

用改良CHALMERS培养基方法快速检测食品中乳酸菌

上海市食品卫生监督检验所 杨 明 周蓓君 瞿明娟

摘 要

本文采用国外80年代先进的改良CHALMERS培养基,用于发酵乳和乳酸菌饮料中乳酸菌计数,并与MRS和LAB培养基进行了比较。从改良CHALMERS培养基分离到的菌落选择率为100%,MRS和LAB分别为82.55%和84.95% ($X^2=26.98$, $P<0.005$),改良CHALMERS培养基具有最佳选择性。由于这种培养基上菌落形态易识别,无需再做额外的鉴定试验。

关键词: 乳酸菌、培养基、选择性。

1. 引言

乳酸杆菌属, D和N群链球菌, 片球菌属, 明串珠菌属和近年来的双歧杆菌等均属乳酸菌^[1], 都需要复杂的生长条件^[2], 除双歧杆菌外所有乳酸菌种类经血清学和16S rRNA研究证明在种系上有联系^[3]。

企业的食品卫生状况的好坏有着明显的相关关系。食品企业主管部门(或行业)的食品卫生管理组织、机构,不但能经常对下属企业进行卫生检查和监测,同时还能配合食品卫生监督机构的监督管理工作(如组织培训、体检等)。由于它是企业的上级行政管理机构,还可以使用行政或经济上的手段对下级企业的卫生问题予以处理。事实说明,主管部门的卫生管理组织和制度越健全,下属企业对食品卫生的重视程度就越强,警觉性也越高。在当前食品卫生法制管理体系尚未完善,监督力量还比较薄弱的情况下,食品企业主管部门的自身食品卫生管理能够发挥很大的作用。

(四) 食品企业的基本设备和卫生设施的完善程度。

基本设备是指与食品卫生密切相关的冷藏、消毒、给排水、通风排污、食品加工或销售用的器械、工具等设施或设备。食品经

乳酸菌在乳酸菌饮料及发酵乳生产中发挥着重要作用^[4], 这类食品具有爽口的酸味和独特的风味,又因具有健康的生理意义而被世人赏识。同时,在变质的真空包装肉改肉制品和某些蔬菜中,乳酸菌也是污染菌中的优势菌^[5]。因此,食品卫生监测,乳

营单位的基本设备和卫生设施是搞好食品卫生的物质基础和必备条件。多元回归分析将此因素选入“最佳回归方程”中,说明了完善食品企业的基本设备和卫生设施对于提高企业的食品卫生水平是很重要的一环。从而提示我们在进行预防性卫生监督工作时,应注重对申请单位基本设备和卫生设施的审查验收,同时要加强对已发证的食品经营单位的基本设备和卫生设施的监督和指导,促其不断完善。

参 考 文 献

1. 中国科学院数学研究所, 回归分析方法, 科学出版社, 1975年。
2. Draper NR, Smith H. Applied Regression Analysis. John Wiley & Sons Inc. 1966.
3. Armitage P. Statistical Methods in Medical Research, Blackwell, 1971, Oxford.
5. 黄正南, 等, 医用多因素分析, 湖南科学技术出版社(1980)。

品生产单位的产品质控很需要对乳酸菌进行选择性地准确计数。

目前,一般使用的培养基可用于个别乳酸菌检验,但没有一个培养基能满意地检出所有的乳酸菌。由于常用的是含醋酸盐的琼脂,醋酸盐对乳杆菌是合适的,但对乳酸菌中的链球菌,某些链状菌菌株则有抑制作用^[5],故在实际乳酸菌计数时,醋酸盐琼脂可能会得出过低估计值。另外某些非乳酸菌,如杆菌属,微球菌属和酵母菌等也能在醋酸盐琼脂生长。菌落形态特征易和乳酸菌混淆。

本文研究的目的是为了找出一种固体选择性培养基,它有利于各种乳酸菌生长(除了双歧杆菌)根据平板上特征性的典型菌落,区别乳酸菌与杂菌,对食品中的乳酸菌快速简便地计数。为此,我们引入了先进的改良CHALMERS培养基检测技术³,并且与其他常用培养基进行了比较。

2. 材料与方法

2.1 样品

11件保存期内的乳酸菌饮料,17件普通酸牛奶。从采样到实验,样品都一直储存在4℃左右环境中。

2.2 培养基

2.2.1 MRS^[6]

2.2.2 LAB (胰胨10.0g,肉浸膏10.0g,酵母浸膏10.0g,乳糖20.0g,吐温80[1.0ml, CaCO₃]10.0g, K₂HPO₄2.0g琼脂10.0g,蒸馏水950.0ml, pH=6.6)。

2.2.3 改良CHALMERS(大豆蛋白胨3g,肉浸膏3g,酵母浸膏3g,葡萄糖20g,乳糖20g, CaCO₃20g,1%中性红5ml,琼脂15g,蒸馏水1000ml,硫酸多粘菌素B100IU/ml, pH=6)。

