



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102076868 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 25

(21) 申请号 200980124119. 7

C12Q 1/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 23

(30) 优先权数据

0854275 2008. 06. 26 FR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FR2009/051201 2009. 06. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02010/004164 FR 2010. 01. 14

(71) 申请人 生物梅里埃公司

地址 法国迈合西 - 兰托阿讷

(72) 发明人 A · 科斯塔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

含有抑制或延迟孢子萌发的化合物的培养基

(57) 摘要

本发明主要涉及用于培养和检测靶微生物的培养基, 该培养基包含: 至少一种天然或合成的特异性底物, 其允许检测所述靶微生物的至少一种酶活性或代谢活性, 至少一种化合物, 其抑制或延迟除所述靶微生物以外的能够干扰所述靶微生物的培养和检测的微生物的孢子的萌发。

1. 用于培养和检测靶微生物的培养基, 包含:
 - 至少一种天然或合成的特异性底物, 其允许检测所述靶微生物的至少一种酶活性或代谢活性,
 - 至少一种化合物, 其抑制或延迟除所述靶微生物以外的能够干扰培养和检测所述靶微生物的微生物的孢子的萌发。
2. 如权利要求1所述的培养基, 其中所述抑制或延迟孢子萌发的化合物选自包括D-丙氨酸; 二苯胺; 通式为 $C_nH_{2n+2}OH$ 的醇, 其中 n 为6至12, 优选辛醇、壬醇或癸醇; 胰蛋白酶类型酶的抑制剂; 和/或它们的混合物的组。
3. 如前述权利要求中任意一项所述的培养基, 其中所述抑制或延迟孢子萌发的化合物在所述培养基中的量在0.01至1mol/l之间, 优选在0.05和0.1mol/l之间。
4. 如前述权利要求中任意一项所述的培养基, 还含有显示所述底物消耗的pH指示剂, 所述pH指示剂优选为生色团或荧光团。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的培养基, 其中所述底物包含对要揭示的酶活性或代谢活性特异的第一部分以及作为生色标记的第二部分。
6. 如权利要求1至4中任一项所述的培养基, 其中所述底物包含对要揭示的酶活性或代谢活性特异的第一部分以及作为荧光标记的第二部分。
7. 如前述权利要求中任意一项所述的培养基, 其中所述抑制或延迟化合物抑制或延迟芽孢杆菌孢子的萌发。
8. 如前述权利要求中任意一项所述的培养基, 其中所述靶微生物是凝固酶阳性的葡萄球菌, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。
9. 检测可能存在于样品中的靶微生物的方法, 包括以下步骤:
 - a) 使所述样品与权利要求1至8中任一项所述的培养基接触,
 - b) 将所述培养基在适于微生物细胞增殖的条件下保温,
 - c) 检测所述靶微生物的存在。
10. 如前述权利要求任一项所述的方法, 包括步骤a) 之前的步骤, 其包括向所述培养基中加入含有至少一种化合物的溶液, 所述化合物抑制或延迟除所述靶微生物以外的能够干扰培养和检测所述靶微生物的微生物的孢子的萌发。
11. 如权利要求9和10任意一项所述的方法, 其中步骤c) 包括用荧光读数器测量所述培养基中荧光水平的变化, 所述变化相应于所述培养基中的pH变化。
12. 如权利要求9和10任意一项所述的方法, 其中步骤c) 包括鉴定菌落。
13. 如权利要求9和10任意一项所述的方法, 其中步骤c) 包括区分大菌落与小菌落。
14. 如权利要求9至13中任一项所述的方法, 其中所述样品是食物或环境样品。
15. 如权利要求9至14中任一项所述的方法, 包括计数靶微生物的额外步骤。
16. 至少一种延迟或抑制微生物孢子萌发的化合物在制备权利要求1至8中任意一项所述的培养基中的用途。
17. D-丙氨酸在制备权利要求1至8中任意一项所述的用于鉴定诸如金黄色葡萄球菌的凝固酶阳性的葡萄球菌的培养基中的用途。
18. 权利要求1至8中任一项所述的培养基在检测、鉴定或甚至计数诸如金黄色葡萄球菌的凝固酶阳性的葡萄球菌中的用途。

