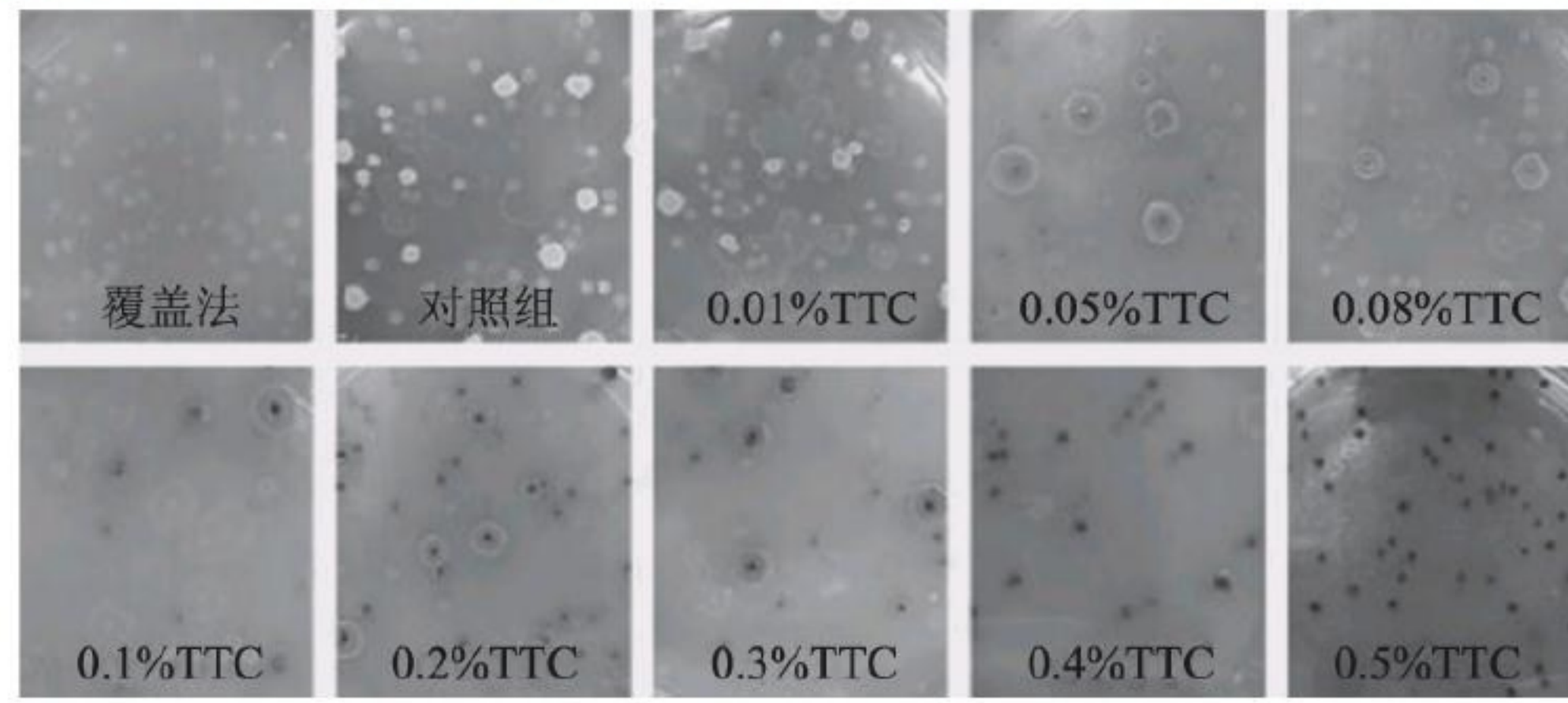


图 1 不同浓度 TTC 对枯草芽胞杆菌菌落形态的影响

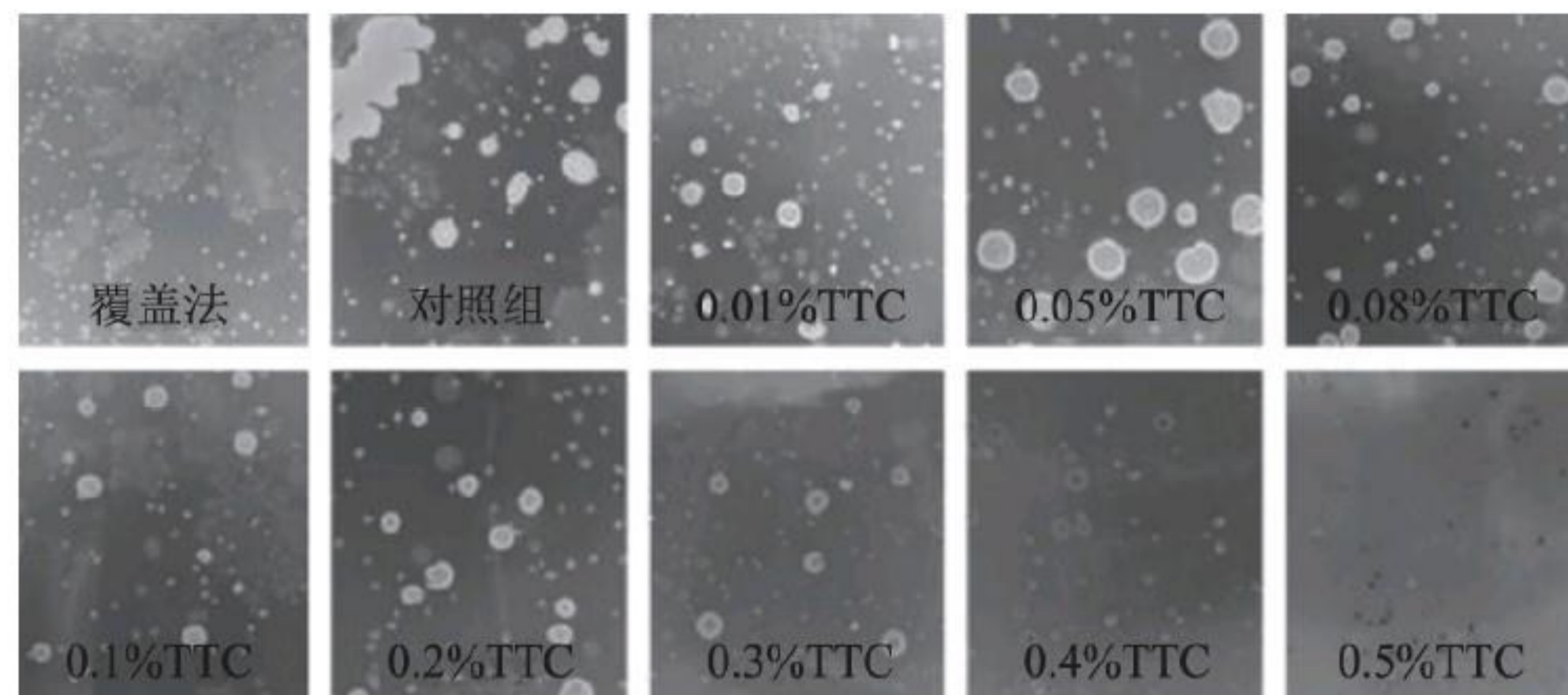


图 2 不同浓度 TTC 对蜡样芽胞杆菌菌落形态的影响

3 讨论

食品中菌落总数测定时,菌落计数琼脂表面经常会出现菌落弥漫生长的情况,对菌落计数造成较大影响。依据 GB 4789.2—2016《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》,如果样品中可能含有在琼脂培养基表面弥漫生长的菌落时,可在凝固后的琼脂表面覆盖一薄层琼脂培养基,凝固后翻转平板,按要求条件进行培养^[2]。但该方法实际操作过程中效果不佳,菌落弥漫生长的情况还会出现,被覆盖的菌落,特别是部分芽胞杆菌菌落,仍有出现大面积蔓延现象。本文采用琼脂培养基中加入 TTC 的方法抑制芽胞杆菌菌落弥漫生长现象,并与覆盖法的效果作对比。

