

基于荧光方法的大肠杆菌单管定量检测技术研究*

鄢庆枇^{1, 2* * *} 陈强¹ 庄峙厦² 王小如²

(集美大学水产学院福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 厦门 361021)¹

(厦门大学化学化工学院 厦门 361005)²

摘要: 通过研究培养温度、培养基 pH 值对大肠杆菌生长和培养液荧光强度的影响, 确定 44℃, 培养液 pH 值 7.0~7.5 为大肠杆菌 MUG 酶荧光检测的最佳条件。通过研究培养时间和接种菌浓度与培养液荧光强度的关系, 建立起基于荧光方法检测大肠杆菌的单管定量检测技术。通过与平板菌落计数法和最大可能数法比较发现单管定量检测法的相对标准偏差小于这两种常用的方法, 而且更为快速、经济, 适合用于大肠杆菌的定量检测。

关键词: 大肠杆菌, MUG, 荧光检测, 单管定量检测

中图分类号: Q93-332 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2007) 02-0319-04

Establishment of Single Tube Quantitative Detection Technology for *Escherichia coli* Assay Based on Fluorescent Method*

YAN Qing-Pi^{1, 2* * *} CHEN Qiang¹ ZHUANG Zhi-Xia² WANG Xiao-Ru²

(Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Xiamen 361021)¹

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)²

Abstract Influence of incubation temperatures and pH values of culture liquid on growth of *Escherichia coli* and the fluorescent intensity of culture liquid had been investigated. *E. coli* incubated at 44°C in the culture liquid with a pH value in the range of 7.0~7.5 was found to be the best condition for fluorescent assay. Single tube technology to detect *E. coli* was established through the studies on the relationship between incubation time, inoculation quantity of *E. coli* and the fluorescent intensity of culture liquid. Relatively standard diversity of single tube detection technology was lower than those of colony-counting method and the most probably number method. The results indicated that the single tube quantitative detection method was fit for *E. coli* quantitative detection because of the several advantages such as less time-consuming and more economical compared with traditional methods.

Key words *Escherichia coli*, MUG, Fluorescent detection, Single tube quantitative detection

大肠菌群及大肠杆菌 (*E. coli*) 是国际公认的检测各种水质、医药及食品在流行病学上安全性的指示菌^[1, 2], 尤其大肠杆菌作为检测环境及食品是否被肠道病原菌污染是更可靠的指标^[1]。用传统方法检测大肠杆菌, 耗时长、步骤繁琐、工作量大, 因此以显色底物为基础的新方法越来越受到重视^[3]。1981年, Janes等提出 MUG 可作为检测大肠杆菌的底物^[4]。后来, Peter等建立了以 MUG 为底物的分析方法^[5], 目前, 国外已将其作为检测大肠杆菌的主要方法之一^[6, 7]。

我国现在仍以传统方法检测大肠杆菌, 不能适应快速检测的需要。以 MUG 为底物检测大肠杆菌的 MPN 法在我国尚处于应用的初步阶段。本文以 MUG 为底物, 研究培养条件、大肠杆菌接种量等与培养液荧光强度的关系, 力求在较短的时间内实现大肠杆菌的定量检测。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

大肠杆菌 (AS. 1.90 AS. 1.129 AS. 1.355)

* 国家高新技术研究发展计划项目 (863计划项目) (No. 2002AA639600)
福建省自然科学基金 (No. B0410022)

** 通讯作者 Tel: 0592-6180204, E-mail: yanqp@jnu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-13, 修回日期: 2006-11-24

购自中国科学院微生物研究所, 除 1.7 试验外均用 AS. 1. 90 菌株进行试验。

1.2 试剂及培养基

MUG 和 MU 购自 Sigma 公司。

MUG 培养基: 胰蛋白胨 10g, MUG 75mg, 硫酸铵 5.0g, 硫酸锰 0.5mg, 硫酸锌 0.5mg, 硫酸镁 0.1g, 氯化钙 50mg, 亚硫酸钠 40mg, 磷酸二氢钾 0.9g, 磷酸氢二钠 6.2g, 氯化钠 10g, 蒸馏水定容至 1000mL, pH 7.2。

