

使用微孔板光谱分析仪和平板计数测定 阪崎肠杆菌的生长

袁 飞, 徐宝梁, 陈 颖, 赵贵明, 黄文胜, 吴亚君, 张菲菲, 赵勇胜, 杨海荣, 王 晶
(中国检验检疫科学研究院食品安全所, 北京 100025)

摘 要: 本实验采用 96 孔板培养阪崎肠杆菌, 然后由微孔板实时监测阪崎肠杆菌的生长。采用微孔板光谱分析仪和传统的平板方法测定阪崎肠杆菌数量之间具有非常好的相关性($R^2=0.92$), 且可缩短测定时间(由至少 24h, 缩短为小于 10h)。阪崎肠杆菌菌株 36℃ 培养末期数量相近, 但生长曲线不同。进一步研究 17 株阪崎肠杆菌菌株 42℃ 生长情况, 发现微孔板光谱分析仪方法不仅能快速简便测定生长, 且可以一种实时的方式知道阪崎肠杆菌在整个培养过程中的生长情况。研究结果表明, 采用该方法可将阪崎肠杆菌菌株根据生长曲线的差异进行表型分类, 该表型与阪崎肠杆菌菌株生化反应表型结果一致。

关键词: 阪崎肠杆菌; 微孔板光谱分析仪; 平板计数

Growth of *Enterobacter sakazakii* Monitored by Microplate Luminometer

YUAN Fei, XU Bao-liang, CHEN Ying, ZHAO Gui-ming, HUANG Wen-sheng, WU Ya-jun,
ZHANG Fei-fei, ZHAO Yong-sheng, YANG Hai-rong, WANG Jing
(Food Safety Institute, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: Experiments were undertaken to determine the growth of *E. sakazakii* under different temperatures by microplate luminometer. 16 Strains of 17 *E. sakazakii* strains (including ATCC 29544) used in this study were isolated from dried infant milk formula powder on China retail market. The results showed that the *E. sakazakii* counts determined by microplate luminometer are perfectly correlated with those determined by conventional plate counting method ($r=0.92$). *E. sakazakii* in brain heart infusion broth can be quickly monitored with much shorter time (no more than 10 h) than that of conventional plating method (at least 24 h). Although at the end of incubation the amounts of *E. sakazakii* strains are close under 36 °C, but the growth curves are different. And the further research results of 17 *E. sakazakii* strains being incubated at 42 °C indicated that the microplate luminometer method provides a convenient, rapid and real-time way to monitor the growth of *E. sakazakii*. The results suggested that this microorganism can be divided into different phenotypes according to their different growth characters, which are consistent with phenotypes divided into according to their different biochemistry reactions.

Key words: *Enterobacter sakazakii*; microplate luminometer; plate counting method

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0281-05

阪崎肠杆菌是一种有周生鞭毛, 能运动, 无芽孢, 兼性厌氧的革兰氏阴性杆菌^[1], 可引发脑膜炎、小肠结肠炎、菌血症等, 尤其对于婴幼儿和免疫力低下人群具有较强的致病性, 死亡率高达 50%~75%^[2]。目前食品中的阪崎肠杆菌问题已受到了全世界的关注, 许多实验室都在对该菌进行研究^[3-8]。

国外有一些关于阪崎肠杆菌生长的研究报道。由于

生长温度是影响生长的一个重要因素, 因此其中较多报道都研究了温度对其生长的影响^[9-11]。其中有研究了 57 株阪崎肠杆菌菌株在 25、36、45℃ 时的生长情况, 其中 50 株阪崎肠杆菌菌株能在 47℃ 时生长, 但是无法在 4℃ 或 50℃ 生长。但是另一个报道中称, 阪崎肠杆菌的最低生长温度为 3.4℃。因此, 认为可以将阪崎肠杆菌菌株分为热耐受和不耐受两种表型。后续的研究也表明有些阪

收稿日期: 2007-09-13

基金项目: 科技部社会公益项目(2004DIA2J004; 2006BAD04A08);

