

辛辛那提弧菌选择性鉴别培养基的研制

申科敏 赵广英*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室 浙江 杭州 310035)

摘要: 旨在设计开发一种更适用于海产品重要致病菌——辛辛那提弧菌快速筛选与检测的选择性鉴别培养基(VciDM)。基于辛辛那提弧菌特有的综合酶系统及其代谢特点和对某些抑菌剂的抵抗力,设计开发出一种 VciDM,用于辛辛那提弧菌的反复检验,对 VciDM 的显色效果、平板效率、灵敏度和特异性进行评价。VciDM 对辛辛那提弧菌具有较好的选择性和特异性;在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 培养 16–24 h,辛辛那提弧菌菌落为黄色;其他致病菌菌落呈绿色或不生长;VciDM 对辛辛那提弧菌的出菌率高,为 $(82.14 \pm 4.45)\%$;VciDM 的检出限为 10^1 CFU/mL;与常规方法相比,结果易于观察,减少了溶藻弧菌等常伴弧菌的干扰,省去了 TCBS 分离培养后的生化试验,降低检测成本,减少工作量,具有更高的检测效率和鉴别能力。VciDM 平板可以对辛辛那提弧菌进行快速监测。

关键词: 辛辛那提弧菌,快速筛检,选择性鉴别培养基,致病性弧菌

Development of *Vibrio cincinnatiensis* Differential Medium

SHEN Ke-Min ZHAO Guang-Ying*

(College Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310035, China)

Abstract: To develop a more economical, simple and rapid detecting and differentiating *Vibrio cincinnatiensis* Differential Medium (VciDM), *V. cincinnatiensis* is one species of the major pathogens in seafood. Based on the specific enzyme systems and the corresponding metabolisms of *V. cincinnatiensis*, according to the resistibility to different antibacterial ingredients, VciDM was designed for the rapid separation, identification or detection of *V. cincinnatiensis*. The tests of color effects, plating efficiency, sensitivity and specificity were done to evaluate the efficiency of VciDM. The results showed that: VciDM had good selectivity and specificity. After incubation for 16–24 h at $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, the *V. cincinnatiensis* formed yellow colonies on VciDM. The other species of bacteria did not form colonies or formed green colonies on VciDM. VciDM showed a mean plating efficiency of *V. cincinnatiensis* cells of $(82.14 \pm 4.45)\%$ and its detection limit was 10^1 CFU/mL. As compared with the conventional methods, VciDM used for isolating and detecting *V. cincinnatiensis*, which is simpler operation, lower cost, more convenient for observation, higher sensitivity and specificity. Accordingly, it is suitable for kinds of inspection agencies to detect *V. cincinnatiensis*, especially for the use in rapid detecting and monitoring *V. cincinnatiensis* in seafood in the primary production and processing plants. VciDM can be

基金项目:“十一五”国家 863 计划海洋技术领域重点项目(No. 2007AA091806);国家自然科学基金项目(No. 30571623);浙江省食品科学与工程重中之重重点学科开放课题(No. Z05-178)

*通讯作者: Tel: 86-571-88071024 转 8595; ✉: zhaogy-user@163.com

收稿日期: 2010-05-24; 接受日期: 2010-08-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

used to rapidly and initiatively detect *V. cincinnatiensis*, which is usefull to rake quick infection control measurees.

Keywords: *Vibrio cincinnatiensis*, Rapid detection, Differential medium, Pathogenic *Vibrio*

弧菌属(*Vibrio* spp.)包括的弧菌种类多, 目前已经定名多达 37 种^[1-2], 它分布广泛, 海水中最为常见; 其中多数不致病, 已经证明对人类具有致病性的弧菌主要包括霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌和辛辛那提弧菌等 12 种^[1-6]。目前, 除了常见的霍乱弧菌和副溶血性弧菌外, 许多国家已经开始关注其他致病性弧菌在食物中的存在问题。例如, 早在 1997 年欧共体委员会通过的 368 决议(97/368/EC)中明确规定:“各成员国必须使用适宜的抽样计划和检测方法对冷冻或加工水产品进行微生物检验, 以确保有关产品不存在对人类健康的危害, 如沙门氏菌属和弧菌属是否存在。”^[7]因此, 致病性弧菌的检验越来越受到重视。