含有抑制或延迟孢子萌发的化合物的培养基

[0001] 本发明属于临床或工业微生物测试领域。更具体地,本发明主要涉及培养靶微生物的培养基,该靶微生物可以存在于样品中,特别是存在于食品或者环境样品中,所述培养基含有至少一种抑制或延迟孢子萌发的化合物。

[0002] 下文将参照脱水产品来具体地描述本发明,但是这并不构成对本发明的限制。

[0003] 质量和安全是世界范围内食品加工工业最为关注的问题。必须能够检测、鉴定并定量原材料和终产品中的微生物菌群,从而保证从它们的生产到它们的消费中的产品价值。因此,利用改造的菌群来分析产品质量指标从而反映整体污染水平,所述改造的菌群中有诸如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的肠细菌、凝固酶阳性的葡萄球菌、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、酵母、霉菌等。特别地,寻找奶粉中凝固酶阳性的葡萄球菌当今已经变得非常迫切。

[0004] 在凝固酶阳性的葡萄球菌中,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 尽管与人类共生,却是葡萄球菌属中最致病的物种。特别地,它可以导致食物中毒、化脓性局部感染,并且在某些极端情况下,它可以导致经历过移植或心脏修复的患者的败血病。

[0005] 开发允许特异性计数凝固酶阳性的葡萄球菌的培养基的难点在于:

[0006] ●不仅要求该培养基有良好的灵敏性,以允许检测所述培养基中存在的很低的凝固酶阳性的葡萄球菌污染(约 10 菌落形成单位(CFU)/g);而且

[0007] ●要求能够抑制有时大量存在的其他微生物,最特别是在表型上与凝固酶阳性的葡萄球菌接近的诸如芽孢杆菌微生物的微生物。

[0008] 这是因为,由于芽孢杆菌微生物的实际特点,通过选择剂来区分凝固酶阳性的葡萄球菌与芽孢杆菌据发现是非常困难的;大部分对于这些细菌中的一种有效的抑制剂通常也会影响其他细菌。因此,据发现 Baird-Parker-RPF 型(兔血浆+牛血纤蛋白原)常规培养基不能有效且系统地抑制芽孢杆菌。

[0009] 而且,在食品加工领域,生产商经常借助脱水来加工产品,其条件通常可以除去大部分微生物,特别是营养体型的微生物。然而,芽孢杆菌属的细菌由于它们形成孢子的能力而能够经受住极端条件,如脱水期间所用的那些。于是,它们已经被发现存在于脱水产品中。因此,据发现奶粉中芽孢杆菌污染的水平可以达到很高。

[0010] 而且,制备培养基所需的大部分原材料本身也通常为脱水(粉状)形式。

[0011] 如上文所解释的,这些干原材料也经常被经受脱水条件的这些芽孢杆菌微生物所污染。

[0012] 因此,在诸如奶粉的脱水产品的微生物测试中经常观察到假阳性结果,这是由于这样的事实,即芽孢杆菌属的细菌被错误地分析为凝固酶阳性的葡萄球菌。

[0013] 相反地,由于经常存在大量的芽孢杆菌,其总是远高于凝固酶阳性的葡萄球菌的量,所以经常掩盖了后者的存在,从而使得假阴性的风险较高。

[0014] 因此,应当很容易地理解,大量的芽孢杆菌对于开发意图用于鉴定或甚至用于计数诸如凝固酶阳性的葡萄球菌的靶细菌的培养基来说是主要障碍并且可以导致对存在于诸如食物样品的分析样品中的这些微生物的存在的较差估计。所述样品定义为分离自分析

实体的小部分或者少量。

[0015] 尽管已经测试了开发用于凝固酶阳性的葡萄球菌的特异性计数的培养基的各种方法,但由于芽孢杆菌影响的限制,这些方法还没有达到预期的成功。

[0016] 因此,诸如抗生素的选择剂不能组合对芽孢杆菌微生物的良好选择性与保持对凝固酶阳性的葡萄球菌微生物的良好灵敏性。

[0017] 几十年前发表的两篇文章提及了 D- 丙氨酸对于孢子萌发的作用。

[0018] 从 M. Halmann, A. Keynan 于 1962 年发表的“Stages in germination of spores of *Bacillus Licheniformis*”, J. Bacteriol. 84 :1187-1193 已知 :L- 丙氨酸脱氢酶对于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 孢子萌发的第一生化步骤是必需的,而且该第一步骤可被 D- 丙氨酸、各种盐、丙酮酸乙酯和辛醇所抑制。

