

选择性富集沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌的共增菌培养基 SVV

覃倚莹, 吴晖, 肖性龙, 余以刚, 刘冬梅, 李晓凤, 唐语谦

华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640

摘要: 本研究通过单因素试验和响应面分析试验建立了能够选择性富集沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌的共增菌培养基 SVV, 采用平板计数法及三重荧光 PCR 技术验证了 SVV 的增菌效果。结果表明: SVV 能同时富集以不同浓度比例混合的 3 种目标菌, 37°C 振荡培养 18 h 后, 菌体浓度达到 $10^5\sim 10^8$ CFU/mL; SVV 强烈抑制大部分的非目标菌; 用荧光 PCR 方法检测经过 37°C 振荡培养 18 h 的 10 份人工接种样品和 608 份实际样品, 结果表明目标菌在 SVV 中增殖 18 h 后菌量达到检测限以上, SVV 联合荧光 PCR 检测方法的检出率为 4.06%, 比传统检测方法(3.78%)高, 无假阴性和假阳性。SVV 可望应用于水产品中沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌检测前的增菌处理, 可简化检测过程, 有效克服漏检, 提高检出率。

关键词: 选择性共增菌肉汤, SVV, 沙门氏菌, 副溶血弧菌, 霍乱弧菌

A multipathogen selective enrichment broth (SVV) for simultaneous growth of *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio cholerae*

Yiying Qin, Hui Wu, Xinglong Xiao, Yigang Yu, Dongmei Liu, Xiaofeng Li, and Yuqian Tang

College of Light Industry & Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

Abstract: We formulated a selective enrichment broth (SVV) for simultaneous growth of *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio cholerae* by single factor experiment and response surface method. We evaluated the enrichment effect of SVV by conventional culture method and real-time PCR assay. We obtained the SVV broth by supplementing the Buffered Peptone Water (BPW) with bile salt no. 3, potassium tellurite, and sodium citrate as inhibitors, and glucose, mannitol, anhydrous sodium sulfite and sodium pyruvate as accelerants. We also modified the concentration of sodium chloride in BPW. When mixed at equal or varied proportions, the target pathogens had a great accumulation ($10^5\sim 10^8$ CFU/mL) after incubated in SVV for 18 h at 37°C with shaking. It can also effectively inhibit the competitive microflora. We detected 10 artificial simulated samples and 608 real samples using SVV with real-time PCR. After enriched in SVV for 18 h, the quantity of the bacteria in samples were above the detection limit. The SVV with PCR assay showed higher tested positive (4.06%) compared to that of the conventional detection method (3.78%) and there was no false

Received: June 22, 2009; **Accepted:** August 20, 2009

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCEF06-0746), Cooperation Project between Guangdong Province and Honking (No. 2007A0209002), Manufacturing Studying & Researching Project of Guangdong Province (No. 2007B090400068).

Corresponding author: Xinglong Xiao. Tel: +86-13828797202; E-mail: redtreer@163.com

新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-06-0746), 粤港澳关键领域重点突破项目(No. 2007A0209002), 广东省教育部产学研结合项目(No. 2007B090400068)资助。

report. In summary, SVV is a promising new multiplex selective enrichment broth that can be used in detection of seafood.

Keywords: multipathogen selective enrichment broth, SVV, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*

食源性致病菌的频繁爆发是食品安全的主要问题,是世界范围内严重的公共安全问题^[1]。沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌经常污染水产品^[2],引起严重的食源性疾病。欧盟规定,沙门氏菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌是进出口水产品中鱼类、头足类、蟹肉(包括罐头)安全卫生必检项目。快速准确地检测这3种致病菌对保证食品安全,及时有效地控制疾病传播、预防食物中毒具有重要作用。

传统检测方法费时费力,不能满足当今食品快速流通的需要。而且细菌在食品加工或保藏过程中由于环境的各种压力或者营养缺失可能进入生存但不可培养(VCNB)状态,用传统方法检测该细菌可能会漏检^[3]。同一平台同时检测多种致病菌成为当今的研究趋势^[4],多重PCR、基因芯片和蛋白质芯片等快速检测方法的建立大大简化了检测过程。

传统的检测方法和各种快速检测方法都需要先对目标菌进行富集培养^[5]。有研究指出,通常使用的两步增菌与一步增菌法的效果并没有显著差别^[6-7]。一步增菌法可以同时富集多种目标菌达到检测限要求,简化了各种检测方法,是快速检测技术的一个重要方面,对实现共检具有重要的意义。目前,国内外增菌技术的研究包括沙门氏菌和志贺氏菌共增技术^[8]、沙门氏菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的共增技术^[9]、沙门氏菌、大肠杆菌及单增李斯特菌的共增技术(SEL)^[10]以及广谱增菌肉汤(UPB)等,并没有关于同时富集沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌的共增菌培养基的报道。根据伯杰氏系统细菌学手册,沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌都是革兰氏阴性兼性厌氧菌,三菌在分类学上十分相似,而且这3种细菌具有相似的生化特性——都可以利用葡萄糖、柠檬酸和甘露醇作为碳源,并能够在相同的培养条件下迅速生长。因此,本研究旨在研发出一种能够在37°C和中性条件下同时富集3种目标菌的共增菌培养基,为各种快速检测方法提供支撑。

1 材料

1.1 菌株

伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* TypHimurium ATCC14028)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC33847)和O1群霍乱弧菌(*Vibrio cholerae* ATCC51352)是试验的标准菌株,其他相似菌株或者常见的食源性致病菌包括出血性大肠杆菌(*Escherichia coli* O157:H7 ADCPC 931)、假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC 41002)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* CCTCC AB92023)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica* ATCC 23715)、变性杆菌(*Proteus vulgaris* CMCC 49101)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus* ATCC27562)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus* ATCC17749)、志贺氏菌(*Shigella dysenteriae* SZCIQ 4376)。所有菌株由深圳太太药业基因诊断部惠赠。菌株接种营养琼脂斜面,37°C培养24 h,转接3次后保存在4°C下备用。斜面每个月复活1次。