中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项项目(2007JK004)

作者简介: 袁飞(1974-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事食品微生物检测技术研究。E-mail: feyyuan@yahoo.com.cn

崎肠杆菌在 72℃ 的热耐受性要高于其他肠杆菌科细菌,而有些阪崎肠杆菌并不比其他肠杆菌科细菌更耐热^[12]。这一矛盾可能说明,阪崎肠杆菌菌株可能存在不同的生长表型。在本实验中,采用 96 孔微孔板培养阪崎肠杆菌,然后通过光谱测定仪监控阪崎肠杆菌的生长情况,研究阪崎肠杆菌的生长表型。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

所有的菌株都接种至含有 20% 甘油的脑心浸液中,于 -80℃ 冰箱保存。每个分离株都分装到 8 个冻藏管中。其中两个用于实验。另外 6 个用于长期保存。实验中的 17 株阪崎肠杆菌中,除了 1 株为来自美国模式菌种收集中心(ATCC)的模式菌株 ATCC 29544 外,其余都分离自婴幼儿配方奶粉,为本单位所属菌种中心保存,编号为 CAIQ-1~CAIQ-16。分离、保存等使用的培养基的配制都按照培养基说明进行。

1.1.2 试剂

生理盐水(8.5%): 8.5g NaCl 加入 1000ml 水,溶解后 121℃ 灭菌 15min; 阪崎肠杆菌显色底物 北京路桥技术有限公司; 脑心浸液培养液(brian heart infusion): 称取 37g BHI 溶解于 1000ml 水,高温煮沸溶解,高压锅 121℃ 灭菌 15min,备用; 脑心浸液培养基(brian heart infusion): 称取 18.5g BHI 和 9~12g 琼脂,0.04g 显色底物溶解于 500ml 水,高温溶解,高压锅 121℃ 灭菌 3min,备用。

1.1.3 仪器

ME04073 无菌操作台 BAKER 公司; IS600 培养箱、SM32 型与 MLS-3780 型高压灭菌锅 三洋公司; Master-aw 水活度测定仪 Novasina 公司。

1.2 阪崎肠杆菌(ATCC 29544)的培养

阪崎肠杆菌(ATCC 29544)菌株接种至 5ml 脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)中,36℃ 培养 12h。5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷为发色底物,能被阪崎肠杆菌的 α -葡萄糖苷酶催化,改变脑心浸液的颜色。经过 12h 的培养后,一般用光谱测定仪测定的脑心浸液的 OD 值为 0.7,其浓度约为 10^7 CFU/ml。如果培养 12h 后,阪崎肠杆菌的浓度还是小于 10^7 CFU/ml,则需要继续培养。如果培养液中阪崎肠杆菌的浓度高于 10^7 CFU/ml,就用脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)进行稀释。

1.3 微孔板光谱仪监控阪崎肠杆菌(ATCC 29544)程序

首先,根据光谱测定仪的说明书编辑测定的程序(仪器允许的测定温度为 25~42℃,可进行动力学测

定,每次测定前可以进行振动),将波长设定为 600nm,培养温度设定为 36℃,每次测定的时间间隔为 0.5h,测定前振动 10s,培养时间为 48h。然后将培养 12h 后的菌悬液稀释 10^6 ,使得菌悬液中阪崎肠杆菌的浓度大约为 1CFU/g。吸取 30 μ l 该菌悬液至 96 孔微孔板中,然后加入 270 μ l 脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)。所有的测定都重复 5 次。以 300 μ l 不含有阪崎肠杆菌的脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)作为空白对照。

