

副溶血性弧菌的鉴别培养基—— 胶铁粒子琼脂的制备与鉴别效果

王经邦 程孟珊 高金莲 范哲燕

凌乾丽 阎桂芳 江遇婵

(安徽省芜湖地区卫生防疫站)

近些年来,副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)在食品卫生检验和食物中毒的标本检验中已成为常见菌^[1,2],但目前用于副溶血性弧菌的分离培养基,仅有选择性而缺乏鉴别力。在弧菌较少或杂菌较多的情况下,很难识别弧菌。为了解决这个问题,经研究制备了一种鉴别力较高的培养基——“胶铁粒子琼脂”(简称),现将制备方法和鉴别效果,简述如下:

一、胶铁粒子琼脂的制备

(一) 成分(克)

牛肉膏 3、蛋白胨 10、氯化钠 5—30、柠檬酸钠 1.5、糊精 5、胆盐 2.5、柠檬酸铁铵 5、琼脂

20、蒸馏水 1000 毫升。

(二) 制法

将上述成分加热溶解于蒸馏水中,调 pH 7.8—8.2,分装烧瓶,高压灭菌 15—20 分钟,取出冷却至 45—50℃ 时,倾注平皿,备用。

二、胶铁粒子琼脂的鉴别效果

将副溶血性弧菌与肠系常见菌群(大肠艾希氏菌、伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、粪链球菌、粪产碱杆菌、产气气杆菌),分别接种在胶铁粒子琼脂上,于 37℃ 培养 18—24 小时,观察结果。各菌群在胶铁粒子琼脂上形成的菌落形态特征,见表 1 和图 1—7。

表 1 副溶血性弧菌与肠系常见菌群在胶铁粒子琼脂上的菌落形态

实 验 菌 株	菌落直径 (mm)	菌 落 形 态
副溶血性弧菌 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	2.5—3.0	扁平,透明,菌落中心有褐红色核
大肠艾希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>)	2.5—3.0	凸起,不透明,无褐红色核
伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhi</i>)	2.0—2.5	稍凸起,半透明,无褐红色核
痢疾志贺氏菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>)	1.5—2.0	稍凸起,透明,无褐红色核
粪链球菌 (<i>Streptococcus faecalis</i>)	1.0—1.5	凸起,不透明,无褐红色核
粪产碱杆菌 (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	3.0—3.5	扁平,边缘不齐,透明,无褐红色核
产气气杆菌 (<i>Aerobacter aerogenes</i>)	2.5—3.0	凸起,不透明,可呈橙黄色,无褐红色核