2.2.4 纯培养培养基(我们拟定的配方:蛋白胨3g,肉浸膏3g,酵母浸膏3g,乳糖20g,琼脂15g,蒸馏水1000ml, pH=6)。

以上培养基经121℃,15—20分钟高压灭菌消毒。

2.3 接种与培养技术

MRS与LAB培养基采用倾注法接种。改良CHALMERS培养基采用干燥平板表面涂布接种技术,每个稀释度接种两个平板,其中一个接种后覆盖一层冷却至45℃左右8ml的1.5%水琼脂。所有培养基培养温度为30℃,培养时间为72小时。

2.4 生化和形态学试验

从所有培养基中随机挑取562个菌落(挑取被检平板上菌落数的平方根)。MRS与LAB培养基中乳酸菌菌落与非乳酸菌菌落没有区别。从改良CHALMERS培养基上挑取的菌落具有典型的乳酸菌菌落。所有菌落在“纯培养培养基”上纯培养。然后在显微镜下观察它们的形态(革兰氏染色,菌体形态,芽胞),在分离的单个菌落上直接使用30% H₂O₂,以检测过氧化氢酶的存在。

2.5 在改良CHALMERS培养基上检验下列菌株生长。

乳酸菌

菌 株	来 源
保加利亚乳杆菌	AS1—1480
干酪乳杆菌	SHAC210—65
嗜热链球菌	本所
乳脂链球菌	AS1—9
粪链球菌	SHAC32221
肠膜明串珠菌	AS1—544

非乳酸菌

蜡样芽胞杆菌	本所
枯草芽胞杆菌	SHAC63501
金黄色葡萄球菌	本所
椭圆酿酒酵母	AS2—607

注: SHAC 上海市卫生防疫站, AS 中科院微生物研究所改良CHALMERS培养基上菌落外观,

2.5.1 所有以上乳酸菌菌种和所有样品中

分离的乳酸菌菌株出现相同菌落形态：小的带淡淡晕的红色菌落（图1）。

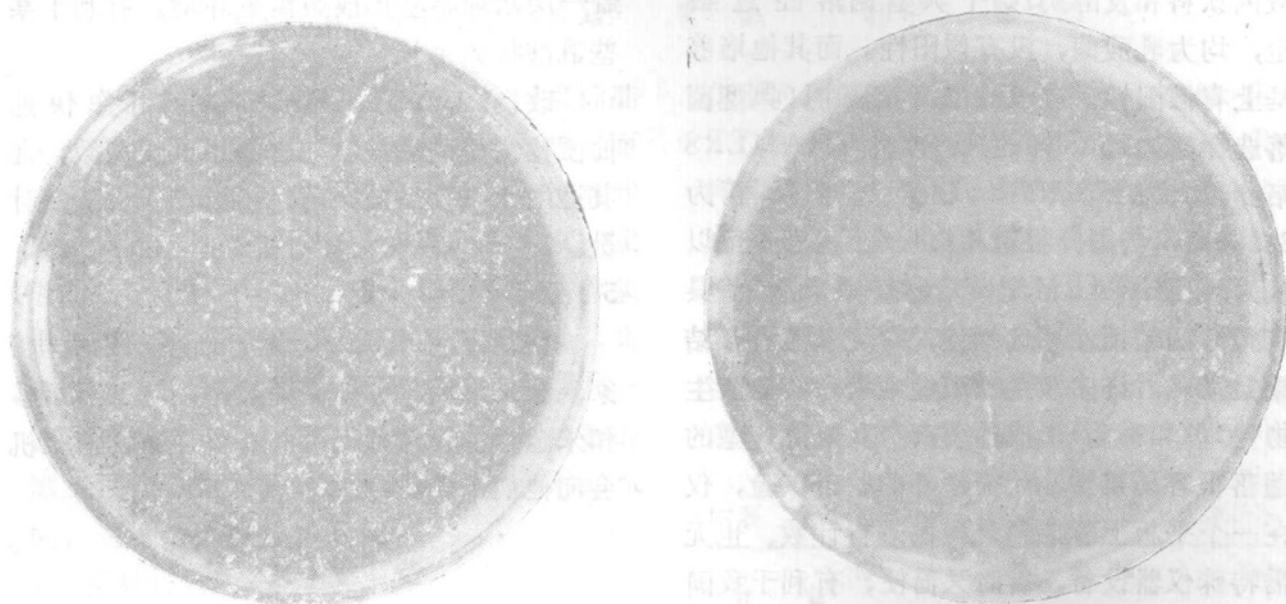


图1 乳酸菌典型菌落

2.5.2 杆菌属菌株有大的不规则淡橙色的菌落，无晕（图~略）。

2.5.3 葡萄菌属出现小的规则的淡橙色菌落，较乳酸菌大，且无晕（见图3略）

2.5.4 酵母形成淡粉红色无晕的菌落，较乳酸菌大而凸起（图4略）。

2.5.5 霉菌形成特有的菌落（图5略）。

3 结果

不同培养基中乳酸菌饮料和发酵奶的乳酸菌定量检测结果见表1，计算出每种培养基上的乳酸菌几何均数及标准差。不管是乳

表1 不同培养基中乳制品的乳酸菌的几何差数和标准差

培养基	乳酸菌饮料 (11件样品)		发酵乳 (17件样品)	
	lg G	lg SD	lg G	lg SD
A	7.19	1.65	7.81	0.18
B	7.08	1.62	7.79	0.24
C	7.04	1.66	7.61	0.32

