

副溶血性弧菌显色培养基检测效果初步评价

张淑红^{1,2} 吴清平^{1*} 张菊梅¹ 杨小鹏¹

(1. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(2. 广东环凯微生物科技有限公司 广州 510070)

摘要: 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要的食源性致病菌,广泛存在于各种海产品中。由于传统培养基和检测方法费时费力,本研究设计开发了一种新型显色培养基 HKC vibrio,通过应用于人工污染样品和实际样品检验,以法国科玛嘉弧菌显色平板 CHROMagar vibrio 和柠檬酸钠-硫代硫酸钠-氯化钠-蔗糖琼脂平板(TCBS)为对照,对显色培养基 HKC vibrio 的灵敏性、特异性和检测效果进行了初步评价。结果表明, HKC vibrio 的灵敏性与 CHROMagar vibrio 和 TCBS 相当,并具有较好的特异性, HKC vibrio 是非常有价值的分离平板,可大大提高副溶血性弧菌的检测效率。

关键词: 副溶血性弧菌, 显色培养基, 检测效果, 初步评价

Primary Evaluation of the Detection Effect for *Vibrio parahaemolyticus* Chromogenic Medium

ZHANG Shu-Hong^{1,2} WU Qing-Ping^{1*} ZHANG Ju-Mei¹ YANG Xiao-Juan¹

(1. Guangdong Institute Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

(2. Guangdong Huankai Microbial Sci & Tech Co., Ltd, Guangzhou 510070)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is an important food-borne pathogenic bacterium that widely exists in all kinds of seafood. As the traditional media and method were very costly-time and money, a new chromogenic medium (HKC vibrio) was designed in this assay. Through detecting the artificially contaminated samples and natural samples, the sensitivity, specificity and detection effect of HKC vibrio were studied and compared with CHROMagar vibrio and TCBS. The results showed that HKC vibrio had the same sensitivity as CHROMagar vibrio and TCBS, also had highly specificity. In conclusion, HKC vibrio was an invaluable medium which may improve the detection efficiency of *Vibrio parahaemolyticus* dramatically.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Chromogenic medium, Detection effect, Primary evaluation

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种重要的食源性致病菌,广泛存在于世界各国的沿海地区,是一种致病性嗜盐菌,消费者多因食用了污

染此菌的海产品如鱼、虾、贝类等引起食物中毒^[1~3]。由该菌引起的中毒在细菌性食物中毒中占的比例很高,严重威胁着人类健康。

为有效控制副溶血性弧菌污染发生和扩散,准确及时的检测手段是关键。目前,副溶血性弧菌检测仍以传统方法为主,包括选择增菌、纯化培养、生化鉴定等步骤,整个过程需要 4d~7d,已不能满足微生物快速检测的需要^[4]。在传统检测方法中,柠檬酸钠-硫代硫酸钠-氯化钠-蔗糖琼脂(TCBS)是目前国内外最常用的分离平板,基于副溶血性弧菌不发酵蔗糖的特点并结合酸碱指示剂对其进行鉴定,副溶血性弧菌在这种平板上呈现绿色菌落。但是这一平板存在一定缺陷,当有发酵蔗糖产酸、在TCBS上产生黄色菌落的一类弧菌存在时,由于颜色扩散,副溶血性弧菌往往不容易辨认;而且,TCBS不能有效地区分副溶血性弧菌和与其生化特点相似的创伤弧菌、拟态弧菌等。

利用显色培养基鉴定微生物是近年来开发的新型快速检测技术,通过在分离培养基中加入细菌特异性酶的显色底物,直接根据菌落颜色就可以对菌种做出鉴定,减少了进行纯培养和生化鉴定的步骤,大大提高了检测效率^[5-9]。本研究针对副溶血性弧菌特异性生化反应,在设计开发了一种显色培养基 HKC vibrio 后,对其特异性、灵敏性和检测效果进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基及试剂:法国科玛嘉弧菌显色培养基 CHROMagar vibrio 购自郑州博赛生物科技有限公司, HKC vibrio、TCBS 琼脂、3.5%NaCl 营养琼脂、嗜盐琼脂、脑心浸液琼脂、3.5%NaCl 多粘菌素 B 肉汤、副溶血性弧菌生化鉴定管、法国生物梅里埃 API 生化试剂条等由广东环凯微生物科技有限公司提供。

1.1.2 菌株:副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) VbL4-90、分离株 DTB102, 非 O1 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) VbO, 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) DTB103, 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) DTB104, 拟态弧菌(*Vibrio minicus*) DTB105, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 8099、ATCC25922, 伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*) CMCC50071, 宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*) CMCC51592, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC9027, 单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) CMCC54002, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538 等标准菌株和分离株均由广东省微生物研究所检测新技术研究发展中心提供。