辛辛那提弧菌(*Vibrio cincinnatiensis*)与副溶血性弧菌、霍乱弧菌一样, 同属常见海洋致病性弧菌, 广泛分布于海水以及海产品中, 是嗜盐菌^[3]。该菌在无 NaCl 培养基上不生长, 在 1%–6% NaCl 浓度的培养基上生长良好, 在 TCBS 琼脂(硫代硫酸钠-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂)平板上呈黄色菌落, 直径为 1 mm–2 mm^[4]。该菌可引起人类的败血症和水生生物的弧菌病(*Vibriosis*)^[4]。1986 年 Bruyton 等从一例患菌血症和脑膜炎的 70 岁的男性病人的血液和脑脊液中分离到辛辛那提弧菌; 主要症状还没明确, 但与腹泻、呕吐及腹痛有关系^[4,8]。发病年龄不限, 但小儿与老年人常见^[8-11]。因此, 研究快速分离和检测辛辛那提弧菌的方法, 对开展水产品中辛辛那提弧菌的污染情况调查, 加强对辛辛那提弧菌所致疾病防治的研究具有重要意义。

现在国内外尚无专门针对辛辛那提弧菌的鉴别检测方法, 也没有固定的标准。日常检测用的嗜盐菌选择性琼脂、TCBS 培养基^[2], 可以初步分离到辛辛那提弧菌^[12], 但这些培养基只是适用于弧菌属细菌的分离, 而非专门用于分离辛辛那提弧菌, 因此, 对该菌而言, 特异性较低, 分离培养物中含杂菌较多, 如溶藻弧菌、霍乱弧菌和河流弧菌等; 还需要通过一些繁杂耗时的生化试验才能分离鉴别出辛辛那提弧菌^[12]。

基于此, 本研究针对辛辛那提弧菌的某些生态

学、酶系统及其代谢途径和抵抗力等方面的特性, 设计开发了一种以筛选辛辛那提弧菌为唯一目的菌的选择性鉴别培养基——辛辛那提弧菌选择性鉴别培养基(*Vibrio cincinnatiensis* Differential Medium, VciDM), 并对其显色效果、平板效率及灵敏度和特异性进行了初步评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 各种试验用菌株(表 1)在本研究开始之前都用生化反应系统-API 20E 或弧菌科生化鉴定管^[2-4]进行了菌种的鉴定确认工作。

表 1 试验菌株
Table 1 All tested strains

菌株 Strain	来源 Source
辛辛那提弧菌(<i>V. cincinnatiensis</i>) MCCC 1H00030	
创伤弧菌(<i>V. vulnificus</i>) MCCC 1H00066	
非 O1 型霍乱弧菌[<i>V. cholerae</i> (Non-O1)] MCCC 1A02608	购自中国海洋微生物菌种保藏管理中心
河流弧菌(<i>V. fluvialis</i>) MCCC 1H00045	
梅氏弧菌(<i>V. metschnikovii</i>) MCCC 1H00048	
拟态弧菌(<i>V. mimicus</i>) MCCC 1H00078	
副溶血性弧菌(<i>V. parahaemolyticus</i>) ZJGSMC 1P0901	
溶藻弧菌(<i>V. alginolyticus</i>) ZJGSMC 1A0803	
创伤弧菌(<i>V. vulnificus</i>) ZJGSMC 1V0902	
弗尼斯弧菌(<i>V. furnissii</i>) ZJGSMC 1F0904	
海鱼弧菌(<i>V. damsela</i>) ZJGSMC 1D0901	
鲨鱼弧菌(<i>V. carchariae</i>) ZJGSMC 1C0903	
霍利斯弧菌(<i>V. hollisae</i>) ZJGSMC 1H0907	浙江工商大学食品安全快速检测实验室提供
大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>) ZJGSMC 1E101	
鸡白痢沙门氏菌(<i>Salmonella typhi</i>) ZJGSMC 1S0702	
宋氏志贺氏菌(<i>Shigella sonnei</i>) ZJGSMC 1S0903	
大肠埃希氏菌 O157 (<i>E. coli</i> O157) ZJGSMC 1E0701	
蜡芽芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>) ZJGSMC 1B105	
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) ZJGSMC 1S0605	