1.2 化学试剂和培养基

缓冲蛋白胨水(BPW),氯化镁孔雀绿肉汤(RV),沙门氏菌属、志贺氏菌属琼脂培养基(SS),氯化钠多粘菌素肉汤(SPB)和硫代硫酸钠、柠檬酸钠、胆盐、蔗糖琼脂(TCBS)以及3号胆盐、十二烷基硫酸钠、亚碲酸钾和多粘菌素B购自广东环凯微生物科技有限公司。葡萄糖、甘露醇、无水亚硫酸钠、柠檬酸钠、氯化钠、丙酮酸钠购自青岛海博生物技术有限公司。

1.3 生化试剂

Taq DNA聚合酶、10×PCR缓冲液,购自北京鼎国公司;dNTP购自美国Genview公司;细菌基因组DNA抽提试剂盒、DNA marker DL2000,购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa);琼脂糖购自广东环凯微生物科技有限公司;溴化乙锭(EB)、SDS购自Sigma公司。

1.4 主要仪器

BiopHotometer 分光光度计, 购自 Eppendorf 公司; 菌落计数器、生物安全柜、恒温气浴摇床、生化培养箱、ABI7500 荧光 PCR 仪, 购自美国 ABI 公司。

2 方法

2.1 共增培养基的研制

2.1.1 出发培养基的选择

选择一种成分简单的非选择性肉汤作为出发培养基。常用的非选择性增菌肉汤包括营养肉汤、胰蛋白胍水和缓冲蛋白胍水(BPW)。其中, BPW 的强缓冲能力能够防止由于微生物大量生长导致的培养基

pH 值下降, 而且成分简单易于研究。因此, 采用 BPW 作为出发培养基。

2.1.2 添加剂单因素试验

考察的添加剂种类及用量见表 1, 单因素试验在 BPW 中进行。挑取 1 环各目标菌的斜面培养物分别悬浮于 10 mL 生理盐水, 充分混匀后进行梯度稀释, 用血球计数板计数确定各梯度的细菌浓度。分别将约 10^2 CFU/mL 的目标菌接种至含有不同添加成分的 BPW 中, 以不含添加成分的 BPW 作为空白对照。接种培养基在 37°C 下 150 r/min 振荡培养 24 h 后根据菌液浓度适当稀释, 然后测量其光密度 OD_{540} 。该试验重复 3 次, 每次重复做 2 个平行样品。计算 OD_{540} 的平均值代表各菌的生长情况。

表 1 不同抑制剂及促进剂对 3 种目标菌生长的影响

Table 1 Impact of additives on the growth of the three target pathogens

Additives		Concentration	Sa (%) ^a	Vp (%)	Vc (%)
Inhibitors	Bile salt No. 3 (g/L)	5.00	32.60	67.62	58.14
		2.50	15.94	24.62	26.23
		1.25	13.71	21.06	21.62
	Sodium citrate (g/L)	10	-0.93	-1.62	-3.06
		5	0	-1.41	-2.89
	Sodium dodecyl sulfate (g/L)	2	69.85	100	100
		1	69.33	100	100
		0.5	67.78	100	100
	Potassium tellurite (mg/L)	2.5	65.82	30.96	7.08
		1.25	49.42	29.54	9.46
		0.625	44.38	55.52	57.43
	Polymyxin B (U/mL)	250.0	100	27.52	38.54
		125.0	100	20.04	30.10
		62.5	100	9.15	16.88
	Sodium chloride (g/L)	35	13.68	47.65	100
25		3.61	9.75	29.95	
15		0.79	30.69	8.13	
Accelerants	Glucose (g/L)	5.00	-4.26	-50.39	-42.12
		2.50	-4.15	-42.23	-30.41
		1.25	-4.02	-38.45	-24.65
	Mannitol (g/L)	5.00	-20.15	-25.28	-26.07
		2.50	-15.32	-14.31	-13.28
		1.25	-13.09	-10.20	-12.42
	Anhydrous sodium sulfite (g/L)	5.00	5.12	4.27	-4.25
		2.50	4.87	3.54	-3.17
		1.25	1.32	0.95	-2.98
	Sodium pyruvate (g/L)	0.100	-3.06	-1.45	-1.20
		0.050	-2.85	-0.52	0
		0.025	-1.03	0	0

^a The percent means inhibition to *Salmonella* (Sa), *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) and *Vibrio cholerae* (Vc)=100-(growth in basal medium added the additives compared to growth in basal medium)×100; 0 means no obvious influence; positive result means the additives had inhibitory effect on the pathogens; negative result means the additives had acceleratory effect on the pathogens; growth of the target pathogens in basal medium with or without additives are mean values of OD_{540} .

2.1.3 共增菌培养基的响应面分析优化

单因素实验结果表明,除了柠檬酸钠外,抑制剂对目标菌的生长具有较大的抑制作用,为保证目标菌快速地复活和生长,向培养基加入促进剂并用响应面法优化氯化钠、亚碲酸钾和3号胆盐的用量。优化试验在含有促进剂的BPW中进行,促进剂的用量由单因素实验确定。按照响应面法中的中心组合旋转设计(表2)配制各培养基,加入 10^2 CFU/mL各目标菌,37°C下150 r/min振荡培养24 h后涂板至RV和TCBS上,37°C下培养24~48 h后计数。

2.2 SVV 增菌效果研究

根据单因素试验和响应面试验确定的各添加剂用量将SVV各组分(亚碲酸钾除外)加入到100 mL蒸馏水中,加热搅拌至完全溶解后121°C高压灭菌15 min。灭菌的培养基在室温下保存,1 mg/L亚碲酸钾溶液在使用前以无菌操作加入。

2.2.1 多重实时荧光PCR

本研究针对沙门氏菌的*invA*基因^[11]、副溶血弧菌的*toxR*基因^[12]和霍乱弧菌的*hlyA*基因^[13]设计了3对引物和探针(表3),建立了目标菌的多重荧光PCR检测方法,以检验SVV是否能有效地同时富集3种目标菌达到PCR的检测限,可用于一平台检测多种微生物检测方法的增菌处理。使用基因提取工具包(DNeasy Tissue kit, Catalog # 69506, Qiagen, Valencia, Calif)提取各目标菌的基因。荧光定量PCR的总反应体系如下:目标菌DNA模板各2 μL,3 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,引物各1 μL,5 pmol/L探针各0.5 μL,10×PCR缓冲液0.25 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,5 U/μL *Taq* DNA聚合酶0.5 μL,加DEPC水补足至25 μL。PCR反应条件为:95°C预变性4 min;95°C变性10 s,60°C退火45 s(收集3种荧光信号),72°C延伸30 s,扩增40个循环。