培养基A：改良CHALMERSMRS

B：MRS

C：LAB

酸菌饮料还是发酵奶，改良CHALMERS培养基上的乳酸菌总数都大于其他培养基。

为比较各培养基性能，从它们中共挑取562个菌落作乳酸菌鉴定，获数据见表2。在改良CHALMERS培养基上分离到的乳酸菌和发酵奶中所有144个典型菌落均为乳酸菌，选择率达100%。从MRS和LAB平板上分离到212和206个没有特征的菌落，选择率分别为82.55%和84.95%经统计学处理有显著性差别， $X^2 = 26.98$ ， $P < 0.005$ 。

表2 检测乳制品中乳酸菌的不同培养基选择率比较

培养基	鉴定为乳酸菌菌落	鉴定为非乳酸菌菌落	合计	选择率%
A	144	8	144	100
B	175	37	212	82.55
C	175	31	206	84.95
合计	494	68	562	

培养基A：改良CHALMERS。B：MRS。C：LAB。

$X^2 = 26.98 P < 0.005$

4 讨论

从改良CHALMERS培养基分离的乳酸菌饮料和发酵奶144个典型菌落经过鉴定,均为乳酸菌,没有假阳性。而其他培养基上有假阳性。在试验的培养基中,典型菌落选择率达到100%的只有改良CHAMERS培养基(表2),MRS培养基选择率为82.55%,与国外报道相似^[3]。从表1可以认为改良CHALMERS培养基对乳酸菌具有很好的繁殖性和选择性,对乳酸菌计数结果最准确。许多革兰氏阳性细菌和其他微生物(酵母和霉菌)形成的菌落与乳酸菌典型的菌落很容易辨别,无需额外的鉴定试验,仅在一个平板上就能对乳酸菌进行计数,也无需特殊仪器设备,省时又简便,有利于我国广大基层单位实验室开展食品中乳酸菌检验。

目前使用的乳酸菌计数培养基中,大多因含抑制物质(见引言)只能让某些类型乳酸菌生长,而且杂菌与乳酸菌菌落很相似,MRS和LAE培养基就是这种情况。

改良CHALMERS培养基中肉浸膏、酵母浸膏具有丰富的氨基酸、维生素、核酸等,另外用大豆蛋白胨代替了以往常用的蛋白胨,它能适合所有乳酸菌生长。使用 CaCO_3 的量很大,有利于显示乳酸菌产生的高酸^[7]。还采用硫酸多粘菌素B抑制食品中发酵葡萄糖或乳糖的肠杆菌科的细菌,对乳酸菌并无抑制作用,从而避免与乳酸菌菌落发生混淆。我们用国产大豆蛋白胨代替了需花费

外汇进口的大豆蛋白胨MERCK,也取得了良好效果,使配方更便宜。平板接种后表面覆盖一层水琼脂易形成微需氧环境。有利于某些乳酸杆菌生长。

改良CHALMERS培养基可用作快速简便检测奶制品或其他食品中乳酸菌数,尤其适用于该食品被杂菌污染情况下乳酸菌计数。

5 致谢

在此研究中,承蒙袁亦丞主任技师,蒋家琨和张维兰付主任医师热情指导及姜培珍和朱金祥主管医师提供的有关样品,借此机会向他们深表谢忱。

参 考 文 献

- [1] 王亦芸译·发酵乳和乳酸菌饮料的种类及标准·食品工业1989;(2):19-24。
- [2] Stamer JR. The Lactic Acid Bacteria: of Diversity. Food Technol. 1979; 60.
- [3] Vaalos V and Coy L. Rapid Routine Method for the Diversity of Lactic Acid Bacteria among Comaetive Flora. Food Microbiol. 1986; (2): 223.
- [4] 金世琳·乳与乳制品生产·第一版·北京:轻工业出版社,1977:450-460。
- [5] Davidson C and Crouin F. Medium for the Selective Enumeration of Lactic Acid Bacteria from Foods. Appl. Microbiol. 1973; 26: 439.
- [6] Mau et al. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact. 1960; 23 (1), 130.
- [7] Rcccy MS et al. Agar Medium for Differential Enumeration of Lactic Strer. Appl. Microbiol. 1972; 24, 947.