1.1.2 主要培养基和试剂: TCBS: 杭州微生物试剂有限公司; 酵母浸膏: 浙江省富阳市富春江酵母厂; 鱼蛋白胨: 宁波海浦生物科技有限公司; 蛋白胨: 南通东海生物制品有限公司; 胰蛋白胨: 上海中洋海洋生物工程股份有限公司; D-木糖: 山东省阳信金缘纺化有限公司; 氨苄西林: 桂林南药股份有限公司; 营养琼脂: 杭州微生物试剂有限公司; 牛肉膏: 北京天旋微生物培养基有限公司; API: 生物梅里埃中国有限公司; 弧菌科生化鉴定管: 杭州微生物试剂有限公司。除特别提及外, 实验中所用试剂均为分析纯。

自行研制的改良碱性蛋白胨水(mAPW)培养基^[13]: 胰蛋白胨 10 g、鱼蛋白胨 10 g、酵母浸膏 2 g、NaCl 35 g、pH 8.6、H₂O 1000 mL, 分装三角瓶, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min, 备用。

嗜盐琼脂、营养肉汤以及 TCBS 培养基参照文献配制^[14]。

1.1.3 样品: 鱿鱼、鲳鱼、梅鱼、鳓鱼、明虾、白虾、基围虾、虾姑、花蛤、蛏子、圆蛤、淡菜、海瓜子和牡蛎采集于杭州市内菜市场。

1.1.4 仪器设备: GRP-9080 型隔水式恒温培养箱、不锈钢手提式压力蒸气灭菌器(YXQ-SG46-280S)、SZX 型超净工作台、电子天平、显微镜、-80℃ 低温冰箱、均质器、电动漩涡混合器等。

1.2 方法

1.2.1 VciDM 设计依据: 本研究依据辛辛那提弧菌的基础营养需求、特殊生态环境、特殊生化反应即酶系统和代谢特点及对特定抑菌物质的耐受性等方面的特点, 设计开发一种以检测辛辛那提弧菌为目的的 VciDM。

(1) 营养需求和特殊生态环境: 由于弧菌属微生物对营养要求不高, 并且主要是以水生环境中各种动物的躯体为营养物质生长繁殖。普通蛋白胨可以满足不同的生物体所需的氨基酸和多肽; 鱼蛋白胨是新鲜海产鱼为原料制成, 更适合弧菌营养要求。通过普通蛋白胨与鱼蛋白胨组合, 能更好的适合弧菌属微生物生长繁殖^[13]。辛辛那提弧菌有一定的嗜盐性, 在无 NaCl 或 6% 以上 NaCl 浓度的培养基中不生长, 在 3% NaCl 培养基中生长良好^[1]; 在 VciDM 中加入 NaCl 一方面可促进辛辛那提弧菌的生长, 另一方面也起到了抑制非嗜盐菌的生

长, 所以一定程度上能起到分离筛选辛辛那提弧菌的目的。

(2) 特殊生化反应即酶系统和代谢规律及其指示系统: 在弧菌属的细菌中, 具有分解 D-木糖酶系统的菌种不多, 只有辛辛那提弧菌和产气弧菌(*V. gazogenes*)^[7], 然而产气弧菌对氨苄西林敏感, 辛辛那提弧菌对氨苄西林不敏感^[15-16]。在含有氨苄西林的 VciDM 上, 辛辛那提弧菌分解 D-木糖产生的小分子有机酸与指示剂作用, 在培养基上形成黄色菌落; 而其他弧菌菌种或者没有分解 D-木糖的酶系统, 或者具有分解 D-木糖的酶系统但对氨苄西林敏感, 受氨苄西林的抑制而不能形成有效菌落, 因此, 在此培养基上这些菌的菌落表现为不生长或者其代谢产物与指示剂作用, 菌落呈绿色。

(3) 特定抑菌物质的耐受性: 胆酸钠、牛胆粉和硫代硫酸钠破坏细菌膜系统, 用柠檬酸钠络合渗漏的重要无机离子, 抑制革兰氏阳性菌。用硫代硫酸钠为还原剂, 适当降低氧化还原电位, 使兼性厌氧的革兰氏阴性菌成为优势菌。因此适合柠檬酸盐阳性的弧菌等微好盐兼性厌氧革兰氏阴性菌生长^[17]。