表2 中心旋转设计及实验结果

Table 2 Central composite design matrix and experimental results of *Sa*, *Vp*, *Vc* counts

Run	Factors			Responses		
	A: NaCl (g/L)	B: potassium tellurite (mg/L)	C: Bile salt no.3 (g/L)	<i>Sa</i> (CFU/mL)	<i>Vp</i> (CFU/mL)	<i>Vc</i> (CFU/mL)
1	20.00	1.05	2.50	8.798	8.832	7.823
2	20.00	0.71	2.50	9.145	5.546	5.161
3	20.00	1.05	2.50	8.592	8.742	7.769
4	25.00	1.25	2.00	9.787	8.703	6.824
5	20.00	1.05	2.50	8.801	8.785	7.601
6	20.00	1.05	2.50	8.797	8.676	7.854
7	15.00	0.85	2.00	9.666	6.611	6.783
8	20.00	1.05	1.66	9.238	8.446	8.234
9	11.59	1.05	2.50	9.152	5.262	8.001
10	20.00	1.05	3.34	8.665	6.753	6.449
11	15.00	0.85	3.00	9.272	5.647	6.809
12	20.00	1.39	2.50	8.606	7.482	6.979
13	25.00	1.25	3.00	8.031	7.239	5.726
14	20.00	1.05	2.50	8.786	8.754	7.881
15	15.00	1.25	2.00	9.091	7.209	8.606
16	25.00	0.85	3.00	8.323	5.741	5.477
17	20.00	1.05	2.50	8.794	8.227	7.627
18	25.00	0.85	2.00	8.887	7.339	6.175
19	15.00	1.25	3.00	8.703	5.745	7.828
20	28.41	1.05	2.50	8.039	5.926	5.293

表 3 荧光 PCR 中的引物与探针的序列与特征

Table 3 Nucleotide sequences of the primers and probes for FQ-PCR

Target		Sequence (5'-3')	T_m (°C)	Size (bp)
<i>S. enteritidis</i>	fw	TTATCGAGATCGCCAATCAGTC	57.7	22
	rv	TCCGTGAAGCAAAACGTAGC	58.1	20
	rb	FAM-AATACTGAGCGGCTGCTCGCCTTT-BHQ1	67.0	24
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	fw	GCGACCTTTCTCTGAAATATTAATTGT	61.6	27
	rv	CATTCGCGTGGCAAACATC	60.4	19
	rb	VIC-CGCACAAGGCTCGACGGCTGA-BHQ1	71.1	21
<i>Vibrio cholerae</i>	fw	GCTTTATTGTTTCGATGCGTTAAAC	58.0	24
	rv	GATGCCAAAATTGTGCGTATCA	59.4	22
	rb	CY5-TCTTGGGCAATCGCATGGGTTGA-BHQ2	69.2	23

* fw: forward primer; rv: reverse primer; pb: probe.

2.2.2 SVV 单独增菌效果研究

将 10^4 CFU/mL 和 10^3 CFU/mL 的各目标菌分别接种到 100 mL SVV 肉汤中, 在 37°C 下振荡培养 24 h。接种培养物在第 4、8、12、15、18、21、24 h 用涂布平板法计数。同时, 目标菌在各自的选择性增菌液(沙门氏菌: RV, 副溶血弧菌和霍乱弧菌: SPB) 中的生长情况用同样的方法检测。该实验重复 3 次, 每次做 2 个平行样品。计算各菌的菌落平均数代表其各自的生长情况。

2.2.3 SVV 的复合增菌效果研究

在试验 I, 沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌以相同的浓度(10^2 CFU/mL)接种至 100 mL SVV; 在试验 II~IV, 3 种目标菌以不同的浓度比例 1:10:1000 ($1\sim 10$ CFU/mL, 100 ± 10 CFU/mL, 1000 ± 100 CFU/mL)、10: 1000: 1、1000: 1: 10 接种至 100 mL SVV。接种培养基在 37°C 下振荡培养 24 h, 在培养第 4、8、12、15、18、21、24 h 用涂布平板法计数。同时, 接种培养基培养 18 h 后进行荧光 PCR 检测。该实验重复 3 次, 每次做 2 个平行样品。计算各菌的菌落平均数代表其各自的生长情况。

2.2.4 SVV 的选择性研究

将 10^4 CFU/mL 非目标菌分别接种至 100 mL SVV 肉汤和 BPW 中, 在 37°C 下振荡培养 24 h, 在培养第 12、16、20、24 h 测各培养物的 OD_{540} 。该试验重复 3 次, 每次做 2 个平行样品。计算 OD_{540} 的平均值代表各菌的生长情况。

2.2.5 竞争菌丛对 SVV 共增效果影响研究

将 10^2 CFU/mL 各目标菌以及在 SVV 中有一定

生长的 10^4 CFU/mL 非目标菌(包括耶尔森氏菌、变形杆菌、志贺氏菌、创伤弧菌和溶藻弧菌)接种于 100 mL SVV 肉汤, 不含有非目标菌的 SVV 肉汤作为阴性对照。接种培养基在 37°C 下振荡培养 24 h, 各目标菌在培养第 12、16、20、24 h 用涂布平板法计数, 判断目标菌生长受影响情况。该实验重复 3 次, 每次做 2 个平行样品。计算各菌的菌落平均数代表其各自的生长情况。