[0019] Yoko Yasusa-Yasaki 等 于 1978 年 发 表 的 “Inhibition of *Bacillus subtilis* Spore Germination by Various Hydrophobic Compounds : Demonstration of Hydrophobic Character of L-alanine Receptor Site”, Journal of Bacteriology, Vol. 136, No2, P. 484-490 也提到了负责孢子形成起始的 L- 丙氨酸的抑制剂是 :

[0020] - 作用于地衣芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的辛醇,

[0021] - 作用于巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的苯乙醇,

[0022] - 作用于巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 8- 羟基喹啉,

[0023] - 作用于蜡状芽孢杆菌的乙醇和二环己基碳二亚胺。

[0024] 后来发表的研究主要集中在表征孢子形式微生物的萌发机制,芽孢杆菌属就是一个实例。

[0025] 所述研究实际上描述了涉及萌发过程的各个步骤。

[0026] 迄今为止对于萌发机制的了解主要用于促进微生物孢子的萌发,特别是芽孢杆菌孢子的萌发,有以下几方面的目的 :

[0027] - 加速萌发从而改进在培养基中的生长 / 检测 ;

[0028] - 促进萌发以消除营养体型的微生物,其然后对培养基中以抗生素形式存在或某些工业清洁过程中以去垢剂或消毒剂形式存在的抑制剂更加敏感,其他过程基于高温处理。

[0029] 本发明意图通过提供与已确认的那些解决办法相反的技术方案来弥补上述缺陷,该技术方案不在于促进孢子萌发,而是与之相反,阻断孢子萌发,或者至少是使之延迟。

[0030] 而且,所述技术方案提供了使用抗生素的完全有利的替代选择,抗生素作用谱通常并不与区分诸如凝固酶阳性的葡萄球菌的靶微生物与诸如芽孢杆菌的能够干扰所述靶微生物的检测、鉴定或甚至计数的微生物的需求相容。

[0031] 本发明还具有不改变培养基的营养品质的优点,因而使得可以避免上述特异性的问题,从而使开发的培养基更加特别地适用于分析芽孢杆菌水平高的产品如脱水产品。

[0032] 因此,本发明重要目的之一在于使用培养靶微生物,特别是细菌的培养基,该培养基能够阻断,或者至少是延迟要分析的样品中可能含有的孢子的萌发,而这并不对所述靶微生物的生长产生影响。

[0033] 因此本发明的第一方面由用于培养和检测靶微生物的培养基组成,该培养基包

含：

[0034] ●至少一种天然或合成的特异性底物，其允许检测所述靶微生物的至少一种酶活性或代谢活性，

[0035] ●至少一种化合物，其抑制或延迟除所述靶微生物以外的能够干扰所述靶微生物的培养和检测的微生物的孢子的萌发。

[0036] 优选地，所述靶微生物是细菌，例如包括金黄色葡萄球菌在内的凝固酶阳性的葡萄球菌。

[0037] 对于本发明的目的，底物可以是诸如碳或氮源的代谢底物，该底物的降解产物导致 pH 值变化，所述变化可以通过 pH 指示剂进行检测。pH 指示剂是颜色随与微生物生长有关的 pH 值变化而改变的化学物质。提及的例子是生色团、中性红、苯胺蓝和溴甲酚蓝。在另一实施方案中，pH 指示剂是荧光团（如 4- 甲基伞形酮（4-methylumbelliferone）、氨基香豆素衍生物或试卤灵衍生物）。

[0038] 底物还可以选自可以被水解以产生允许直接或间接检测对所关注的微生物特异性的酶活性的产物的任何底物。在直接检测的情况下，底物包含对酶活性特异的第一部分以及作为标记的第二部分，其可以是生色或荧光的。