(4) 其他因素: 硫代硫酸钠和柠檬酸铁均为还原剂, 可以使细菌所产生的硫化氢避免氧化而使一些菌株代谢产硫化氢气体与柠檬酸铁作用, 使菌落中心呈黑色^[16], 从而排除这些杂菌; 海水中的正常 pH 值在 8.4 左右, VciDM 的 pH 在 8.4 左右, 这样既可以促进弧菌的生长又可以抑制其它菌的生长。

通过以上 4 个方面因素, 在同一个体系中相互协作, 共同作用, 在 37℃ ± 0.1℃ 培养, 24 h 内可以达到辛辛那提弧菌菌落呈黄色, 其他弧菌呈绿色或不生长; 而其他种类细菌不能形成菌落或不能生长。

VciDM 的主要成分为: 酵母膏粉 5 g, 蛋白胨 5 g, 鱼蛋白胨 5 g, 氯化钠 10 g, 柠檬酸钠 10 g, 硫代硫酸钠 10 g, 胆酸钠 4 g, 牛胆粉 6 g, 氨苄西林 1 mg, D-木糖 20 g, 柠檬酸铁 1 g, 琼脂 15 g, 混合指示剂, 蒸馏水 1000 mL。

1.2.2 VciDM 的配制: 除指示剂、D-木糖外, 将各种成分加热溶解, 1 mol/L NaOH 调至 pH 8.4 ± 0.2, 加入指示剂, 煮沸 2 min, 冷至 50℃ 左右, 加入 D-木糖, 摇匀, 倾注灭菌平皿, 待凝固后备用。

1.2.3 VciDM对各种致病菌特异性测试: 辛辛那提弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、溶藻弧菌、非 O1 型霍乱弧菌、河流弧菌、梅氏弧菌、弗尼斯弧菌、海鱼弧菌、霍利斯弧菌和鲨鱼弧菌复苏采用 mAPW; 大肠埃希氏菌、鸡白痢沙门氏菌、宋氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌复苏采用营养肉汤; 当复苏 6-8 h 后, 用接种环(直径 3 mm)挑取 1 环, 分别划线接种在 VciDM 平板上, 37°C ± 0.1°C 培养 24-48 h, 观察各个菌株在 VciDM 上的生长情况。

1.2.4 辛辛那提弧菌在 VciDM 上的出菌率(又称平板效率 Plating efficiency)测定方法: 出菌率: 指在选择性培养基上生长的菌落个数与在非选择性培养基上生长的菌落个数的比值^[18]。

$$\text{出菌率(\%)} = \frac{\text{选择培养基上菌落个数}}{\text{非选择培养基上菌落个数}} \times 100$$

将辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 在 3.5% NaCl 营养琼脂复苏 24 h 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, 稀释 8 个梯度, 用移液管吸取各浓度菌液 1 mL, 分别涂布 VciDM 和嗜盐琼脂平板(含 3% NaCl)平板, 每个平板设 10 次重复; VciDM 和嗜盐琼脂平板(含 3% NaCl)在 37°C ± 0.1°C 培养, 24 h 与 48 h 后, 菌落记数(取 30 至 300 之间菌落数的梯度), 计算 VciDM 的出菌率。并运用 SPSS 软件配对对样品 T 检验(Paired-samples T test)方法对出菌率结果进行显著性分析^[19]。

1.2.5 VciDM 在检测水产品中辛辛那提弧菌的精确度及灵敏度的测定: (1) 纯菌污染样品: 将辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 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 10⁻⁵-10⁻⁷ 各浓度菌液 1 mL 分别加到 25 g 经旋转刀片式均质器以 8000 r/min 均质 1 min 的鱼肉中, 均匀混合 2 h 后, 用 mAPW 增菌培养 18 h, 取 1 环增菌液划线接种 VciDM 和 TCBS 平板, 37°C ± 0.1°C 培养 16-24 h, 观察菌落生长情况, 确定检测结果。同时吸取 10⁻⁴-10⁻⁷ 各浓度菌液 1 mL 涂布嗜盐琼脂平板对辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 进行计数。