2.3 SVV 应用于人工接种样品增菌处理

将 25 g 鱼肉样品(购自本地超市并根据 GB/T 4789.4-2008、GB/T 4789.7-2008 和 SN/T 1022-2001 检验证明样品不含有目标菌)切碎并加入到灭菌袋中, 然后向样品加入 10^3 CFU/g 的各目标菌, 混匀, 室温下处理 2 min 使菌液均匀吸收后加入 225 mL SVV 肉汤并混匀。所有的操作均在无菌条件下完成。接种样品在 37°C 下振荡培养 24 h, 各目标菌在培养第 4、8、12、15、18、21、24 h 用涂布平板法计数。同时, 接种的培养基培养 18 h 进行实时荧光 PCR 检测。

2.4 SVV 应用于实际样品增菌处理

从 2008 年 6 月到 2009 年 3 月收集海鱼, 虾和贝壳类软体动物样品 608 份, 收集到的海产样品保藏在 -20°C 直至使用。25 g 各样品(海鱼和虾子的内脏, 以及软体动物的腮和内脏)用 225 mL SVV 在 37°C 下振荡培养 18 h 后用实时荧光 PCR 方法检测。同时, 样品根据 GB/T 4789.4-2008、GB/T 4789.7-2008 和 SN/T 1022-2001 对 3 种目标菌进行检测。

3 结果

3.1 添加剂单因素试验

3.1.1 抑制剂

抑制剂敏感性试验结果见表 1。结果显示十二烷基硫酸钠存在时副溶血弧菌和霍乱弧菌不生长,多粘菌素 B 存在时沙门氏菌不生长,这两种物质不适合作为 SVV 的抑制剂。柠檬酸钠对目标菌生长的影响不大,所以不对柠檬酸钠进行优化分析,确定柠檬酸钠使用浓度为 5 g/L。5 g/L 胆盐强烈抑制 3 种目标菌特别是副溶血弧菌和霍乱弧菌的生长,2.5 g/L 与 1.25 g/L 胆盐对目标菌的抑制作用大大降低,这两个浓度的胆盐对目标菌的抑制作用相似。对于沙门氏菌,2.5 mg/L 亚碲酸钾具有较强的抑制作用,1.25 mg/L 和 0.625 mg/L 亚碲酸钾的抑制作用有所降低,抑制作用相似。对于副溶血弧菌和霍乱弧菌,0.625 mg/L 亚碲酸钾抑制作用最强,2.5 mg/L 和 1.25 mg/L 抑制作用相似。有报道指出本实验的 3 种目标菌对胆盐和亚碲酸钾有耐性^[14-15],而且这两种物质经常作为抑制剂添加到目标菌的选择性培养基中,但是试验结果表明胆盐和亚碲酸钾对目标菌的生长具有较强的抑制作用,这可能是由于单因素试验以 4°C 下保藏的斜面菌种作为接种物检验各种抑制剂的作用,而冷损伤菌对胆盐和亚碲酸钾等化学物质更加敏感^[16-17]。副溶血弧菌和霍乱弧菌为嗜盐的海洋菌群,2%~3% NaCl 最适合弧菌生长^[18-19]。但是实验表明,提高 BPW 中的 NaCl 浓度对 3 种目标菌均有不同程度的抑制作用。对沙门氏菌和霍乱弧菌来说,NaCl 浓度越高,抑制作用越强。而 2% NaCl 对副溶血弧菌的抑制作用最小。细菌的耐盐性是因为甘氨酸甜菜碱、四氢嘧啶、脯氨酸、谷氨酸盐和海藻糖等相容性溶质的积累^[20],4°C 下保藏的斜面菌种可能由于冷损伤而丧失部分或者全部积累这些相容性溶质的能力,因此对高盐条件敏感。为使 3 种菌有较一致的生长速度并能很好地抑制杂菌,选择 3~2 g/L 3 号胆盐,1.25~0.85 mg/mL 亚碲酸钾,25~15 g/L NaCl 进行响应面分析优化。

3.1.2 促进剂

抑制剂影响目标菌的生长,为保障目标菌的复活和快速生长必须添加适量的促进剂。单因素试验

结果显示葡萄糖极大地促进副溶血弧菌和霍乱弧菌的生长,对沙门氏菌的促进作用较小。甘露醇对 3 种目标菌均具有较强的促进作用。无水硫酸钠对霍乱弧菌的生长具有一定的促进作用,但是却稍微抑制沙门氏菌和副溶血弧菌。丙酮酸钠稍微促进沙门氏菌的生长,对副溶血弧菌和霍乱弧菌的促进作用不明显。促进作用随着促进剂浓度的提高而增强。考虑到促进剂对非目标菌也有促进作用,促进剂采用较低浓度。为使目标菌能够均匀生长,最后确定各促进剂使用浓度为:葡萄糖 1.25 g/L、甘露醇 1.25 g/L、无水亚硫酸钠 1.25 g/L 以及丙酮酸钠 0.05 g/L。

3.2 SVV 肉汤配方响应面分析优化

采用响应面法中的中心组合旋转设计对氯化钠、亚碲酸钾和 3 号胆盐的最佳水平及其变化范围进行研究,实验由 Design Expert 软件设计,选取 6 个中心点重复,实验共 20 组,中心旋转实验结果见表 2。利用 Design Expert 软件进行实验数据分析,建立以沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌的生长量为响应值,氯化钠、亚碲酸钾和 3 号胆盐为自变量的二次多项式数学模型:

$$S_a = 8.76 - 0.34A - 0.18B - 0.22C + 0.094AB - 0.067AC - 0.023BC - 0.051A^2 + 0.048B^2 + 0.075C^2 \quad (1)$$

$$V_p = 8.66 + 0.36A + 0.50B - 0.61C + 0.27AB - 0.079AC - 0.046BC - 1.02A^2 - 0.69B^2 - 0.31C^2 \quad (2)$$

$$V_c = 7.75 - 0.76A + 0.50B - 0.41C - 0.24AB - 0.13AC - 0.15BC - 0.36A^2 - 0.56B^2 - 0.11C^2 \quad (3)$$