1.4 微孔板光谱分析仪和传统的平板计数方法监测阪崎肠杆菌(ATCC 29544)生长

将阪崎肠杆菌菌悬液稀释至约 1CFU/g。吸 1ml 该菌悬液至 9 ml 的脑心浸液(不含 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)中,36℃ 培养 7.5h。每隔 0.5h 采样 0.1ml 菌悬液。在低浓度时直接将该菌悬液涂布于平板上,浓度高时进行稀释后涂布于平板上,用平板计数法进行计数。所有的处理都进行 3 次重复。吸取 30 μ l 该菌悬液至 96 孔微孔板中,然后加入 270 μ l 脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)。轻轻蒙上透明的塑料保鲜膜,贴紧,用于防止菌悬液在培养过程中挥发。设定光谱测定仪的培养时间为 7.5h。所有的处理都重复 5 次。以 300 μ l 不含有阪崎肠杆菌的脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)作为空白对照。

1.5 微孔板光谱分析仪监测不同阪崎肠杆菌菌株在 36℃ 的生长

1.5.1 菌数培养

阪崎肠杆菌菌株(ATCC 29544 及 CAIQ1、5、9、13、14、和 15)接种至 5ml 脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)中,36℃ 培养 12h。采用同上的控制方法将阪崎肠杆菌浓度控制在 10^7 CFU/ml。

1.5.2 菌数测定

将阪崎肠杆菌菌悬液稀释至约 1CFU/g。采用同上的方法测定阪崎肠杆菌的生长。所有的处理都重复 5 次。以 300 μ l 不含有阪崎肠杆菌的脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)作为空白对照。

1.6 微孔板光谱分析仪监测不同阪崎肠杆菌菌株在 42℃ 的生长

1.6.1 菌株培养

所有的阪崎肠杆菌菌株接种至 5ml 脑心浸液(含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-吡喃葡萄糖苷)中,36℃ 培养 12h。采用同上的控制方法将阪崎肠杆菌浓度控制在 10^7 CFU/ml。

1.6.2 菌数测定

将阪崎肠杆菌菌悬液稀释至约 1CFU/g。采用同上的方法测定阪崎肠杆菌的生长,只是需要将培养温度设定为 42℃。所有的处理都重复 5 次。以 300 μ l 不含有

阪崎肠杆菌的脑心浸液(含有 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶 - α -D- 吡喃葡萄糖苷)作为空白对照。

1.7 阪崎肠杆菌的生化反应

所有的阪崎肠杆菌菌株接种至脑心浸液培养基(不含 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶 - α -D- 吡喃葡萄糖苷)上培养 36℃ 16h。然后用 API20D 试剂条测定其生化反应情况。

1.8 数据处理

所有数据通过 SPSS 数据处理软件(SPSS, 1999)分析处理。

2 结果与分析

2.1 采用微孔板光谱测定仪监控阪崎肠杆菌(ATCC 29544)的生长

许多研究认为, 肠杆菌属中只有阪崎肠杆菌具有 α - 葡萄糖苷活性, 很多研究据此在培养基中使用。4-methylumbelliferyl (4-MU)和5-bromo-4-methyl-3-indoxyl (X)等荧光或者可见光产生基团连接至 α -D- 葡萄糖^[13-14]上。在这些早期研究中, 通常通过这两种产生物质来指示阪崎肠杆菌的生长。研究结果表明, X- α -D- 葡萄糖比 4-MU- α -D- 葡萄糖效果更好, 因此, 本实验使用 X-a-D- 葡萄糖指示阪崎肠杆菌生长。

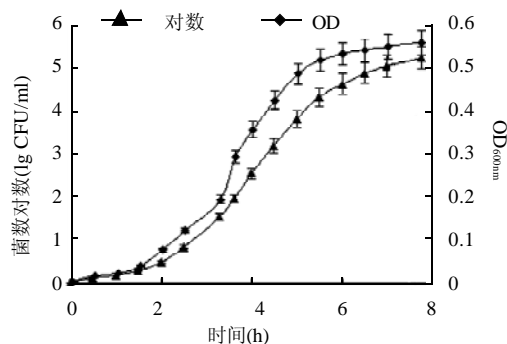


图1 微孔板光谱测定仪和传统平板计数法测定阪崎肠杆菌(ATCC29544)的OD值和对数值(7.5h、36℃)