(2) 混合菌液污染样品: 将辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 复苏后, 进行 10 倍梯度稀释, 用移液管吸取 10⁻⁴-10⁻⁷ 各浓度菌液 1 mL 分别加到 25 g

经旋转刀片式均质器以 8000 r/min 均质 1 min 的鱼肉中, 同时将非 O1 霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、副溶血性弧菌、河流弧菌、梅氏弧菌、拟态弧菌、弗尼斯弧菌、海鱼弧菌、鲨鱼弧菌和霍利斯弧菌各菌株浓度约为 10³-10⁴ CFU/mL 的菌悬液加到每份鱼肉样品中, 均匀混合 2 h 后, 用 mAPW 增菌培养 18 h, 取 1 环增菌液划线接种 VciDM 和 TCBS 平板, 37°C ± 0.1°C 培养 16-24 h, 观察菌落生长情况, 确定检测结果; 疑似菌落采用法国梅里埃细菌鉴定系统 API 20E 试剂条和传统生化方法弧菌科生化鉴定管进行鉴定, 鉴别典型菌落菌株类型。

1.2.6 VciDM 对实际样品的检测: 从超市和肉菜市场采集鱿鱼、鲳鱼、梅鱼、鳎鱼、明虾、白虾、基围虾、虾姑、花蛤、蛏子、圆蛤、淡菜、海瓜子和牡蛎各若干份(样品共计 161 份), 先将样品表面进行酒精消毒, 然后用无菌剪刀取每份样品 25 g, 经旋转刀片式均质器以 8000 r/min 均质 1 min 后, 加入 225 mL mAPW 增菌液中增菌培养 18 h, 取 1 环增菌液划线接种 VciDM 平板, 在 37°C ± 0.1°C 培养 16-24 h, 观察, 确定检测结果; 同时采用传统弧菌检测方法 TCBS 初步分离纯化与法国梅里埃 API E20 试剂条与弧菌科生化鉴定系统进行生化试验, 并参照相关资料^[2-4]提供的弧菌生化特性, 对相同样品进行辛辛那提弧菌的检测。

2 结果与讨论

2.1 VciDM 对各种致病菌特异性测试

2.1.1 VciDM 对致病性弧菌的选择鉴别效果: 12 种弧菌菌株在 VciDM 上 37°C ± 0.1°C 培养 24 h 时的生长情况如图 1 所示。从图 1 可以看出, 只有辛辛那提弧菌生长为黄色菌落, 并生长良好; 其他致病性弧菌都生长为绿色菌落或不生长。致病性弧菌用 VciDM 培养, 因为不同菌种具有不同的代谢酶系统, 所以利用 VciDM 中的营养物质后呈现不同的菌落特征; 辛辛那提弧菌可以发酵 D-木糖产小分子有机酸与显色剂作用菌落呈黄色; 副溶血性弧菌、拟态弧菌、非 O1 型霍乱弧菌和创伤弧菌等能够在 VciDM 上生长, 但不发酵 D-木糖即不产小分子有机酸, 与显色剂作用菌落为绿色; 霍利斯弧菌由于受 VciDM 中胆酸钠、牛胆粉、氨苄西林和枸橼酸钠不同物质的作用而不能生长。