对式(1)-(3)进行方差分析(表 4),结果表明 3 个模型的概率在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著,沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌生长量的实验值与预测值之间具有很好的拟合度,3 个模型的 R^2 分别为 0.9750、0.9663 和 0.9827,证明模型具有一定的实际指导意义。响应面分析立体图和等高线图表示各交互因素的最佳作用点没有全部落在试验范围之内,这是因为低浓度抑制剂对杂菌的抑制作用大大减弱,根据单因素实验的结果对各因素的研究范围作了限制以保证一定的选择性。NaCl、亚碲酸钾和 3 号胆盐的最佳水平分别为 20 g/L、1.05 mg/L 和 2.5 g/L(为方便称取,亚碲酸钾取 1.0 mg/L),在该水平组合下沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌分别为 8.7602 CFU/mL、8.6584 CFU/mL 和 7.7541 CFU/mL。

表 4 方差分析表

Table 4 Variance analysis of regression equation

Sources	Prob > F			Significance
	Sa	Vp	Vc	
Model	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
NaCl	<0.0001	0.0023	<0.0001	Significant
Potassium tellurite	<0.0001	0.0004	<0.0001	
Bile salt no.3	<0.0001	0.0002	<0.0001	
Lack of Fit	0.4323	0.1035	0.0752	Not significant

3.3 SVV 增菌效果分析

3.3.1 SVV 的单独增菌效果分析

如图 1 所示, 浓度为 10 CFU/mL 和 1000 CFU/mL 的目标菌均能够在 SVV 中得到很好的富集。沙门氏菌在 RV 肉汤中的生长滞后期较短, 沙门氏菌在 RV 和 SVV 中的生长滞后期分别为 4 h 和 8 h, 但是沙门氏菌在 SVV 中的指数生长率较高, 最大生长浓度与 RV 相似, 达到 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL。副溶血弧菌和霍乱弧菌在 SVV 肉汤中的生长情况与 SPB 相当, 它们的滞后期、指数生长率以及最大生长浓度相似, 37 °C 下培养 24 h 后, 副溶血弧菌菌浓度达到 10^8 CFU/mL, 霍乱弧菌达到 10^7 CFU/mL。

3.3.2 SVV 的复合增菌效果分析

如图 2 所示, 相同浓度或者不同浓度比例的 3 种目标菌在 SVV 中能够得到很好的富集。当目标菌以相同浓度接种到 SVV 中进行富集培养时, 副溶血弧菌的滞后期最短, 沙门氏菌的指数生长率和最大细菌浓度最大, 而霍乱弧菌的指数生长率和最大细菌浓度最小。经过 24 h 培养, 3 菌菌量达到 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL。当 3 种目标菌以不同的浓度比例接种到 SVV 中进行富集培养时, 各目标菌的生长曲线与单独生长时相

似, 只是对数生长率和最大生长浓度有所降低。特别地, 当霍乱弧菌以 <10 CFU/mL 的低浓度接种到 SVV 中时, 对数生长率和最大生长浓度比单独生长时大大降低, 其最大细菌浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL。但是, 培养 18 h 后, 各目标菌的菌浓度均达到现代检测技术的检测限以上。

3.3.3 SVV 的选择性分析

将非目标菌接种培养至 SVV 以及 BPW 中以比较研究 SVV 的选择性。结果显示, 所有的非目标菌在 BPW 中均能迅速生长, OD_{540} 达到 1.400 以上。大肠杆菌、假单胞菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌在 SVV 中完全不生长, 耶尔森氏菌、变形杆菌、创伤弧菌和溶藻弧菌生长受到强抑制作用, 培养 24 h 后 OD_{540} 分别为 0.590、0.223、0.185 和 0.683。在所有非目标菌中, 只有志贺氏菌在 SVV 中能够得到很好的富集培养, OD_{540} 达到 1.397。这是因为志贺氏菌具有亚硝酸盐耐性^[16]以及 SVV 中的营养成分和促进剂能够缓解胆盐对冷损伤的志贺氏菌的抑制作用^[17]。但是与在 BPW 的生长情况比较, 志贺氏菌在 SVV 中的生长滞后期较长, 最大生长浓度较低。总而言之, SVV 对所有的非目标菌均有不同程

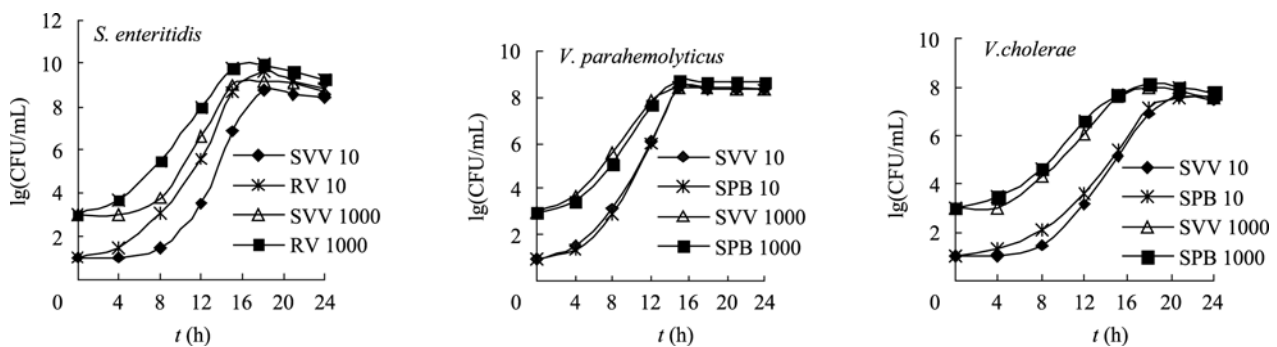


图 1 SVV 肉汤单独增菌效果

Fig. 1 Individual growth of three target pathogens in SVV.

