

# 大肠菌群单管定量快速检测系统

蔡尽忠<sup>\*1</sup>, 何少贵<sup>2</sup>

(1. 厦门华夏学院检验科学与技术系, 厦门 361024; 2. 厦门大学化工学院, 厦门 361005)

**摘要:** 建立了单管定量检测食品中大肠菌群的快速检测系统。通过光子接收器采集样品在 410 nm 处吸光度变化数据, 由固化在计算机内的程序来实现样品中大肠菌群的单管定量快速检测。结果表明, 检测系统可检测出 7 cfu/mL (g) 样品, 菌浓度在 7 ~ 10<sup>5</sup> cfu/mL (g) 范围内具有良好的线性关系。当菌浓度为 7 ~ 10<sup>5</sup> cfu/mL (g) 时所需检测时间为 558 ~ 275 min, 检测结果与国标法检测结果之间无显著差异。可满足常见食品样品大肠菌群的单管定量快速检测需求。

**关键词:** 大肠菌群; 单管定量; 快速检测; 检测系统

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2017)01-0066-04

## The single tube quantitative rapid detection system for coliform

CAI Jin-zhong<sup>\*1</sup> and HE Shao-gui<sup>2</sup> (1. Department of analytical science and technology, Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024; 2. College of chemical engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** To address the drawbacks of traditional coliform detection methods, such as long operation time, tedious steps, huge workload and other issues, the authors propose a rapid, sensitive and accurate single tube quantitative detection system for the determination of coliform in food. The sample absorbance at 410 nm was collected by photon receiver, and a computer program was developed to achieve single tube quantitative rapid detection of the coliform sample. The results show that the detection system has high sensitivity, the limit of detection is 7 cfu/mL (g), and this system has a good linear relationship with the bacterial concentration in the range of 7 ~ 10<sup>5</sup> cfu/mL (g). The detection time is only 558 ~ 275 min for the bacteria concentration of 7 ~ 10<sup>5</sup> cfu/mL (g), and no significant difference is found between the results of this detection system and the national standard method. It can satisfy the requirement of single tube quantitative rapid detection of coliform in common food.

**Keywords:** Coliform; Single tube quantitative; Rapid detection; Detection system

近年来, 因微生物超标引起的食品质量问题占有相当大的比例。大肠菌群与大肠埃希氏菌一起被国际公认为检测食品、医药及各种水质在流行病学上安全性的指示菌<sup>[1]</sup>。传统检测大肠菌群的方法为乳糖发酵生化鉴定法, 该方法需要耗时 2 ~ 4 天<sup>[2]</sup>。近年来, 国外利用微生物中特异性酶而发展起来的选择性培养基技术<sup>[3, 4]</sup>, 特异性强、敏感性好, 得到广泛的认可和应用。利用大肠菌群能产生 β-半乳糖苷酶水解邻硝基苯基 β-D-半乳糖苷(ONPG) 产生半乳糖和邻硝基酚, 使培养液变成黄色的原理而发

展起来的大肠菌群快速检测技术, 已列为美国国家标准方法, 并已经有 colilert 等商业化的产品<sup>[5]</sup>。

本研究提出了一种大肠菌群的单管定量快速检测系统。该系统通过光子接收器采集的吸光度变化数据, 由固化在计算机的程序来实现单管定量快速检测样品中的大肠菌群, 可检测常见的食品样品。

### 1 检测系统设计

图 1 是大肠菌群的单管定量快速检测系统的整体结构示意图, 图 2 是本检测系统的检测单元示意图, 图 3 是本检测系统的电路示意图。

收稿日期: 2016-06-29

基金项目: 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JA14450) 资助

E-mail: cjz@hxy.edu.cn

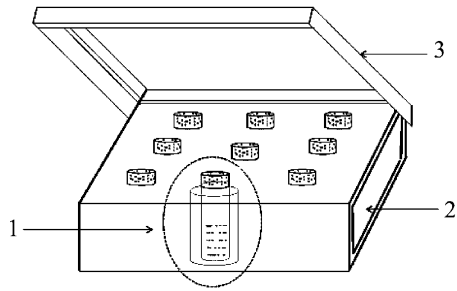


图 1 大肠菌群的单管定量快速检测系统整体结构示意图

Fig. 1 The overall structure of the single tube quantitative rapid detection system of coliform