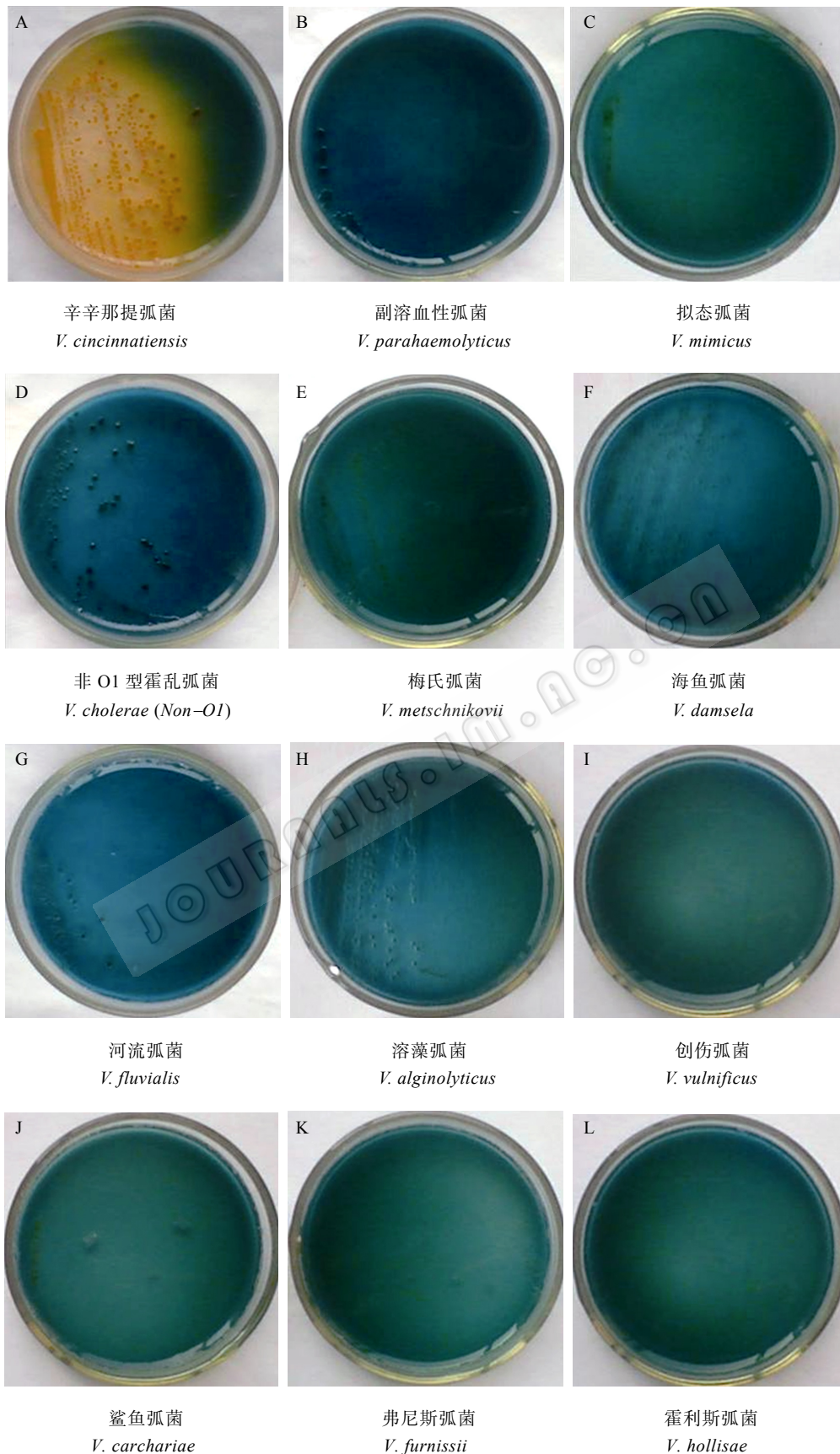


图 1 各种致病性弧菌菌株在 VciDM 上培养 24 h 结果
Fig. 1 Performance of different Pathogens on the VciDM (24 h)

2.1.2 VciDM 对弧菌属以外的主要食品致病菌的选择鉴别效果: 弧菌属以外的宋氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌、大肠埃希氏菌、大肠埃希氏菌 O157 和蜡样芽孢杆菌主要食品致病菌在 VciDM 上培养 24 h, 观察没有菌落生长, 但培养 48 h 会形成直径小于 1 mm 的绿色或黄色小菌落。

胆酸钠、牛胆粉对革兰氏阳性菌有强大的抑制作用, 再与氨苄西林、枸橼酸钠和硫代硫酸钠合用时, 对大肠菌群、宋氏志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌和鸡白痢沙门氏菌等菌体细胞蛋白质的合成具有抑制作用, 可以较大程度抑制这部分细菌的生长。因此, 上述细菌虽能生长, 但很缓慢, 只能在培养 48 h 左右才能够观察到很小的 R 型(粗糙型)菌落(菌落直径小于 1 mm, 且菌落较干燥, 表面不平滑, 边缘不整齐, 菌落形态不一致性)。

综上所述, 用 VciDM 培养, 只有辛辛那提弧菌能够在 24 h 内形成直径 1 mm-3 mm 的 S 型(光滑型)黄色菌落; 而其他致病性弧菌或不生长(如霍利斯弧菌), 或长成的菌落呈绿色; 而其他非弧菌属的致病