Fig.1 OD value and amount logarithm of *Enterobacter sakazakii* (ATCC 29544) detected by microplate luminometer (7.5 hours, and 36 °C) and plate counting separately

细菌的生长曲线可以分为4个阶段, 包括延滞期、对数生长期、稳定生长期和衰亡期。从图1可见, 最初培养的1h中, 菌悬液中阪崎肠杆菌数量缓慢增长, 处于延滞期。在接下来的1~7.5h的培养中, 阪崎肠杆菌的数量迅速增加, 处于对数生长期。但是, 相对于培养前期(6h前), 在培养快结束时(6~7.5h), 阪崎肠杆菌的数量增加减缓。延长培养时间会发现, 培养7.5h后, 阪崎肠杆菌数量增加得更加缓慢, 直至细菌生长进入稳定生长期, 细菌数量基本稳定。在7.5h的培养

中, 阪崎肠杆菌经历了延滞期、对数生长期, 进入到对数生长后期。

从图1可见, 以微孔板光谱测定仪测定的阪崎肠杆菌OD值为Y轴, 以培养时间为X轴所做的曲线与以传统平板计数法测定的阪崎肠杆菌数量的对数值为Y轴, 以培养时间为X轴所做的曲线相似($R^2=0.92$)。这种相似性表明, 采用微孔板光谱测定仪测定的阪崎肠杆菌OD值与阪崎肠杆菌数量的对数线性相关。因此采用微孔板光谱测定仪测定的阪崎肠杆菌OD值可以用于揭示阪崎肠杆菌的生长情况。且该方法非常方便, 也节约时间(小于10h), 而传统的平板计数方法需要至少24h(细菌培养时间10h+取样后平板培养计数24h)。并且该方法为实时方法, 可以实时监测细菌的生长情况。

2.2 采用微孔板光谱分析仪监测不同阪崎肠杆菌菌株在36℃的生长

在研究肠杆菌属细菌时, 多数采用的培养温度均为36℃。因此在本实验中采用36℃作为细菌的培养温度, 监测7株阪崎肠杆菌菌株的生长情况(图2)。如果环境适合细菌的生长, 细菌快速生长, 很快就达到一个很大的量, 达到稳定生长期。细菌达到稳定生长所需时间 T_s 和细菌的数量可以用于衡量细菌生长的好坏。如果 T_s 增加, 也就是细菌达到稳定生长所需时间长, 或者细菌数量小, 就说明细菌生长得不好。从图2可见, 所有的阪崎肠杆菌菌株都随着时间数量增加, 到培养末期OD值相近, 但是细菌基本达到稳定生长期的时间不同, 细菌的生长曲线的形状也不一样。

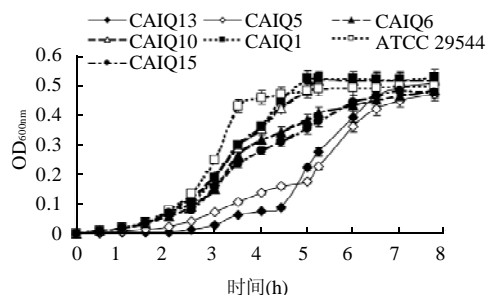


图2 微孔板光谱分析仪监测不同阪崎肠杆菌菌株36℃的生长情况

Fig.2 Growth situations of *Enterobacter sakazakii* strains under 36 °C monitored by microplate luminometer

在许多食品中都检测到了阪崎肠杆菌, 并且很多环境中也存在阪崎肠杆菌。奶粉, 尤其是婴幼儿奶粉是主要的阪崎肠杆菌的来源, 而且污染了阪崎肠杆菌的婴幼儿奶粉被证实与疾病的暴发相关。研究表明奶粉中阪崎肠杆菌的污染率为0~14%。虽然阪崎肠杆菌污染奶粉的情况非常普遍, 但是通常奶粉中阪崎肠杆菌的含量比较低(0.66CFU/100g)。研究中使用的17株阪崎肠杆菌, 除1株为阪崎肠杆菌模式菌株(ATCC 29544)外,