1.1.3 主要仪器设备:生物安全柜(BHC-1100 型)、超净工作台、电热恒温培养箱、全自动高压灭菌锅、电子天平、荧光显微镜、-80℃低温冰箱、法国生物梅里埃细菌鉴定系统、电动漩涡混合器、接种环、培养皿、三角瓶、试管、移液管、涂布棒、剪刀等。

1.2 方法

试验中,除培养基配制、显微镜观察和计算机读取数据外,其他操作过程均在 100~1000 级生物洁净室和 Ⅰ级生物安全柜中进行。

1.2.1 培养基配制:供试培养基的配制按生产厂家说明书进行。

1.2.2 显色培养基特异性测试:副溶血性弧菌、非 O1 霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌复苏采用 3.5%NaCl 营养琼脂,大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、铜绿假单胞菌复苏采用营养琼脂,单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌采用脑心浸液琼脂,当复苏 24h 后,用接种环挑取 1 环,分别划线接种 HKC vibrio、CHROMagar vibrio 和 TCBS 平板,36℃培养 18h~24h,观察各个菌株在显色培养基上的生长情况。

1.2.3 显色培养基灵敏度测试:将副溶血性弧菌标准菌株 VbL4-90 在 3.5%NaCl 营养琼脂复苏 24h 后,接种环挑取 1 环,加入到 10 mL 0.85%生理盐水中配成菌悬液原液,然后进行 10 倍梯度稀释,用移液管吸取 10^{-4} ~ 10^{-6} 浓度菌液各 1 mL,分别涂布 HKC vibrio、CHROMagar vibrio 和 TCBS 平板,每个平板设 3 次重复,36℃培养 18~24h 后进行平板计数,比较各培养基的灵敏度。

1.2.4 人工污染样品检验:(1) 纯菌污染样品:将副溶血性弧菌 VbL4-90 在 3.5%NaCl 营养琼脂上复苏后,进行 10 倍梯度稀释,用移液管吸取 10^{-4} ~ 10^{-6} 各浓度菌液 1 mL 分别加到 25 g 鱼肉中,均匀混合 2h 后,按照行标 SN0173-92 检验程序,在 3.5%NaCl 多粘菌素 B 肉汤中增菌培养 18 h,取 1 环增菌液划线接种 HKC vibrio、CHROMagar vibrio 和 TCBS 平板,36℃培养 18~24h,观察副溶血性弧菌的检出情况。同时吸取 10^{-4} ~ 10^{-6} 各浓度菌液 1 mL 涂布嗜盐琼脂平板对 VbL4-90 进行计数。

(2) 混合菌液污染样品:将副溶血性弧菌 VbL4-90 复苏后,进行 10 倍梯度稀释,用移液管吸取 10^{-3} ~ 10^{-6} 各浓度菌液 1 mL 分别加到 25 g 鱼肉中,同时将非 O1 霍乱弧菌(约 10^3 ~ 10^4 cfu/mL)、溶藻弧菌(约 10^3 ~ 10^4 cfu/mL)、创伤弧菌(约 10^3 ~ 10^4 cfu/mL)

和拟态弧菌(约 $10^3\sim10^4$ cfu/mL)加到每份鱼肉样品中, 均匀混合 2 h后, 按照行标SN0173-92 检验程序, 首先在 3.5%NaCl多粘菌素B肉汤中增菌培养 18h, 然后取 1 环增菌液划线接种HKC vibrio、Chromagar vibrio平板, 36℃培养 18h~24h, 观察副溶血性弧菌的检出情况。

1.2.5 实际样品检验: 从超市和肉菜市场采集鱼肉、鱼鳃、虾、贝类等共 51 份, 先将样品表面进行酒精消毒, 然后用剪刀取 25 g 样品加入 225 mL 3.5% NaCl 多粘菌 B 肉汤中增菌培养 18 h, 取 1 环增菌液划线接种 HKC vibrio、Chromagar vibrio 和 TCBS 平板, 36℃培养 18 h~24 h, 观察。

1.3 鉴定

疑似菌落采用法国梅里埃细菌鉴定系统-API 试剂条, 结合传统生化方法进行鉴定。

2 结果

2.1 显色培养基特异性检测结果

不同菌株在培养基上的生长情况如表 1 所示。在 HKC vibrio 和 Chromagar vibrio 平板上, 副溶血性弧菌呈现紫色菌落, 非 O1 霍乱弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌呈现蓝绿色菌落, 溶藻弧菌呈白色菌落, 大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、铜绿假单胞菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌等杂菌或生长很差或被抑制; 在 TCBS 平板上, 副溶血性弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌都呈现蓝绿色菌落, 三者很难区分, 非 O1 霍乱弧菌、溶藻弧菌都呈现黄色菌落, 其他杂菌基本不能生长。由表 1 可知, HKC vibrio 对副溶血性弧菌具有较好的选择性和特异性。