1 - 检测单元 2 - 箱体 3 - 盖子

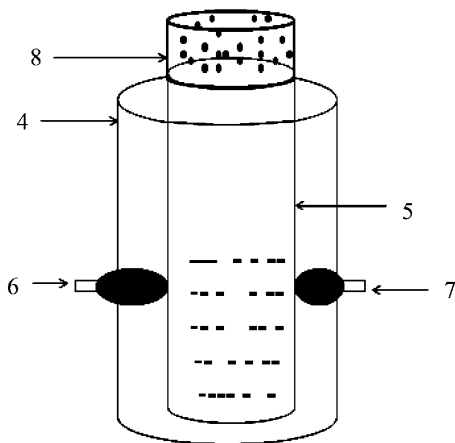


图 2 大肠菌群的单管定量快速检测系统检测单元示意图

Fig. 2 The detection unit of the single tube quantitative rapid detection system for coliform

4 - 支架; 5 - 样品检测池 6 - 光源 7 - 光子接收器 8 - 透气硅胶塞

检测系统含有多个相同的独立检测单元,能够同时检测多个样品。每个检测单元均含有独立的支架、样品检测池、光源及光子接收器。在检测单元中样品检测池玻璃瓶一端配有透气硅胶塞,能够有效通气,并杜绝外界微生物进入。光源和光子接收器分别固定在支架上,光源的发光轴和光子接收器的受光轴形成一直线,样品检测池则放置于直线的光路上。每个检测单元光源的电源和恒温控制器的温度控制器件分别直接与接口线路板相连,温度加热器件通过温度控制器件与接口线路板连接,接口线路板又与计算机相连,各检测单元的光子接收器通过 A/D 信号传输转换器与接口线路板相连。若干个检测单元安装在一个箱体中,箱体上配有盖子,箱体的壁中衬有保温材料,恒温控制器安

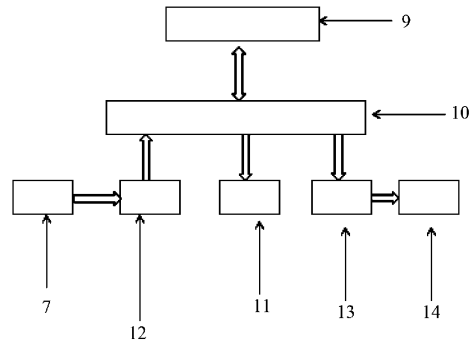


图 3 大肠菌群的单管定量快速检测系统电路示意图

Fig. 3 The electric circuit of the single tube quantitative rapid detection system for coliform

9 - 计算机, 10 - 接口线路板, 11 - 电源, 12 - A/D 信号传输转换器, 13 - 温度控制器件, 14 - 温度加热器件

装在箱体的壁中,整个箱体具有暗室和恒温的作用。

本检测系统中计算机可以通过恒温控制器对整个系统进行温度控制和调节。仪器参数由计算机界面设置,仪器按照界面设置要求完成光源开光、光和电模拟信号接收, A/D 信号转换, 自动复位, 数据自动存储等功能。在技术上, 本检测系统还应做到: 光源发光二极管和光子接收器光电管要采用稳定性高和一致性好的器件, 使各检测单元间的测量精度具有可比性; 发光二极管和光电管电源均由计算机进行控制, 时间控制精确, 提高测量的准确度, 可以满足科研、实验等各场合样品测定的需要。此外, 系统要放在暗室中, 暗室要达到能够充分避光的要求。

本检测系统使用时将培养基放置在样品检测池中, 加入经过前处理的样品, 然后将样品检测池放在检测单元的支架上。通过计算机设置系统温度, 通过温度控制器件对整个系统进行温度控制和调节, 将系统保持在适合大肠菌群生长的  $36 \pm 1$  °C。光源发出的光照到样品检测池, 当样品中的大肠菌群产生的邻硝基苯基 -  $\beta$ -D 半乳糖苷酶分解培养基中的邻硝基苯基 -  $\beta$ -D 半乳糖苷产生黄色物质, 检测其在 410 nm 波长处的吸光度随时间变化的数值。菌浓越小, 其吸光度出现明显增加所需的时间越长; 反之, 菌浓越大, 其吸光度出现明显增加所需的时间越短。因为吸光度值在 0.2 ~ 0.8 范围较为准确, 为了达到快速检测的目的, 故选择吸光度值达到 0.2 所需时间与初始菌浓度的关系来单管定量大肠菌群数量。透射光由光子接收器接收后, 通过 A/D 信号传输转换器给出的数字信号, 由固化在计算机的程序来计算样品中大肠