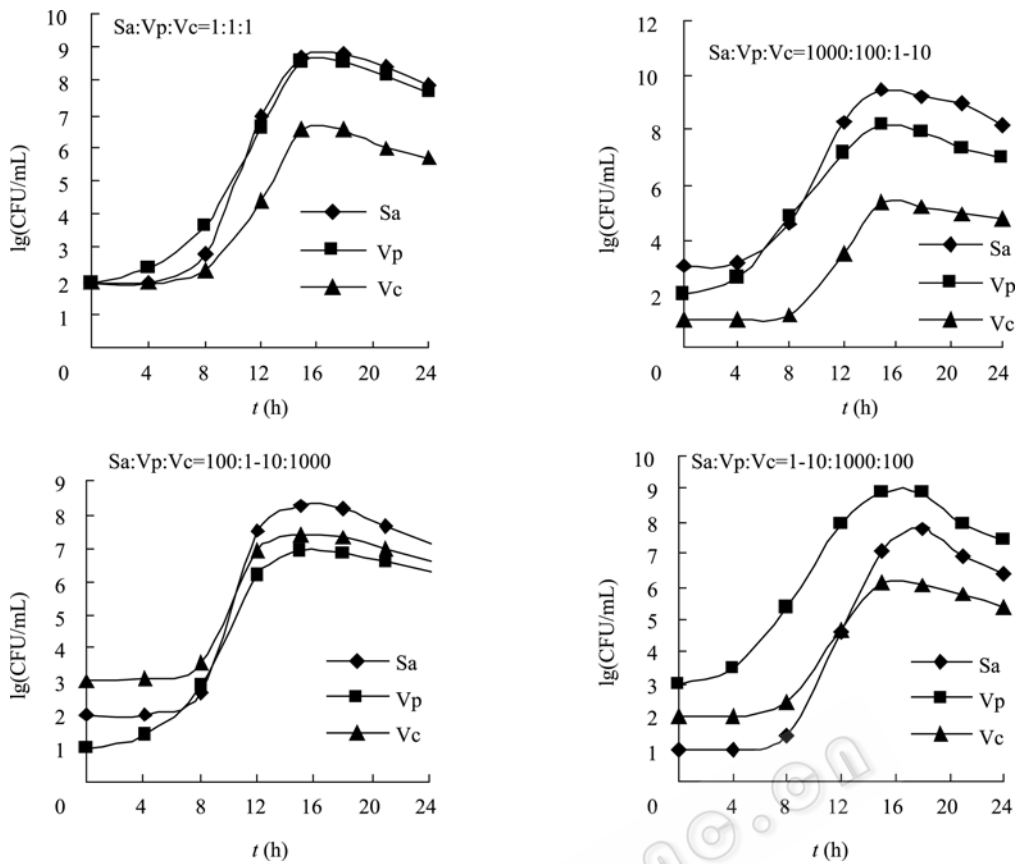


图2 SSL肉汤复合增菌效果
Fig. 2 Simultaneous growth of three target pathogens in SVV.

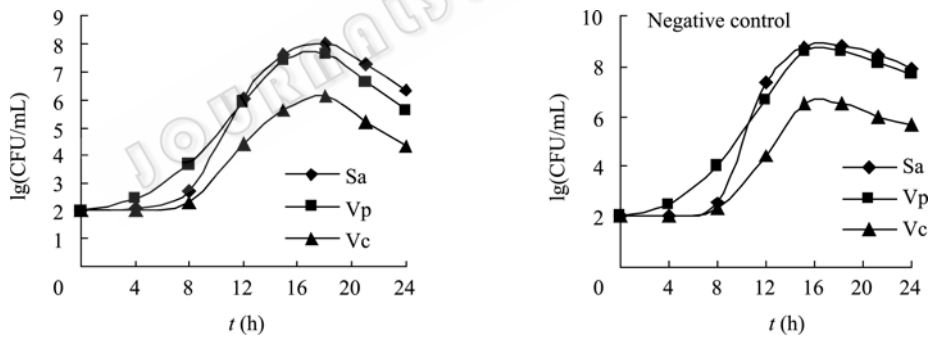


图3 竞争菌丛存在时目标菌在SVV中的生长状况
Fig. 3 Growth of three target pathogens in SVV when competitive flora exist.

度的抑制作用，而且除了志贺氏菌，所有杂菌的生长速度远远低于目标菌。

3.3.4 竞争菌丛对SVV共增效果影响分析

如图3所示，3种目标菌在竞争菌丛存在时与阴性对照相比，它们的滞后期相似，但是对数生长率较低，最大生长浓度也较阴性对照低 10^2 CFU/mL，其中生长情况最差的霍乱弧菌的最大生长浓度达到 10^6 CFU/mL。培养15 h后，阴性对照菌株进入稳定期，而有竞争菌群存在时目标菌，

特别是副溶血弧菌和霍乱弧菌的菌浓度逐渐降低。尽管目标菌在竞争菌丛存在时的生长情况较阴性对照差，培养18 h后，目标菌荧光PCR检测均为阳性。

3.4 SVV应用于人工接种样品

接种量为 10^2 CFU/mL的各项目标菌培养24 h后，菌浓度可达到 $10^8 \sim 10^{10}$ CFU/mL，生长曲线见图4。接种样品培养18 h后进行FQ-PCR检测，检测结果为阳性，检测结果见图5。

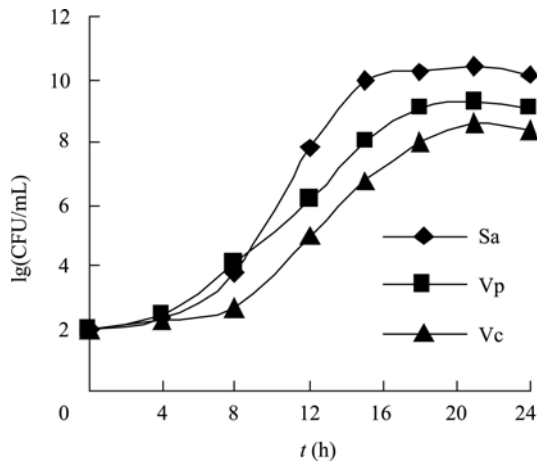


图 4 目标菌在人工污染样品的生长情况
Fig. 4 Growth of target pathogens in artificially contaminated sample 3.