2.2 显色培养基灵敏度检测结果

采用副溶血性弧菌 VbL4-90 纯菌液涂布各平板结果如表 2, 对 30~300 之间的菌落数进行方差分析, ($P>0.05$), 表明 HKC vibrio、Chromagar vibrio、TCBS 平板上生长的菌落数无显著差异, 3 种培养基可以达到相同的检测限, 培养基的灵敏度相当。

2.3 人工污染样品检验结果

副溶血性弧菌 VbL4-90 纯菌液涂布嗜盐琼脂的计数结果为 1.3×10^7 cfu/mL, 将 VbL4-90 稀释度为 $10^{-4}\sim10^{-6}$ 的纯菌液污染鱼肉后, 增菌检测结果表明, 稀释度 $10^{-4}\sim10^{-6}$ 在 HKC vibrio、Chromagar vibrio 和 TCBS 平板上都可以检出, 3 种平板可以达到相同的检测限 10^1 cfu/mL, 即当样品中带有 10^1 cfu/mL 浓度的目标菌时, 经过选择性增菌培养, 在 3 种培养基上都可以检出。

表 1 不同菌株在培养基上的生长情况
Table 1 Performance of different bacteria on the media

菌株(Strains)	HKC vibrio	Chromagar vibrio	TCBS
副溶血性弧菌 VbL4-90 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i> VbL4-90)	紫色	紫色	蓝绿色
副溶血性弧菌 DTB102 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i> DTB102)	紫色	紫色	绿色
非 O1 霍乱弧菌 VbO (<i>Vibrio cholerae</i> VbO)	蓝绿色	蓝绿色	黄色
溶藻弧菌 DTB103 (<i>Vibrio alginolyticus</i> DTB103)	白色	白色	黄色
创伤弧菌 DTB104 (<i>Vibrio vulnificus</i> DTB104)	浅绿色	绿色	蓝绿色
拟态弧菌 DTB105 (<i>Vibrio minicus</i> DTB105)	绿色	绿色	蓝绿色
大肠杆菌 8099 (<i>Escherichia coli</i> 8099)	—	—	—
大肠杆菌 ATCC25922 (<i>Escherichia coli</i> ATCC25922)	—	—	—
沙门氏菌 CMCC50071 (<i>Salmonella typhi</i> CMCC50071)	—	—	—
志贺氏菌 CMCC51592 (<i>Shigella sonnei</i> CMCC51592)	—	—	—
铜绿假单胞杆菌 ATCC9027 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027)	—	—	—
单增李斯特菌 CMCC54002 (<i>Listeria monocytogenes</i> CMCC54002)	—	—	—
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538)	白色、生长极差	白色、生长极差	—

表 2 副溶血性弧菌 VbL4-90 在各培养基上的菌落数
($\bar{x} \pm S, n=3$)
Table 2 The number of *Vibrio parahaemolyticus* VbL4-90 on different media($\bar{x} \pm S, n=3$)

培养基(Medium)	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
HKC vibrio	多不可计	140±2.03	5±1.97
Chromagar vibrio	多不可计	144±1.85	9±2.0
TCBS	多不可计	152±2.47	13±2.18

混合菌液污染样品结果表明, VbL4-90 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释度的纯菌液混合其他杂菌污染样品后, 经过选择增菌, 在 HKC vibrio、Chromagar vibrio 仍可以检出 VbL4-90, VbL4-90 呈紫色菌落, 其他弧菌呈现蓝色或白色菌落; 但当 VbL4-90 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释度的纯菌液混合其他弧菌污染样品后, HKC vibrio 和 Chromagar vibrio 上都生长了较多的白色菌落(溶藻弧菌), 基本不能检出紫色菌落。HKC vibrio 和 Chromagar vibrio 的检测效果基本相同, 即当样品中含有 10^3 cfu/mL 浓度以上副溶血性弧菌时, 经过选择性增菌培养, 在两种显色培养基上都可以检出;

含有 10^3 cfu/mL 浓度以下容易受溶藻弧菌干扰而在两种显色培养基上都无法检出。

2.4 实际样品检验结果

检验结果如表 3, 采集的 51 份实际样品中, 共检出副溶血性弧菌 2 株, 其中鱼鳃和贝类中各 1 株。HKC vibrio 与 Chromagar vibrio 与 TCBS 最终检测结果相吻合。检验过程中, 在 HKC vibrio、Chromagar vibrio 生长的紫色菌落, 用 API 生化试剂条—APIE 鉴定全部为副溶血性弧菌; 在 TCBS 生长的绿色菌落, 用副溶血性弧菌系列生化鉴定管结合 APIE 进行鉴定, 检出副溶血性弧菌 2 株。3 种培养基相比, HKC vibrio、Chromagar vibrio 比 TCBS 具有更高的检测效率, 可直接对副溶血性弧菌进行分离鉴定。