[0039] 本发明的培养基可以是即用的粉末形式、凝胶形式或液体形式，即可直接用于接种试管、烧瓶或培养皿。在凝胶培养基的情况下，琼脂是微生物学中用于培养微生物的常规胶凝剂，但可以使用明胶或琼脂糖。最后，培养基可装入专用于自动细菌学装置的瓶、筒或卡内（例如将要提及的是本申请人出售的 Vitek[®] 卡、Tempo[®] 卡和 BacT/ALERT[®] 瓶）。在这种情况下，延迟或抑制化合物可以为意图在使用前加入培养基的独立溶液形式。

[0040] 在食物来源的样品中，会非穷举地提及的是脱水产品的样品，如奶粉、谷类、汤粉或蛋糕制品。糕点也是一个例子。最后，食物样品可来源于动物饲料，如特别是动物食物（animal meal）。

[0041] 也会提及与环境相关的样品，如表面样本，水样本或空气样本。

[0042] 在本发明的一个优选实施方案中，所述抑制或延迟化合物抑制或延迟芽孢杆菌孢子的萌发。

[0043] 抑制或延迟孢子萌发的化合物有利地选自包括 D- 丙氨酸；二苯胺；通式为 $C_nH_{2n+2}OH$ 的醇，其中 n 为 6 至 12，优选辛醇、壬醇或癸醇；胰蛋白酶类型酶的抑制剂；和 / 或它们的混合物的组中。

[0044] 根据本发明的一个优选实施方案，所述培养基中抑制或延迟孢子萌发的化合物的浓度在 0.01 和 1mol/l 之间，优选在 0.05 和 0.1mol/l 之间。

[0045] 培养基也可以含有 pH 指示剂以显示底物的消耗，所述 pH 指示剂优选为生色团或荧光团。

[0046] 通常，底物可包含对要揭示的酶活性或代谢活性特异的第一部分以及作为荧光标记的第二部分。

[0047] 或者，底物可包含对要揭示的酶活性或代谢活性特异的第一部分以及作为生色标记的第二部分。

[0048] 本发明的第二方面涉及检测可能存在于样品中的靶微生物的方法，该方法包括以下步骤：

[0049] a) 使所述样品与本发明的培养基接触,

[0050] b) 将所述培养基在适合微生物细胞增殖的条件下保温,

[0051] c) 检测所述靶微生物的存在。

[0052] 根据另一具体实施方案,本发明的方法可以包括步骤 a) 之前的步骤,其包括向所述培养基中加入含有至少一种化合物的溶液,该化合物抑制或延迟除所述靶微生物以外的能够干扰所述靶微生物的培养和检测的微生物的孢子的萌发。

[0053] 本发明方法的步骤 c) 可以包括利用荧光读数器测量培养基中荧光水平的变化,例如这种变化相应于所述培养基中的 pH 变化。

[0054] 或者,步骤 c) 可以包括鉴定菌落。在这种情况下,本发明的培养基通常是固体形式,特别是培养皿中的琼脂培养基的形式。由于孢子萌发被延迟,所以在培养基中感兴趣的细菌的生长优先于其他细菌并且先于其他细菌。因此,在早期读取培养皿时(如接种后 16 小时)的情况下,只能看到感兴趣的细菌的菌落。在较晚读取(如接种后 24 小时)的情况下,所述读取包括区分大菌落与小菌落。通过孢子萌发所获得的细菌的菌落大小小于自身正常发育的靶细菌的菌落。因此容易区分靶细菌与其他细菌。

[0055] 根据一个具体实施方案,本发明的方法可以包括计数靶微生物的额外步骤。这样的计数步骤优选根据最大可能数(MPN)法进行。在本申请人的专利 EP1105457 中解释了该方法。

[0056] 本发明的另一方面涉及至少一种延迟或抑制微生物孢子萌发的化合物在制备培养基中的用途。

[0057] 完全优选地,本发明涉及 D- 丙氨酸在制备用于鉴定诸如金黄色葡萄球菌的凝固酶阳性的葡萄球菌的培养基中的用途。

[0058] 本发明的最后一方面涉及培养基在检测、鉴定或甚至计数凝固酶阳性的葡萄球菌中的用途。

[0059] 与抗生素不同,考虑到抑制或延迟孢子萌发的化合物通常在宽温度范围内保持稳定,因此本发明培养基的制备具有与生产培养基的方法的常规条件完全相容的优点。而且,这些化合物通常价格较低。