菌培养 24 h 未出现可见生长, 只能在 48 h 观察到绿色或黄色、直径小于 1 mm 的小 R 型菌落。由此可知, VciDM 在 24 h 即可对辛辛那提弧菌的初筛检测鉴别具有较好的选择性和特异性。

2.2 辛辛那提弧菌在 VciDM 上的出菌率(平板效率, Plating efficiency)结果

VciDM 平板培养后观察记数, 其细菌菌落数在 16 h-48 h 之间没有发生变化。对 30-300 之间的菌落数进行记数, 与嗜盐琼脂平板记数结果进行对比, 计算出菌率, 结果见表 2。对两种培养基上的菌落数进行配对样品 T 检验, 结果表明 VciDM 与嗜盐琼脂平板上生长的菌落数有显著差异($P < 0.05$)。虽然 VciDM 的出菌率与嗜盐琼脂存在显著性差异, 但 VciDM 做为一种选择性培养基, 而嗜盐琼脂对不同弧菌种间则不具有选择性, 前者的与后者相比其出菌率可达到(82.14 ± 4.45)%, 说明 VciDM 对辛辛那提弧菌的生长繁殖只具有轻微的抑制作用; 同时, VciDM 应用在辛辛那提弧菌检测时, 有一个前增菌的过程, 可以保证不会影响到辛辛那提弧菌的检出率, 所以, VciDM 适合分离鉴别辛辛那提弧菌。

表 2 辛辛那提弧菌在 VciDM 上的出菌率
Table 2 The plating efficiency of *V. cincinnatiensis* on VciDM

培养基类型 Medium type	各个平板出菌率 Each plate plating efficiency (%)										平均出菌率($\bar{x} \pm s$) Average plating efficiency (%)
VciDM	86.41	78.64	89.32	83.50	73.79	80.58	84.47	82.52	79.61	82.52	82.14 ± 4.45

注: 与嗜盐琼脂培养基比较。

Note: Compared with the halophilic agar.

2.3 VciDM 在检测水产品中辛辛那提弧菌的精确度和灵敏度

2.3.1 纯菌污染样品的精确度和灵敏度检测结果: 辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 纯菌液涂布嗜盐琼脂的计数结果约为 3.2×10^8 CFU/mL。将上述辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 稀释度为 10^{-5} - 10^{-7} 的纯菌液污染鱼肉后, 增菌检测结果表明, 稀释度 10^{-5} - 10^{-7} 的菌悬液(含菌浓度为 10^1 - 10^3 CFU/mL)在 VciDM 和 TCBS 平板上都可以检出, 检测限可达 10^1 CFU/mL, 即当样品中带有 10^1 CFU/mL 浓度的目标菌时, 经过前增菌培养, 在 2 种培养基上都可以检出。

2.3.2 混合菌液污染样品的精确度和灵敏度检测结果: (1) 辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} (浓度为 10^2 、 10^3 、 10^4 CFU/mL)的

纯菌液混合其他杂菌污染样品后, 经过 mAPW 增菌, TCBS 初步分离出黄色菌落, 黄色菌落中可以检测出辛辛那提弧菌, 同时也检出了多种非辛辛那提弧菌的致病性弧菌, 如溶藻弧菌、非 O1 霍乱弧菌、弗尼斯弧菌、鲨鱼弧菌、梅氏弧菌、河弧菌等; VciDM 可以检出辛辛那提弧菌, 辛辛那提弧菌菌落呈黄色, 其他各种弧菌菌落呈绿色或不生长。

(2) 当辛辛那提弧菌 MCCC 1H00030 稀释度为 10^{-7} (浓度为 10^1 CFU/mL)的纯菌液混合其他弧菌污染样品后, TCBS 上生长了相对较多的绿色菌落与黄色菌落, 经进一步鉴定, 黄色菌落有溶藻弧菌、非 O1 霍乱弧菌、弗尼斯弧菌、鲨鱼弧菌、梅氏弧菌、河弧菌, 几乎检测不出辛辛那提弧菌; VciDM 可以检出辛辛那提弧菌, 但辛辛那提弧菌的黄色菌落相