3.5 SVV 应用于实际样品

用 SVV 对 608 份实际样品增菌处理 18 h 后进

行荧光 PCR 检测, 将结果与传统的检测方法比较。有 3 份样品国标法判定为阴性而 PCR 检测为阳性, 将这 3 份样品的扩增序列克隆至 pUC-19 T 质粒, 经测序验证荧光 PCR 判断正确, 即用 SVV 联合荧光 PCR 检测方法的检出率较传统的方法高, 能有效克服漏检。

4 讨论

在国内外的共增菌技术中, 除了 SEL 肉汤具有一定的选择性外, 其他培养基包括广泛使用的预增菌肉汤(UPB)均属于无选择性增菌培养基, 不能满足背景微生物多时对特定目标菌进行增菌的要求。

本研究通过向出发培养基 BPW 中联合添加抑制剂柠檬酸钠、亚硝酸钾和 3 号胆盐, 并提高 BPW

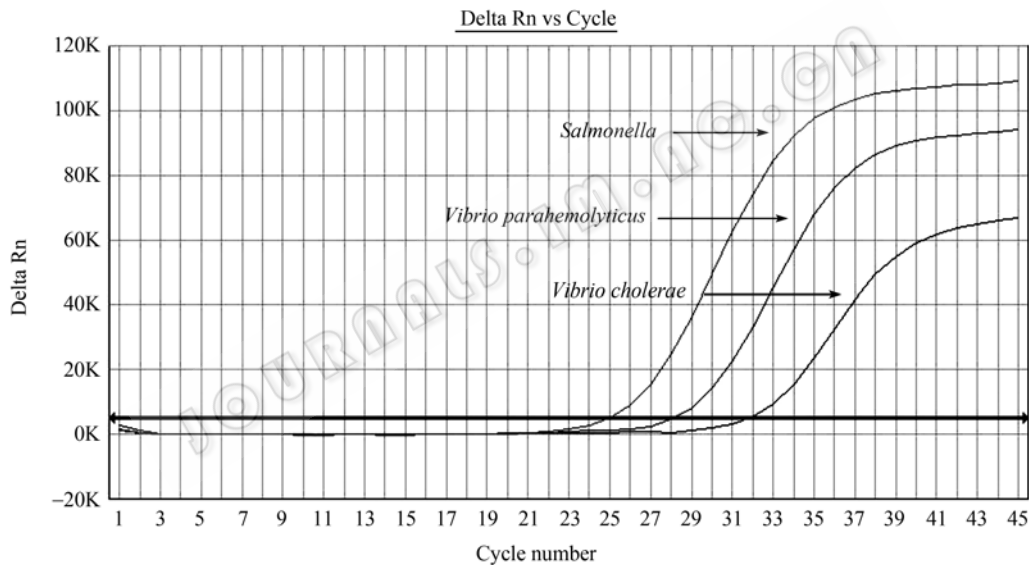


图 5 人工污染样品种目标菌的荧光 PCR 扩增曲线
Fig. 5 FQ-PCR assay with artificially contaminated sample.

表 5 SVV 联合 FQ-PCR 检测法和国标法检测实际样品

Table 5 Detection of naturally contaminated samples by SVV with FQ-PCR and conventional culture method

Samples (Number)	Sa(PCR/culture)			Vp(PCR/culture)			Vc(PCR/culture)		
	+/+	+/-	-/+	+/+	+/-	-/+	+/+	+/-	-/+
Sea fish(216)	28	0	0	6	2	0	4	2	0
Shrimp(250)	12	0	0	2	0	0	2	1	0
bivalve mollusk(142)	10	0	0	3	0	0	2	0	0
Total (608)	50	0	0	11	2	0	8	3	0
Positive rate %(PCR/culture)	8.22/8.22			2.14/1.81			1.81/1.32		

* Conventional culture methods were strictly performed according to GB/T 4789.4-2008, GB/T 4789.7-2008 and SN/T 1022-2001 issued by the Health Ministry and General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China as standard detection methods for Sa, Vp, Vc respectively. +/+ : positive PCR result and positive conventional culture result; +/- : positive PCR result and negative conventional culture result; -/+ : negative PCR result and positive conventional culture result; -/- : negative PCR result and negative conventional culture result.

中氯化钠浓度到2%以抑制背景微生物的生长。此外,添加葡萄糖、甘露醇、无水亚硫酸钠以及丙酮酸钠作为促生长因子,促进目标菌的复活和快速生长。对9种非目标菌进行SVV肉汤选择性试验,结果表明,大部分的非目标菌受到强烈抑制,仅志贺氏菌能较好生长,其对目标菌的生长无明显的影响。

SVV效果研究结果表明,接种浓度为10 CFU/mL和1000 CFU/mL的3种目标菌均能在SVV中很好地生长,沙门氏菌在SVV中生长滞后期较长;这是因为4°C下保藏的斜面菌种由于冷损伤需要更长的时间恢复活性。SVV同样能促进以不同浓度比例混合培养的3种目标菌良好生长;当低浓度霍乱弧菌(小于10 CFU/mL)与高浓度的沙门氏菌和副溶血弧菌在SVV中混合培养时,霍乱弧菌的最大细菌浓度较低,这是因为高浓度菌体迅速生长成为优势菌体,抑制霍乱弧菌的生长;但是,霍乱弧菌的最大生长浓度达到了 10^6 CFU/mL,远超过PCR检测限 10^3 CFU/mL^[21-23]。用SVV-PCR检测法检测10份人工接种样品和608份自然样品,目标菌在SVV中培养18 h后菌量达到检测限以上,10份人工接种样品均显示为PCR检测阳性,而且SVV-PCR方法检测的检出率较传统方法高。

综上,本研究建立的共增菌培养基能有效地抑制大部分竞争菌群,经过一步增菌即可富集沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌达到检测限以上。SVV-PCR检测方法成功地应用于实际样品检测,能有效地提高检出率,克服漏检。SVV增菌肉汤可望应用于进出口水产品中沙门氏菌、副溶血弧菌和霍乱弧菌的检验检疫以及水产品 and 环境卫生监测,能有效地简化各种检测方法。