营养琼脂培养基和乳糖发酵培养基: 按《微生物学实验》^[8] 配制。

1.3 菌悬液制备

将大肠杆菌接种于营养琼脂斜面上培养 18h 后, 用 0.85% 生理盐水洗脱制成菌悬液, 然后调整到适当浓度待用。

1.4 大肠杆菌分解 MUG 产物的荧光光谱分析

将大肠杆菌菌液接入 MUG 培养液中, 同时可不接菌的培养液作为空白对照。然后置 37℃ 恒温培养, 每隔 1h 用荧光分光光度计 (JASCO FP-6200 型) 扫描荧光光谱 1 次, 观察培养液的荧光光谱的变化情况。若样品的荧光强度超仪器检测范围, 稀释 10 倍后检测。为避免培养液的荧光强度在室温中发生变化, 将待测培养液置于冰浴下保存并在 30min 内完成检测 (下同)。

1.5 培养温度对大肠杆菌生长及培养液荧光强度的影响

将大肠杆菌接入到 MUG 培养液中, 分别于 30℃、35℃、37℃、40℃、44℃、46℃、48℃ 下恒温培养, 用平板计数法^[9] 测定不同培养时间 (0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、24h、36h、48h、60h、72h) 的菌浓度, 同时从温育 6h 开始每隔 1h 测定培养液的荧光强度。

1.6 pH 值对大肠杆菌生长及培养液荧光强度的影响

将大肠杆菌接入不同 pH 值 (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9) 的 MUG 培养液中, 44℃ 培养, 8h 后测定培养液的菌浓度和荧光强度。

在另一组试验中, 将大肠杆菌接种于 MUG 培

养液中, 44℃ 培养 8h 后, 将培养液的 pH 值调至 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 后测定荧光强度。

1.7 大肠杆菌接种量与荧光强度的关系

将不同浓度 ($10^0 \sim 10^6$ cfu/mL) 的大肠杆菌接种于 MUG 培养液中 44℃ 培养, 分别于 7h、7h 15min、7h 30min、7h 45min、8h 测定荧光强度。

1.8 单管定量检测法的相对标准偏差

在 10 支装有 10mL MUG 培养液的试管中, 分别接入 1mL 大肠杆菌悬液, 44℃ 培养 7h30min 后测定荧光强度, 然后根据 1.7 中得到的接种量与荧光强度的关系求出菌浓度, 计算单管检测法的相对标准偏差, 并与平板计数法、多管发酵法测定结果的相对标准偏差进行比较。

2 结果

2.1 大肠杆菌分解 MUG 产物的荧光特性

大肠杆菌的培养液荧光强度在 7h 左右开始增大, 经荧光分光光度计扫描发现此时的激发波长和发射波长分别在 366nm 及 450nm 左右; 而随着培养时间的延长, 培养液的荧光强度迅速升高, 9h 时超过仪器检测范围 (> 1,000), 经稀释后激发波长由 366nm 变到 327nm, 发射波长仍在 450nm。

2.2 培养条件对大肠杆菌生长及培养液荧光强度的影响

2.2.1 培养温度的影响: 培养液荧光强度开始增加的时间在 30℃ ~ 44℃ 范围内随培养温度的上升而逐渐提早, 44℃ 下荧光强度最早增加, 培养 7h 就开始有变化, 培养 8h 荧光值就超过仪器检测范围; 46℃ 时培养液荧光强度的开始增加的时间明显滞后, 而在 48℃ 时培养液始终无荧光 (图 1)。