[0060] 根据下面实施例和附图会更清楚了解本发明的目的和优点,其中:

[0061] 图 1 的直方图显示了相对于荧光水平的 CV 分布,该荧光水平是在含有和不含 D- 丙氨酸的培养基中用测试的样品保温后获得的。

实施例

[0062] 以下的实例描述了 D- 丙氨酸对芽孢杆菌类微生物(如地衣芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)/蜡状芽孢杆菌)孢子形成的抑制作用。

[0063] 为此,对 59 份易含芽孢杆菌微生物且未被金黄色葡萄球菌污染的奶粉样品进行了测试。

[0064] 为了研究 D- 丙氨酸的抑制作用,测试了两种培养基:

[0065] - 培养基 1:不含 D- 丙氨酸的培养基,

[0066] - 培养基 2:培养基中存在终浓度为 0.05 和 0.1mol/l(培养基中的终浓度)之间的 D- 丙氨酸的培养基。

[0067] 所述培养基的组成如下（含有或不含 D- 丙氨酸的培养基中的 g/l, 终浓度）：

[0068]	动物（牛和猪）和植物蛋白胨	12.5
[0069]	糖和生长补充剂	11
[0070]	缓冲体系	10
[0071]	选择剂（抗生素、盐）	10.25
[0072]	荧光 pH 指示剂	0.06
[0073]	消泡剂	0.4

[0074] 样品根据 ISO 8261:2001 标准（关于奶和奶制品并涉及“制备测试样品、储备悬液和微生物检查所用十倍稀释液的常规指南（general guidelines for the preparation of test samples, of the stock suspension and of the decimal dilutions for the purpose of microbiological examination）”）按如下步骤制备：

[0075] a) 称取 10 克样品并置于 **Stomacher**[®] 袋中，

[0076] b) 加入预热至 45℃ 的 90ml 胰蛋白胨盐稀释剂以获得样品的初始 1/10 稀释液，

[0077] c) 利用 **Stomacher**[®] 机器研磨 1 分钟，

[0078] d) 将 **Stomacher**[®] 袋置于水浴中并于 45℃ 搅拌 5 分钟，

[0079] e) 取 1ml 样品（稀释至 1/10）并置于 3ml 培养基中以获得 1/40 稀释液，

[0080] f) 于 37℃ 保温 24 至 27 小时，

[0081] g) 对培养基进行荧光读取并通过最大可能数技术确定样品中微生物的污染水平。

[0082] 读取由保温后所获得的培养基中荧光测量组成。荧光值的大变化表明培养基酸化，所述酸化本身是由一或多种微生物的生长所致的。

[0083] 基于测试的样品（未被金黄色葡萄球菌污染）计算 CV 荧光值。

[0084] CV 越高，则培养基的酸化就越高，从而表明该培养基中存在微生物生长。反之，CV 越低，则培养基酸化就越低，从而反映出较少的微生物生长。因此，培养基的特异性较好并且假阳性的风险较低（假阳性结果与除金黄色葡萄球菌以外的微生物的细菌引起的培养基酸化有关）。

[0085] 由于本实施例中测试样品未被金黄色葡萄球菌污染，所以观察到的酸化与除金黄色葡萄球菌以外的各种微生物的非特异性生长有关，经鉴定属于芽孢杆菌属（地衣芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌 / 蜡状芽孢杆菌）。

[0086] 如图 1 所示，获得的并以直方图形式表示的谱（profile）表明两种培养基之间 CV 分布的显著差异：

[0087] 用培养基 1（不含 D- 丙氨酸）获得的 CV 分布在 0 和 24 之间的值，而用培养基 2（含 D- 丙氨酸）获得的所有值低于 6 且绝大多数低于 3（非常轻微的酸化）。