菌群的数量,得出检测结果。

### 2 实验部分

#### 2.1 实验材料

2.1.1 实验菌株 大肠菌群混合菌株 HX16.3 分离于生活污水并鉴定(包括大肠埃希杆菌属、肠杆菌属、枸橼酸菌属、克雷伯菌属)。

2.1.2 检测样品、试剂及培养基 检测样品:上海青、牡蛎、章鱼、泡鸡爪购于农贸市场;面包、奶茶购于商店。

ONPG(AR);聚丙烯滤膜(30 μm,浙江泰林生物技术公司);乙酸纤维素滤膜(0.22 μm,浙江泰林生物公司);营养肉汤培养基、营养琼脂培养基和乳糖发酵培养基(北京陆桥公司)。

检测培养基配方:营养肉汤培养基 19 g, ONPG 500 mg,蒸馏水定容至 1000 mL, pH 7.2。

#### 2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理<sup>[6]</sup> 取检测样品 10 g(mL)到含有玻璃珠的 90 mL 无菌生理盐水中,振荡摇匀后取 10 mL 以无菌操作法过一级滤膜 30 μm 聚丙烯滤膜,除去固体大颗粒。滤液过二级滤膜 0.22 μm 乙酸纤维素滤膜。用无菌镊子将截留菌体的膜放入装有 10 mL 检测培养基的样品检测池中。

2.2.2 达到 0.2 吸光度所需时间与初始菌浓度的关系式建立 将不同稀释度  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  大肠菌群混合菌株 HX16.3 加于经灭菌处理的白馒头中,按 2.2.1 节样品前处理法进行处理后放到大肠菌群的单管定量快速检测系统,于 37 °C 培养 16 h 根据吸光度随时间变化谱图,建立达到 0.2 吸光度所需时间与初始菌浓度的关系式,测定其线性范围,并考查其最低菌浓样品检测所需要的时间。同时将上述各稀释度的加于白馒头中的菌液用平板计数法<sup>[7]</sup>确定初始菌浓度。

2.2.2 不同通道间精密度 取同一稀释度的加于白馒头中的菌液,经过样品前处理后接种到 9 个通道中,测定其吸光度值随时间变化的差异,考查不同通道间精密度。

2.2.3 与国标法<sup>[8]</sup>比较 本检测系统检测:取经过 2.2.1 节样品前处理法处理的样品,放至大肠菌群的单管定量快速检测系统检测。国标法检测:样品按国标法前处理后,用第一法 - 大肠菌群 MPN 计数法检测,每个样品均测 3 个平行,检测结果以平均值 ± 标准偏差表示,数据用 spss22.0 软件进行 t 检验,考查本检测系统与国标法结果的差异。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 达到 0.2 吸光度所需时间与初始菌浓度的关系

平板计数法得出  $10^{-6}$  稀释度的菌浓度为 112 cfu/mL,  $10^{-7}$  稀释度的菌浓度为 7 cfu/mL。  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  稀释度的菌浓度为多不可计,根据逐级稀释的关系,预估其菌浓度分别为  $1.1 \times 10^5$ ,  $1.1 \times 10^4$ ,  $1.1 \times 10^3$  cfu/mL。各稀释度菌液吸光度随时间变化谱图如图 4 所示。菌浓越小,其吸光度出现明显增加所需的时间越长;反之,菌浓越大,其吸光度出现明显增加所需的时间越短。

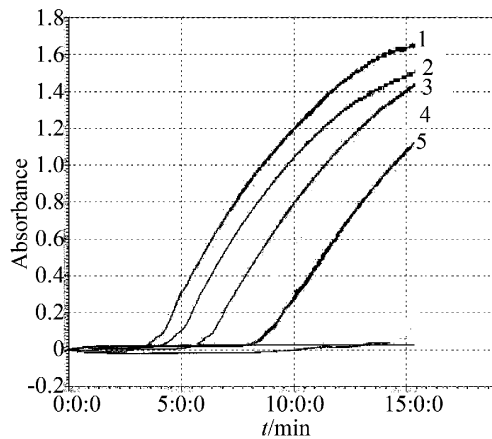


图 4 各稀释度菌液吸光度随时间变化谱图

Fig. 4 Spectra of the absorbance change with time of bacteria in each dilution degrees