图 2 所示, 大肠杆菌在 30℃ ~ 46℃ 都能够生长, 而在 30℃ 条件下生长比其它温度下缓慢, 44℃ 时在培养初期有较好的生长, 但到培养后期数量有下降趋势, 46℃ 条件下最大生长量比其它温度低, 培养后期数量也有所下降。48℃ 培养条件下各培养时间均都无菌落生长 (图中未显示)。

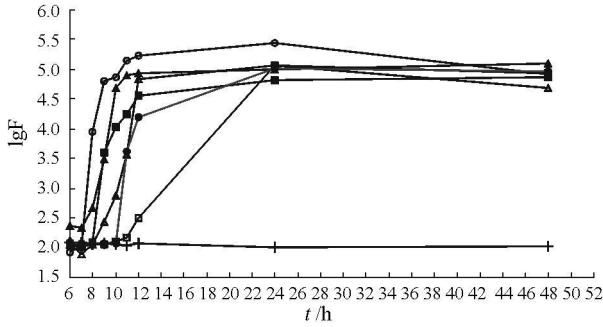


图 1 培养温度对大肠杆菌培养液荧光强度的影响

—□— 30C, —■— 35C, —△— 40C, —▲— 44C, —◆— 46C, —○— 48C

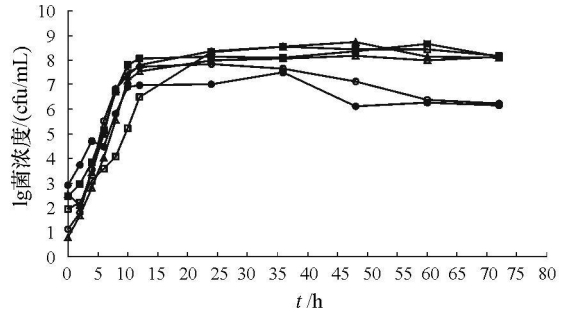


图 2 培养温度对大肠杆菌生长的影响

2.2.2 pH 值的影响: 大肠杆菌接种到 MUG 培养液中培养 8h 后再调整到不同 pH 值, 培养液的荧光强度发生明显变化, 当 pH 值在 5~ 9.5 范围时,

培养液的荧光强度随着 pH 值的上升而增加, 在 pH 值 9.5 左右达到最大值 (图 3)。

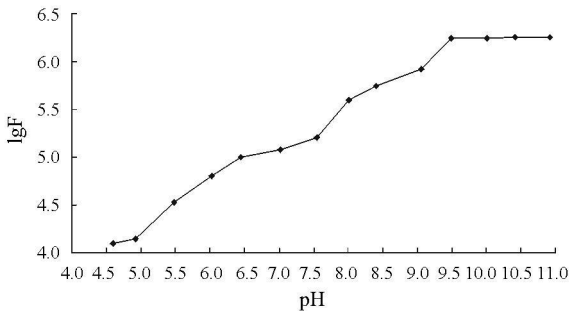


图 3 pH 值对 MU 荧光强度的影响

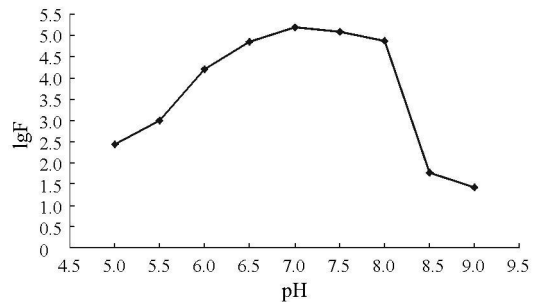


图 4 培养液的 pH 值对培养液荧光强度的影响

如果用不同 pH 值的 MUG 培养液培养大肠杆菌, 培养液的 pH 值在 7~ 8 之间荧光强度最高, pH 值 > 8 时, 培养液荧光强度急剧降低, 而 pH 值 < 7 时, 培养液荧光强度降低得相对较为缓慢 (图 4)。这是由于大肠杆菌在 pH 值 5~ 8 范围内生长较好, 而 pH 值 > 8 时, 大肠杆菌生长受到抑制, 影响到 β -葡糖苷酸酶的产生。