其余的 16 株阪崎肠杆菌都为实验室分离保存菌株。本研究表明, 阪崎肠杆菌在合适的条件下快速生长, 很快就能达到高浓度(小于 10h), 因此如果用温水冲调奶粉后, 将奶粉溶液保温(使奶粉溶液温度保持在 30℃ 以上)数小时, 那么阪崎肠杆菌就会快速生长并很快达到高浓度。因此建议冲调奶粉后应迅速将奶瓶置于冰箱保存(4℃)。

2.3 采用微孔板光谱分析仪监测不同阪崎肠杆菌菌株在 42℃ 的生长

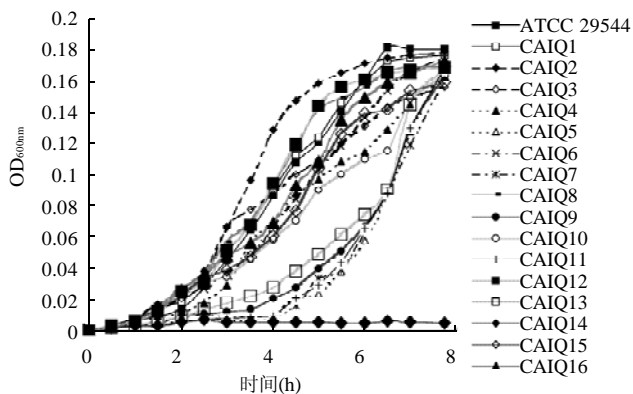


图3 微孔板光谱分析仪监测 17 株阪崎肠杆菌菌株 42℃ 的生长情况
Fig.3 Growth situations of 17 *Enterobacter sakazakii* strains under 42℃ monitored by microplate luminometer

多数阪崎肠杆菌能在 42℃ 生长, 并且有些阪崎肠杆菌菌株可以在 45℃ 生长。图 3 表明, 多数阪崎肠杆菌菌株能在 42℃ 生长, 只有一株阪崎肠杆菌(CAIQ 13)没有生长。虽然到培养终点, 16 株阪崎肠杆菌的数量相近, 但其生长曲线不同。根据生长曲线的形状, 至少可以把这 16 株阪崎肠杆菌菌株分为 2 大类。因此可以根据生长曲线将 17 株阪崎肠杆菌分为 3 个生物型, 也就是生物型 1(CAIQ 13), 生物型 2(CAIQ 5、7、9、11、和 14), 生物型 3(ATCC 29544, CAIQ 1、2、3、4、6、8、10、12、15、和 16)。而 Famer 等在对阪崎肠杆菌的生长和耐热情况进行研究后认为, 可以根据阪崎肠杆菌菌株不同的表现, 将菌株分为两个表型。在本实验中, 如果仅仅根据培养最终的阪崎肠杆菌的数量来衡量细菌的生长表现的话, 17 株阪崎肠杆菌也可以分为 2 个表型。但是如果采用微孔板光谱分析仪来监测阪崎肠杆菌生长得到细菌的生长曲线来衡量细菌的生长表现, 就可以把阪崎肠杆菌分为 3 个表型。细菌的生长情况作为细菌的表型特征之一, 是传统微生物研究中必须考虑的因素。但是与细菌的生化反应、抗生素谱等表型研究相比, 细菌的生长情况由于缺乏便捷的测定设备, 统一的测定体系, 而没有成为分型、鉴定的手段。

而本实验结果表明, 采用微孔板光谱测定仪可以方便地对细菌生长进行监测, 结果具有可重复性, 可比性。因此可以预见, 在细菌菌株数量足够多的情况下, 可以采用该方法, 通过计算不同生长曲线之间的相似系数, 将曲线分为更多表型, 从而作为细菌生长的表型特征之一, 用于细菌分型和鉴定。