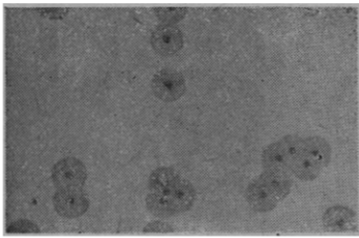


图1 副溶血性弧菌

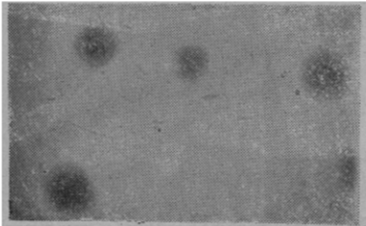


图2 大肠艾希氏菌

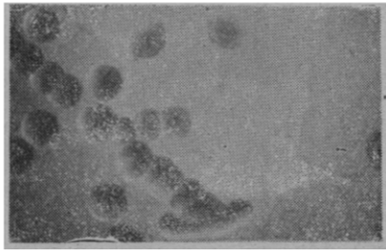


图3 伤寒沙门氏菌

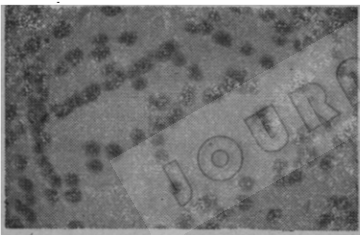


图4 痢疾志贺氏菌

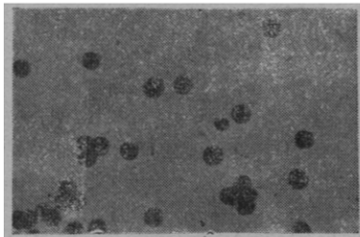


图5 粪链球菌

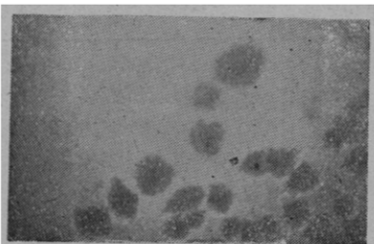


图6 美产碱杆菌

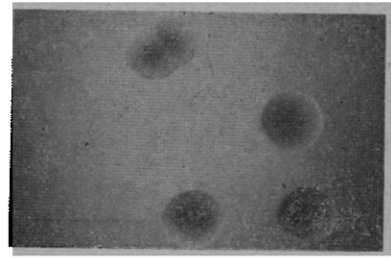


图7 产气气杆菌

据表1和图1—7,说明在胶铁粒子琼脂上副溶血性弧菌的菌落与肠系常见菌群的菌落有显著区别。副溶血性弧菌形成之菌落为扁平、透明、菌落中心有一个清晰的小圆形褐红色核;而肠系常见菌群的菌落中心均不能形成褐红色核。

三、胶铁粒子琼脂鉴别的敏感度

取正常人粪便标本15份,每份5克,分别混于生理盐水1000毫升,再各加入副溶血性弧菌菌悬液0.05毫升,混和后用滤纸片(直径7厘米)垂直蘸取,将蘸有混和液的滤纸贴于胶铁粒子琼脂上,放10分钟后揭去滤纸,再放37℃培养24小时,观察结果(见表2)。同时应用氯化钠蔗糖琼脂(氯化钠3%,蔗糖1%,含BTB指示

表2 副溶血性弧菌在两种培养基上出现可疑菌落数的比较

实验份数	胶铁粒子琼脂		氯化钠蔗糖琼脂	
	菌落总数	可疑菌落数	菌落总数	可疑菌落数
1	440	1	1100	9
2	480	1	380	4
3	840	2	1200	3
4	150	1	160	2
5	800	8	1600	16
6	300	1	420	3
7	340	2	240	3
8	1130	1	1050	6
9	480	3	256	2
10	850	3	500	5
11	930	2	480	5
12	830	3	1100	9
13	750	1	630	5
14	820	3	850	8
15	600	4	780	4
合计	9740	36	10746	84

$$\chi^2 = 1.922, \chi^2_{(1)0.05} = 3.841, P > 0.05.$$

剂)作对照,进行比较。

从表 2 结果看,在胶铁粒子琼脂上生长的菌落总数为 9740 个,其中可疑菌落有 36 个;在氯化钠蔗糖琼脂上生长的菌落总数为 10746 个,其中有可疑菌落 84 个。根据 $P > 0.05$,说明两种琼脂上所得可疑菌落数无显著差异。

四、胶铁粒子琼脂鉴别的准确性

将胶铁粒子琼脂与氯化钠蔗糖琼脂上的可疑菌落全部挑出,逐个进行生化特性及形态特征的鉴定(如发酵葡萄糖产酸不产气,不发酵乳糖,极生单鞭毛,有运动性,靛基质阳性等)和相应的血清凝集试验(即与用副溶血性弧菌免疫

家兔所得之诊断血清进行凝集试验)。

观察结果(见表 3)是:在 15 份胶铁粒子琼脂上挑选的 36 株可疑菌落中,有 34 株为副溶血性弧菌,阳性率达 94.4%;在 15 份氯化钠蔗糖琼脂上挑选的 84 株可疑菌落中,有 37 株确定为副溶血性弧菌,阳性率为 44.05%。据 $P < 0.001$,说明前者鉴别副溶血性弧菌的准确性高于后者。

五、胶铁粒子琼脂的反应机制

1. 在胶铁粒子琼脂上的副溶血性弧菌菌落中心能形成褐红色核,原因是它们以分解糊精取得能量;又以柠檬酸铁铵的柠檬酸基为碳源,使游离的铁离子在铵离子存在的碱性环境中,形成氢氧化铁 $[\text{Fe}(\text{OH})_3]$,而氢氧化铁又与副溶血性弧菌分解糊精所得之乙酸类(HAC)相结合,形成醋酸氧化铁 $[\text{FeOAC}]$ 。

另外,氢氧化铁的聚集体 $[\text{Fe}(\text{OH})_3]_m$ 能吸附醋酸氧化铁电离后的复合阳离子 $[\text{FeO}^+]$,而形成大分子的胶体粒子 $\{[\text{Fe}(\text{OH})_3]_m \cdot \text{XFeO}^+\}$,这种胶体粒子带有正电荷^[3,4],而副溶血性弧菌的菌落中心具有高能量的负电荷。因此,在菌落形成的过程中在生物电泳的作用下,将带有正电荷的氢氧化铁胶体粒子吸引到菌落中心形成一个褐红色核(见图 8)。故此培养基取名为“胶铁粒子琼脂”。