[0088] 在培养基中使用 D- 丙氨酸可以显著地降低培养基保温后所获得的 CV 值。由于在研究的情况下，CV 与非特异性酸化有关，所以向培养基中加入 D- 丙氨酸使得所述培养基对这类样品中以孢子形式存在的芽孢杆菌具有更好的特异性。

[0089] 下面的表 1 概括了含有或不含 D- 丙氨酸的培养基中获得的计数。

[0090] 表 1

[0091]

MPN 计数	测试的 D-丙氨酸			
	培养基 1		培养基 2	
	%	N	%	N
<10	50.85	30	89.83	53
10<计数<50	42.37	25	10.17	6
50<计数<100	6.78	4	0.00	0
总计	100.00	59	100.00	59

[0092] MPN :最大可能数

[0093] 注意,在测试的 59 份样品中,培养基 1 在获得的 50.85%的计数结果中保持了良好的特异性 (MPN < 10)。49.15%的结果为假阳性并与芽孢杆菌生长有关,其中 6.78%的给出高于 50CFU/g 的计数结果。

[0094] 向培养基中加入 D- 丙氨酸使得可以将小于 10 的结果的比例由 50.85%提高到 89.83%。假阳性结果的比例则由 49.15%下降至 10.17%,并且使用 D- 丙氨酸没有获得高于 50CFU/ 克的假阳性结果。

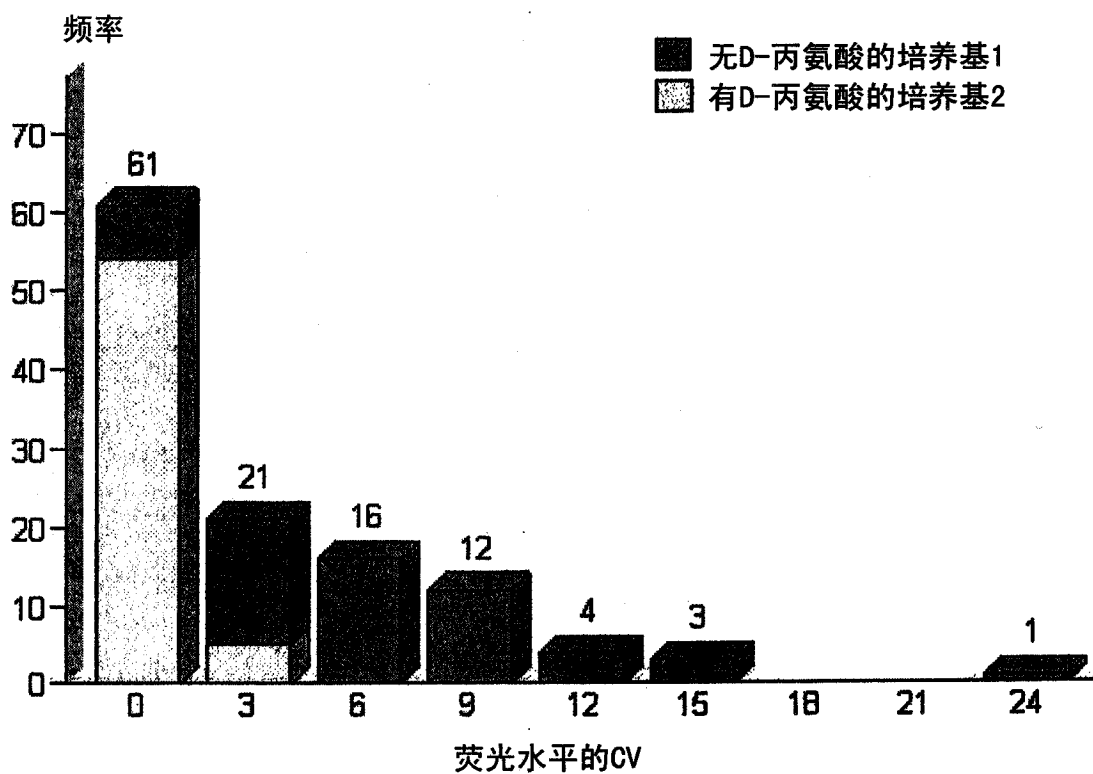


图 1