与荧光强度的线性关系也发生变化, 随着培养时间的增加, 较低菌浓度的样品也逐渐开始分解 MUG 产生荧光, 其中 AS. 1. 90 菌株在培养时间为 7.5h 时菌浓度与荧光强度的线性关系较好 ($R^2 = 0.9914$), 此时 AS. 1. 129 菌株和 AS. 1. 355 菌株也存在比较好的线性关系 (分别为 $R^2 = 0.8936$ $R^2 = 0.9450$)。

2.3 大肠杆菌接种量与荧光强度的关系

2.4 不同检测方法的相对标准偏差

如图 5a 5b 所示, 随着时间的推移, 菌浓度

MUG 法测定 10 个平行样的相对标准偏差为

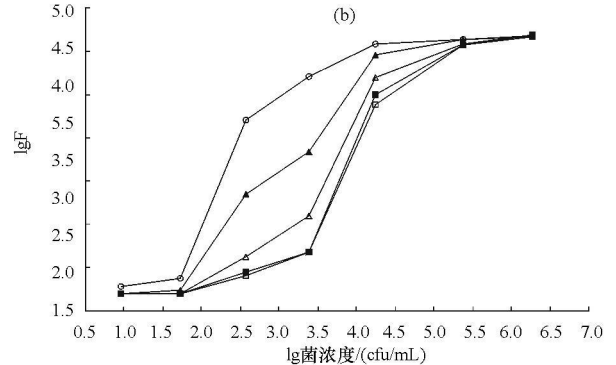
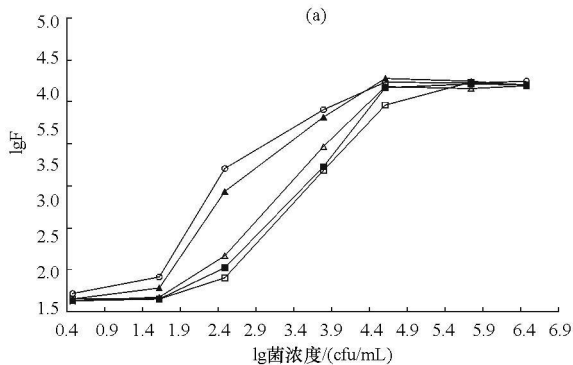


图 5 大肠杆菌接种量与荧光强度的关系 (a) AS. 1. 90 (b) AS. 1. 129

—□— 7h, —■— 15h15m, —△— 7h30m, —▲— 7h45m, —◇— 8h

14.9%，平板计数法的相对标准偏差为 57.1%，多管发酵法的相对标准偏差为 64.5%。由此可见 MUG 法的相对标准偏差大大低于平板计数法和多管发酵法。

3 讨论

在以 MUG 为底物检测大肠杆菌的 MPN 法中，用 366nm 的紫外光进行阳性判定^[6,7]，而本文结果表明大肠杆菌分解 MUG 产生的荧光物质激发波长为 327nm，用分析纯的 MU 检测结果也证实了其激发波长为 327nm，发射波长为 450nm。由于培养液的颜色、细菌细胞以及其他的物质的干扰，使培养液激发波长偏移到 366nm，经稀释后干扰减少，激发波长恢复到 327nm。由于在 366nm 处的检测结果的线性关系优于在 327nm 处的检测结果，因此本文其它试验中也均用 366nm 激发波长进行检测。