2. 肠系常见菌群的菌落中心,因不具备上述生化特征,故不能形成褐红色核,如大肠艾希氏菌不能分解糊精,不能利用柠檬酸盐。沙门氏菌和粪产碱杆菌等,虽大部分菌株能利用柠

表 3 比较两种琼脂上的可疑菌落中副溶血性弧菌确定数

实验份数	胶铁粒子琼脂		氯化钠蔗糖琼脂	
	可疑菌落数	确定菌数	可疑菌落数	确定菌数
1	1	1	9	2
2	1	1	4	2
3	2	2	3	1
4	1	1	2	1
5	8	7	16	11
6	1	1	3	1
7	2	2	3	1
8	1	1	6	3
9	3	3	2	0
10	3	3	5	3
11	2	2	5	2
12	3	2	9	5
13	1	1	5	1
14	3	3	8	3
15	4	4	4	1
合 计	36	34	84	37

$t = 7.605, t_{(14)0.001} = 4.140, P < 0.001.$

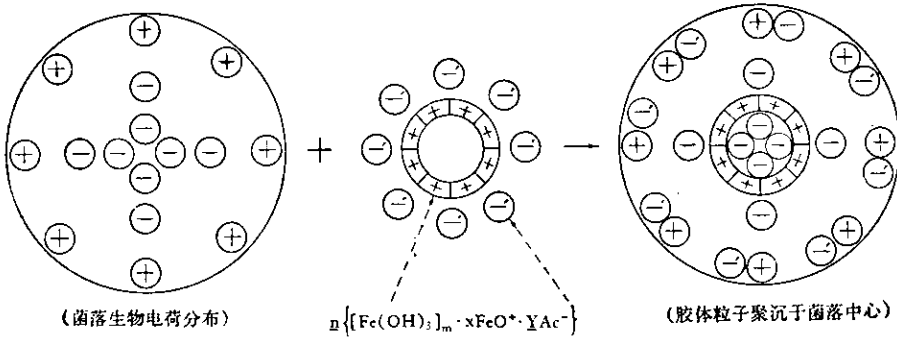


图 8 胶铁粒子引向菌落中心聚沉反应示意图

柠檬酸盐,但不能分解糊精,所以它们均不能形成褐红色核。产气杆菌虽然能利用柠檬酸盐,并能分解糊精,但在发酵糖类时,产酸并产气(CO_2 和 H_2),它的菌落中心虽然具有负电性,但被带有正电荷的氢离子(H^+)所中和。因此,肠系常见菌群的菌落中心均不能形成褐红色核。

小 结

1. 胶铁粒子琼脂的作用原理,实际是柠檬酸盐被利用和糊精被分解后所产生的碳水化合物发酵产酸不产气的综合反应。根据《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版^[1]对弧菌属中5种弧菌生化特征的描述,胶铁粒子琼脂对副溶血性弧菌的鉴别具有一定的严格性和专一性;另外,在实际工作中看到,胶铁粒子琼脂对水弧菌(*V. agatilis*)和猪弧菌(*V. suis*)也有很强的鉴别作用。为了兼顾对一般性肠炎病例粪便标本中非霍乱弧菌(*V. Noncholera*)等的分离培养,我们将胶铁粒子琼脂中的氯化钠含量减少到5—10克(即0.5—1.0%)。其实验结果,对副溶血性弧菌无显著影响。

2. 副溶血性弧菌在胶铁粒子琼脂上所形成

的典型菌落,在菌落稀疏处或杂菌较多的情况下均易看到。主要因两种菌的生化特性不同,不影响典型菌落的形成。所以有时两种菌落重叠生长,弧菌菌落小于2毫米,菌落中心仍可出现针刺形的褐红色点。不过,在副溶血性弧菌菌落十分密集处或在弧菌纯培养时菌落密集接近融合处,该处中心区的菌落由于生物电的电势差受干扰,胶铁粒子琼脂中的氢氧化铁胶体粒子不被吸引至菌落中心。因此,菌落中心不能出现褐红色核。但是,仔细观察在弧菌菌落密集处的边缘区仍有一圈典型菌落出现,并不影响鉴别。

参 考 文 献

- [1] Fukui, T. et al.: *Tokushima J. Exp. Med.* **10**: 14, 1963.
- [2] Zen-yoji, H. et al.: *J. of infect. dis.* **127**: 237, 1973.
- [3] 高等工业学校普通化学编写组: 普通化学(上册), 高等教育出版社, 第190—201页, 1956年。
- [4] 李博达等: 普通化学(上册), 人民教育出版社, 第51—58页, 1978年。
- [5] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins Co., 1974, pp. 340—345.