表 3 实际样品中副溶血性弧菌的检验结果 Table 3 The detection results of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in natural samples			
样品 (Samples)	HKC vibrio	Chromagar vibrio	TCBS
鱼肉 20 份 (Fish 20)	0	0	0
鱼鳃 9 份 (Fish gills 9)	1	1	1
虾 8 份 (Prawns 8)	0	0	0
贝类 8 份 (Shell fish 8)	1	1	1
总计 51 份 (Total 51)	2(4%)	2(4%)	2(4%)

3 讨论

鉴于显色培养基具有快速、灵敏、高效等诸多优点, 目前许多国家都在致力于显色培养基的开发, 并逐步将之引入到各种国际和国家检验标准中, 其作为一种新的微生物快速检测技术已得到了广泛的认可^[7]。

本研究中副溶血性弧菌显色培养基 HKC vibrio 是在大量筛选副溶血性弧菌特异性生化反应的基础上设计的, 并根据副溶血性弧菌嗜盐性和特殊培养条件, 对显色培养基配方进行了调整和优化, 其中加入了各种选择性抑菌剂, 在保障副溶血性弧菌良好生长的同时可有效抑制其他杂菌的干扰。因此, HKC vibrio 可特异性分离副溶血性弧菌, 在此培养基上, 副溶血性弧菌呈现特殊的紫色菌落, 其他弧菌呈现蓝色或无色菌落; 大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球等杂菌均被抑制。与国外同类产品 Chromagar vibrio 相比, HKC vibrio 成本更低, 更具推广应用价值。

本次实验结果表明, HKC vibrio 具有较好的灵敏性和特异性, 在人工污染样品和实际样品的中, HKC vibrio 与国外产品 Chromagar vibrio 的检测效

果相当; 与 TCBS 相比, HKC vibrio 更能节省时间, 直接根据菌落颜色就可对菌种做出鉴定, 而 TCBS 上生长的菌落还需进一步生化鉴定才能做出最终判断。因此, HKC vibrio 是非常有价值的分离平板, 是对传统培养基的有利补充。

由于本实验所涉及的食物种类和数量有限, 此培养基应用效果还需大量实际样本进行验证。另外, 试验中发现, 当样品中溶藻弧菌的数量高于副溶血性弧菌的数量时, 经过增菌培养再接种显色培养基, HKC vibrio 和 Chromagar vibrio 两种显色培养基上都生长了较多的溶藻弧菌, 在一定程度上影响了副溶血性弧菌的检出, 类似的结果在一些文献中也早有报道^[10-11], 分析可能是由营养竞争因素造成的, 增菌过程中溶藻弧菌生长较快, 在划线接种培养基后, 菌落数量较多, 扩散较快, 容易导致副溶血性弧菌检测结果的假阴性, 因此, 要特别注意溶藻弧菌的干扰作用, 尤其是对多种菌污染的海产品样品, 可通过建立高效的样本前处理方法(包括增菌方法), 提高副溶血性弧菌的检出率。

参 考 文 献

[1] 乔华林, 章 俊. 副溶血性弧菌的致病性及其检验和测定. 水产科学, 1999, 18(4): 28-31.

[2] 刘 念, 江智辉, 郭 怡. 一起副溶血性弧菌引起的食物中毒. 现代预防医学, 2004, 31(6): 917.

[3] 陈慧燕, 李小春, 李 毅, 等. 一起由副溶血性弧菌和变形杆菌引起食物中毒的实验室检测报告. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(4): 466-467.

[4] 朱敏华, 项明洁, 倪语星. 科玛嘉弧菌显色培养基对弧菌的分离培养. 诊断学理论与实践, 2004, 3(1): 28-29.

[5] Samra Z, Heifetz M, Talmor J, et al. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. J Clin. Microbiol, 1998, 36(4): 990-994.

[6] Ventia MC, Miles RJ, Price RG, et al. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2): 807-812.

[7] 张淑红, 吴清平, 张菊梅, 等. 显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用. 微生物学通报, 2006, 33(6): 108-111.

[8] 杨梅梅, 叶慧芬, 陈惠玲, 等. CHROMagar ECC 显色培养基在肠道菌鉴定中的应用. 江西医学检验, 2004, 22(3): 229-230.

[9] 杨兰萍, 许学斌, 姚宗蓓, 等. CHROMagar 显色培养基分离沙门氏菌的初步应用和评估. 检验医学, 2005, 20(1): 52-54.

[10] Miguel K. Medium for isolation and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. Appl Environ Microbiol, 1983, 45(1): 310-312.

[11] Fletcher GC. The potential food poisoning hazard of *Vibrio parahaemolyticus* in New Zealand Pacific oysters. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1985, 19(4): 495-505.