大肠杆菌的生长温度为 10℃ ~ 46℃，最适温度 37℃^[9]。温度影响大肠杆菌的生长情况，也影响酶促反应^[10]。虽然大肠杆菌在温度 35℃ ~ 44℃ 时都有较好的生长情况，但由于温度对酶反应的影响，MUG 在 44℃ 培养条件下分解得最快，而不是在其最适生长温度的 37℃；46℃ 时由于大肠杆菌的生长速率及生长最大量都有一定下降，因此 MUG 分解速度减慢；48℃ 时大肠杆菌不生长，培养液也就检测不到荧光。44℃ 的培养温度可用于区分自然环境中大肠菌群与粪大肠菌群^[11]，因此采用 44℃ 培养不但能缩短检测时间，而且还能减少其它杂菌的干扰。

Maddocks 等^[12]认为可以通过提高培养产物的 pH 值来增强 MUG 分解产物的荧光强度，进而提高检测灵敏度，本文结果也表明随着培养产物 pH 值的提升，荧光强度会有明显的升高。但是当 pH 值 > 8 时，大肠杆菌生长受到明显抑制。因此在配制培养液时要将 pH 值调到 7.0 ~ 7.5 之间，并在培养液中加入适量的缓冲液以缓冲 pH 值的变化。

Peter 等^[5]发现接种样品中大肠杆菌浓度与荧光出现时间有一定的对应关系。本文对 3 株大肠杆菌接种量与荧光强度关系的试验发现它们都存在一定的线性关系，虽然三者间拟合的线性关系公式有一定差异，但是三者的线性关系有较好的重现性，因此可以通过检测培养液的荧光强度来

对大肠杆菌进行定量分析。结果中拟合的线性关系的菌浓度范围限定在 $10^{1.6} \sim 10^{4.6}$ cfu/mL，若样品中菌浓度大于上限时可作适当稀释再进行测定；如果样品浓度较低，在 8h 内无荧光现象时，可适当延长培养时间，延长培养时间后若仍无荧光则说明此样品中不含大肠杆菌，若是阳性则可说明样品中大肠杆菌的量小于 $10^{1.6}$ cfu/mL，可通过绘制培养 9h ~ 10h 的荧光标准曲线来定量。

国内外有关对样品中大肠杆菌浓度的测定，不管是多管发酵法还是以 MUG 为基础发展起来的方法主要是通过 MPN 来确定的。本文结果表明单管定量检测法的相对标准偏差最小，多管发酵法及平板计数法都存在较大的相对标准偏差，所以单管定量检测法的结果有较好的重现性。

对比多管发酵法、滤膜法等传统的大肠杆菌检测方法，MUG 单管定量检测法的优点主要有：检测时间短；相对标准偏差小；节约试剂；方法较为简单、方便，因此有较好的应用前景。

参考文献

- [1] Hilal B, Dogan H, Ibrahim C, *et al*. European Food Research and Technology 2003, **216**: 331~334.
- [2] Desmond K O, Minda M P C. Marine Pollution Bulletin 1999, **38**: 921~924.
- [3] Noble R T, Leecaster M K, McGee C D, *et al*. Water Research 2004, **38**: 1183~1188.
- [4] James H G, Martha R M, David S, *et al*. Journal of Clinical Microbiology, 1981, **13**: 483~490.
- [5] Peter C S F, Paul A H. Applied and Environmental Microbiology, 1982, **43**: 1320~1329.
- [6] Cakir I, Dogan H B, Halkan A K, *et al*. International Journal of Food Microbiology, 2001, **68**: 217~223.
- [7] Gray P M, Rheem S, Kang D H. Letters in Applied Microbiology, 2002, **34**: 269~273.
- [8] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 (第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [9] 贺延龄, 陈爱侠. 环境微生物学. 北京: 中国轻工业出版社, 2001. pp. 233~236.
- [10] 周虹, 徐文弟. 生物化学与分子生物学高级教程. 北京: 科学出版社, 2002. pp. 161~206.
- [11] 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程. 南京: 南京大学出版社, 1998. pp. 101~104.
- [12] Maddocks J L, Greenan M J. Journal of Clinical Pathology, 1975, **28**: 686~687.