TTC 浓度为 0.01% ~ 0.1% 时,对枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌生长无显著抑制效果,菌落形态、直径大小与对照组类似,菌落颜色显现淡红色易于辨认,但计数平板上有菌落弥漫生长现象,故抑制菌落弥漫生长效果不佳;TTC 浓度为 0.2% ~ 0.3% 时,对枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌生长亦无显著抑制效果,菌落总数出现一定量的增加,并出现超过对照组和覆盖组菌落数量的现象,菌落形态、直径大小接近对照组,颜色显现红色,但菌落弥漫生长现象几乎消失,故抑制菌落弥漫生长效果佳。同时,菌落颜色也易于分辨,且数量不受 TTC 抑制而减少,反而有所增加,原因可能是 TTC 抑制菌落的弥漫生长,使得原本因弥漫生长被覆盖而无法计数的菌落辨识度增加所致^[13];TTC 浓度达 0.4% 以上时,枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌落总数呈显著下降现象,菌落生长出现显著抑制作用,菌落颜色显现朱红,菌落直径渐缩至

针眼大小,同时菌落弥漫生长现象消失,但菌落总数出现急剧减少的现象。另外,实验结果显示大肠埃希菌不易受到高浓度 TTC 影响而被抑制,金黄色葡萄球菌则以添加 0.2% ~ 0.3% TTC 浓度为宜,这与杨庆文等^[14]、王晓文^[15]利用不同浓度 TTC 平板计数琼脂观察细菌生长试验的结果较一致。

综上所述,TTC 浓度为 0.2% ~ 0.3% 时,能有效防止枯草芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌在计数琼脂上出现菌落弥漫生长,同时对细菌的生长无显著影响,而覆盖法防止菌落弥漫生长的效果欠佳。因此,食品微生物检验中测定菌落总数时,遇到易受芽胞杆菌污染的食品,可在琼脂中加入 0.2% ~ 0.3% 的 TTC 防止菌落出现弥漫现象而导致无法计数的情况发生。

参考文献

- [1] 雷质文. 肉及肉制品微生物检测应用手册 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 223.
- [2] 李婷, 张小丽, 蒋子箭. 胀袋酱油中产气微生物来源的调查 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 97-102.
- [3] 周帼萍, 袁志明. 蜡状芽胞杆菌(Bacillus cereus)污染及其对食品安全的影响 [J]. 食品科学, 2007, 28(3): 357-361.
- [4] Granum PE, Lund T. Bacillus cereus and its food poisoning toxins [J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 157(2): 223-228.
- [5] 李毅, 章乐怡, 吴可可. 等. 温州地区食源性蜡样芽胞杆菌生化分型、毒素和耐药性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20): 3010-3012.
- [6] 陈永平. 浅析食品微生物检验中菌落总数测定的注意事项 [J]. 质量探索, 2016, 140(6): 50-51.
- [7] 白士茂. 氯化三苯基四氮唑对细菌生长指示的适用性研究 [J]. 浙江实用医学, 1997, 2(2): 12-13.
- [8] Pegram RG. The microbiological use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride [J]. Med Lab Technol, 1969, 26(3): 175-198.
- [9] Weinberg ED. Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl tetrazolium chloride in culture media [J]. J Bacteriol, 1953, 66(2): 240-242.
- [10] Junillon T, Vimont A, Mosticone D, et al. Simplified detection of food-borne pathogens: an in situ high affinity capture and staining concept [J]. J Microbiol Methods, 2012, 91(3): 501-505.
- [11] 杨东兴. 用 TTC 培养基法对食品进行菌落总数测定的效果探讨 [J]. 青海医药杂志, 2017, 47(9): 60-61.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [13] 李光泽. 食品微生物检验菌落总数测定方法的效果分析 [J]. 中国卫生产业, 2016, 13(1): 134-135.
- [14] 杨庆文, 国译丹. 不同浓度 TTC 平板计数琼脂细菌生长试验观察 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(1): 62-63.
- [15] 王晓文. TTC 应用于食品菌落总数测定的研究 [J]. 辽宁大学学报: 自然科学版, 2011, 38(1): 86-89.

收稿日期:2018-11-05