曲线 1~5 分别为  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  稀释度菌液吸光度随时间变化谱图。

结果表明,当菌浓度在  $7 \sim 10^5$  cfu/mL 范围内具有良好的线性关系 ( $R^2 = 0.995$ )。当菌浓度为  $7 \sim 1 \times 10^5$  cfu/mL (g) 时所需检测时间仅为 558 ~ 275 min。将公式  $y = -0.014x + 8.909$  固化进软件,计算机可根据样品达到 0.2 吸光度所需要的时间自动计算出其大肠菌群的浓度,实现单管定量。

#### 3.2 不同通道间精密度

9 个通道间吸光度值随时间变化差异的实验结果表明各通道出现吸光度达到 0.2 所需时间不同,代表不同通道间所测得菌数量的差异。9 个通道达到 0.2 吸光度所需时间的相对平均偏差为 8.7%, 9 个通道间的精密度良好。

#### 3.3 与国标法比较

6 个食品样品国标法与本检测系统检测结果如表 1 所示。由表 1 可以得出,检测系统检测结果的变化范围在国标法检测结果的变化范围之内。经统计学分析,本检测系统所测得的大肠菌群数与国标法检测结果之间不存在显著差异,  $P = 0.88$ ,  $P > 0.05$ 。

表 1 国标法与本检测系统检测结果

Table 1 The result of this national standard method and the detection system

Sample	The detection system	The national standard method
	Coliform number cfu/mL( g)	Coliform MPN/mL( g)
Pak choi	35 ± 9	42 ± 21( - 10 93)
Oysters	1112 ± 128	1433 ± 208( 916 ,1950)
Octopus	664 ± 109	607 ± 163( 203 ,1011)
Soak chicken claw	154 ± 21	124 ± 34( 41 208)
Bread	17 ± 5	29 ± 7( 12 45)
Milky tea	69 ± 10	86 ± 30( 13 ,160)

#### 4 结论

本检测系统可用于大肠菌群的检测,具有灵敏度高,最低可检测出 7 cfu/mL( g) 样品,菌浓度在  $7 \sim 10^5$  cfu/mL( g) 范围内具有良好的线性关系;检测速度快,当菌浓为  $7 \sim 1 \times 10^5$  cfu/mL( g) 时所需检测时间仅为 558 ~ 275 min; 准确性好,其检测结果与与国标法检测结果之间不存在显著差异。解决了传统检测大肠菌群的方法耗时长、步骤繁琐、工作量大等诸多缺点。

系统只需单管就可以实现对大肠菌群进行定

量检测,节省试剂和操作时间。解决了国外基于微生物酶学特异性技术的大肠菌群检测所用 MPN 法计算结果准确度不高,检测工作量大和试剂使用量大等缺点。系统还可以用于大肠菌群代谢、防腐及消毒效果研究等,具有较强的实用性。

但本检测系统因检测吸光度变化来实现大肠菌群单管定量检测,故样品的本身的颗粒或者色素会影响检测的结果,因此需要较为复杂的样品前处理,这是本系统目前较为不足的地方。

#### 参考文献

- [1] Romprea, Servais P, Baudart J, *et al.* J Microbiol Methods, 2002, 49( 1) : 31
- [2] Mandalp K, Biswas A K, Choi K, *et al.* Am J Food Technol, 2011, 6( 2) : 87
- [3] Gunasekera T S, Veal D A, Attfield P V. Int J Food Microbiol, 2003, 85( 3) : 269
- [4] Noble R T, Leecastet M K, McGee C D, *et al.* Water Res, 2004, 38( 5) : 1183
- [5] Chao W. Lett Appl Microbiol, 2006, 42( 2) : 115
- [6] CN101838676A Rapid detection method of coliform in condiment  
CN101838676A 调味品中大肠菌群的快速检测方法
- [7] CHENG Shui-ming, LIU Ren-rong. Microbiology Experiment. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 2015: 60  
程水明, 刘仁荣. 微生物学实验. 武汉: 华中科技大学出版社, 2015: 60
- [8] GB4789. 3 - 2010 National food safety standards Food microbiological examination: Enumeration of coliforms  
GB4789. 3 - 2010 食品安全国家标准食品中微生物学检验大肠菌群计数