阪崎肠杆菌能根据其生化反应特征(表 1)分为 4 个表型。表型 1 包括 ATCC 29544, CAIQ1、2、3、6、8、10、12、16, 其 Vagex-proskauer(VP)反应和肌醇反应(INO)为阳性, 山梨酸反应(SOR)为阴性(API 的反应代码为 3305373)。表型 2 包括 CAIQ 5、7、9、11、14, 其 VP 反应为阳性, SOR 和 INO 反应为阴性(API 的反应代码为 3305173)。表型 3 包括 CAIQ4 和 15, 其 VP、SOR 和 INO 反应为阳性(API 的反应代码为 3305773)。表型 4 包括 CAIQ 13, 其 INO 反应为阳性, SOR 和 VP 反应为阴性(API 的反应代码为 3304373)。该结果与前面采用微孔板光谱测定仪得到的阪崎肠杆菌的表型分型结果有部分一致。

这结果表明, 微孔板光谱测定仪法不仅比传统方法快速、便捷, 并且可以实时监测阪崎肠杆菌的生长。根据生长情况, 可以将 17 株阪崎肠杆菌菌株分为 3 个表型, 该结果与根据生化反应进行表型分型部分一致。

表 1 采用 API20E 试剂条测定阪崎肠杆菌的生化反应
Table 1 Biochemistry reaction results of *Enterobacter sakazakii* detected by API20E

菌株	VP	INO	SOR	反应条码	鉴定百分率(%)
ATCC29544	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ1	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ2	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ3	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ4	+	+	+	3305773	40.6
CAIQ5	+	—	—	3305173	51.2
CAIQ6	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ7	+	—	—	3305173	51.2
CAIQ8	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ9	+	—	—	3305173	51.2
CAIQ10	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ11	+	—	—	3305173	51.2
CAIQ12	+	+	—	3305373	98.4
CAIQ13	—	+	—	3304373	98
CAIQ14	+	—	—	3305173	51.2
CAIQ15	+	+	+	3305773	40.6
CAIQ16	+	+	—	3305373	98.4

注: + 表示阳性反应, — 表示阴性反应。

参考文献:

- [1] LEHNER A, STEPHAN R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*[J]. Journal of Food Protection, 2004(12): 2850-2857.

- [2] BAR-OZ B, PREMINGER A, PELEG O, et al. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn[J]. Acta Padiatr Scand, 2001, 90: 356-358.
- [3] BIERING G, KALSSON S, CLARK N V V, et al. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27: 2054-2056.
- [4] CLARK N C, HILL B C, OHARA C M, et al. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1990, 13: 467-472.
- [5] HAVELAAR A H, ZWIWTERING M. On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula[J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 15: 99-100.
- [6] HIMERLRIGHT I, HARRIS E, LORCH V, et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee [J]. Morbidity Mortality Weekly Report, 2004, 51: 298-300.
- [7] IVERSEN C, STEPHEN F. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula[J]. Trends in Food Science and Technology, 2003, 14: 443-454.
- [8] IVERSEN C, DRUGGAN P, FORSYTHE S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96: 133-139.
- [9] BREEUWER P, LARDEAU A, PETERZ M, et al. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95: 967-973.
- [10] EDELSON-MAMMEL S, BUCHANAN R L. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula[J]. Journal of Food Protection, 2004(1): 60-63.
- [11] EDELSON-MAMMEL S, PORIEOUS M Y, BUCHANAN R L. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula [J]. Journal of Food Protection, 2005(9): 1900-1902.
- [12] WILLIAMS T L, MONDAY S R, EDELSON-MAMMEL S, et al. A top-down proteomics approach for differentiating thermal resistant strains of *Enterobacter sakazakii*[J]. Proteomics, 2005(5): 4161-4169.
- [13] KANDHAI M C, REIJ M W, VAN PUYVELDE K, et al. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples[J]. Journal of Food Protection, 2005(6): 1267-1270.
- [14] NAZAROWEC-WHITE M, FARBER J M. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula[J]. Journal of Food Protection, 1997, 60: 226-230.