REFERENCES

- [1] Huang YR, Hsieh HS, Lin SY, *et al.* Application of electrolyzed oxidizing water on the reduction of bacterial contamination for seafood. *Food Control*, 2006, **17**(12): 987-993.
- [2] Fleming LE, Broad K, Clement A, *et al.* Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment. *Mar Pollut Bull*, 2006, **53**(10/12): 545-560.
- [3] Eiler A, Bertilsson S. Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*, 2006, **67**(2): 339-348.
- [4] Omiccioli E, Amagliani G, Brandi G, *et al.* A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiol*, 2009, **26**(6): 615-622.
- [5] Bhagwat AA. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int J Food Microbiol*, 2003, **84**(2): 217-224.
- [6] Taylor WI, Silliker JH. Isolation of *Salmonellae* from foods samples IV. Comparison of methods of enrichment. *Appl Environ Microbiol*, 1961, **9**(6): 484-486.
- [7] Blanco-Abad V, Ansedo-Bermejo J, Rodriguez-Castro A, *et al.* Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples. *Int J Food Microbiol*, 2009, **129**(3): 229-236.
- [8] Yu CE. Universal preenrichment broth for growth of *Salmonella* and *Shigella dysenteriae*. *J Prev Med Info*, 2006, **22**(3): 369-370.
俞彩娥. 沙门菌和志贺菌通用增菌液增菌效果实验观察. 预防医学情报杂志, 2006, **22**(3): 369-370.
- [9] Xu YP, Chen FS. Study on a pre-enrichment medium for the simultaneous recovery of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2007, **34**(2): 208-210.
许一平, 陈福生. 一种能同时富集沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的增菌培养基. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 208-210.
- [10] Kim, H, Bhunia AK. SEL, a selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(15): 4853-4866.
- [11] Salehi TZ, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. Detection of *InvA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *Int J Poultry Sci*, 2005, **4**(8): 557-559.
- [12] Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, *et al.* Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**(4): 1173-1177.
- [13] Kurazono H, Pal A, Bag PK, *et al.* Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin, accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in *Vibrio cholerae* of diverse origins. *Microb Pathog*, 1995, **18**(3): 231-235.
- [14] Pang H, Ye CY, Xu JG. Potassium tellurite resistance of some bacteria. *Dis Surveill*, 2007, **22**(5): 350-352.
庞慧, 叶长芸, 徐建国. 一些细菌的亚碲酸钾抗性. 疾病监测, 2007, **22**(5): 350-352.
- [15] Pumbwea L, Skilbecka CA, Nakanoa V, *et al.* Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. *Microb Pathog*, 2007, **42**(2/3): 78-87.
- [16] Song YH, Hu XJ. Study on the inhibitory effect of bile salt on the growth of cold stressed *E. coli*. *Chin J Health Lab*

- Technol*, 2006, **16**(2): 213–214.
宋悦红, 胡秀杰. 胆盐抑制冷冻保存大肠杆菌生长的研究. 中国卫生检验杂志, 2006, **16**(2): 213–214.
- [17] Taormina PJ, Rocelle M, Clavero S, *et al.* Comparison of selective agar media and enrichment broths for recovering heat-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *Food Microbiol*, 1998, **15**(6): 631–638.
- [18] Igbinsola EO, Okoh AI. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Res Microbiol*, 2008, **159**(7/8): 495–506.
- [19] Chun D, Chung JK, Seol SY. Enrichment of *Vibrio parahaemolyticus* in a simple medium. *Appl Microbiol*, 1974, **27**(6): 1124–1126.
- [20] Ikeuchi T, Ishida A, Tajiri M, *et al.* Induction of salt tolerance in *Bacillus subtilis* IFO 3025. *J Biosc Bioeng*, 2003, **96**: 184–186.
- [21] Croci L, Delibato E, Volpe G, *et al.* Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(3): 1393–1396.
- [22] Gubala AJ. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *J Microbiol Methods*, 2006, **65**(2): 278–293.
- [23] Kong RYC, Lee SKY, Law TWF, *et al.* Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Res*, 2002, **36**(11): 2802–2812.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

酶学 (第二版)

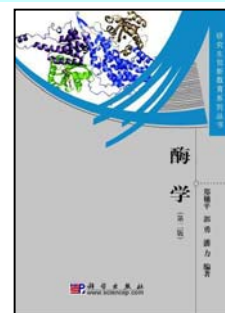
(研究生创新教育系列丛书)

郑穗平 郭勇 潘力 编著

978-7-03-025487-0 ¥49.00 2009年9月出版

酶学 (Enzymology) 是生物化学 (Biochemistry) 的分支学科。本书从“酶是具有生物催化功能的生物大分子, 根据其组成的不同可以分为蛋白类酶 (P 酶) 和核酸类酶 (R 酶) 两大类”的概念出发, 在酶的组成、结构、性质、功能、生物合成及其调节等方面阐明酶学的基本理论和基本知识。内容包括绪论、酶的结构与功能、酶的催化作用机制、酶反应动力学、酶的生物合成及调节机制和酶分子的定向进化, 共六章。

本书可供高等院校酶学、酶工程、生物工程、生物制药、生物化工、发酵工程、生物技术、食品科学与工程等相关专业的本科生和研究生使用, 也可供相关学科的教学工作者参考。



食品生物技术理论与实践

(应用生物技术大系丛书)

姜毓君 包怡 红李杰 主编 赵锋崔英俊 副主编

978-7-03-025627-0 ¥48.00 2009年9月出版

本书是一本介绍生物技术基本理论及其在食品科学中应用的专著。生物技术的迅猛发展已经对食品科学产生了极大的促进作用, 因此引起了科学界、产业界和消费者的极大兴趣和关注。本书在介绍生物技术基本理论的基础上, 较为全面地阐述了其在食品科学、食品工业生产以及食品安全检测中的应用, 并对有关食品生物技术引起的争议进行了客观的分析。全书共分九章, 包括: 食品生物技术导论, 食品生物技术的对象与方法, 基因克隆和重组蛋白生产, 植物生物技术及其在食品生产中的应用, 动物生物技术及其在食品生产中的应用, 发酵技术及其在食品生产中的应用, 工业化细胞培养及其在食品生产中的应用, 生物技术在食品安全检测中的应用, 伦理、安全和规范。全书内容深入浅出, 循序渐进, 语言叙述通俗易懂、简明流畅。

本书可以作为高等院校食品生物技术等相关专业的研究生和本科生的教材及参考用书, 食品行业的科研人员也可从本书中获得非常有益的知识。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文 (010-64000849) 周文字 (010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>