对较少,有被绿色菌落覆盖的趋势。

综上所述:用 VciDM 检测辛辛那提弧菌的精确度和灵敏度都比较理想,即当样品中含有 10^1 CFU/mL 浓度以上的辛辛那提弧菌时,经过 mAPW 增菌培养 16 h,再用 VciDM 检测都可以检出,但用 TCBS 与法国梅里埃细菌鉴定系统 API 20E 试剂条和传统生化方法弧菌科生化鉴定管的方法,在 TCBS 平板上黄色菌落中混有大量的其他弧菌,还需要进行多项生化试验才能检出是否污染了辛辛那提弧菌,并且由于辛辛那提弧菌含量低时容易受其它优势菌株的干扰而无法检出。

2.4 VciDM 检测实际样品中辛辛那提弧菌的结果

采集的 161 份实际样品中,共检出辛辛那提弧菌 7 株,具体检验结果见表 3。VciDM 方法与传统弧菌检测方法最终检测结果不相符。VciDM 方法检验过程中,161 份样品在 VciDM 平板上形成的黄色

菌落的样品有 9 份,再通过法国梅里埃细菌鉴定系统 API 20E 试剂条和传统生化方法弧菌科生化鉴定管对 VciDM 平板上的黄色菌落进行验证,最终得出污染有辛辛那提弧菌的样品有 7 份,另外 2 份是非弧菌属细菌;传统方法检测 161 份样品,在 TCBS 呈黄色菌落的样品有 29 份,用 API 20E 生化试剂条与弧菌科系列生化鉴定管结合鉴定,检出污染有辛辛那提弧菌的样品有 5 份,同时黄色菌落中还有溶藻弧菌、海鱼弧菌、鲨鱼弧菌与非弧菌属细菌等;还有 2 份辛辛那提弧菌阳性样品未检出,其原因可能有两方面:(1)辛辛那提弧菌在 TCBS 上出菌率不够理想,即 TCBS 是弧菌属的选择性鉴别培养基,不是特别适合辛辛那提弧菌的生长;(2)可能是辛辛那提弧菌在此样品菌系中处于弱势状况,培养 24 h 后,其他的相对优势菌种掩盖了辛辛那提弧菌所形成的菌落,从而导致辛辛那提弧菌未检出。

表 3 实际样品中辛辛那提弧菌的检验结果
Table 3 The detection results of *V. cincinnatiensis* in natural samples

样品 Sample	数量(份) No. portion	传统弧菌检测方法 Traditional detection method of <i>Vibrio</i> (TCBS)		VciDM		
		黄色菌落 Yellow colonies	辛辛那提弧菌 <i>V. cincinnatiensis</i>	黄色菌落 Yellow colonies	辛辛那提弧菌 <i>V. cincinnatiensis</i>	
		海瓜子 <i>Ruditapes variegata</i>	8	1	0	0
淡菜 <i>Dried mussel</i>	9	2	1	1	1	
圆蛤 <i>Quahog</i>	7	1	0	0	0	
蛏子 <i>Razor Clam</i>	8	2	0	0	-	
花蛤 <i>Venerupis</i>	9	2	0	1	1	
牡蛎 <i>Oyster</i>	9	3	1	2	1	
鱿鱼 <i>Squid</i>	10	2	0	1	1	
梅鱼 <i>Culter erythropterus</i>	腮、肠腔 Gills, intestine	6	2	0	0	-
	鱼肉 <i>Fish</i>	8	0	-	0	--
鳎鱼 <i>Sole</i>	腮、肠腔 Gills, intestine	7	2	0	0	-
	鱼肉 <i>Fish</i>	8	1	0	0	-
鲳鱼 <i>Pomfret</i>	腮、肠腔 Gills, intestine	5	2	1	1	1
	鱼肉 <i>Fish</i>	7	0	-	0	-
明虾 <i>Prawns</i>	虾头 <i>Head</i>	8	2	0	1	0
	虾肉 <i>Meat</i>	9	0	-	0	-
白虾 <i>White shrimp</i>	虾头 <i>Head</i>	6	2	1	1	1
	虾肉 <i>Meat</i>	6	0	-	0	-
基围虾 <i>Shrimps</i>	虾头 <i>Head</i>	8	3	1	1	1
	虾肉 <i>Meat</i>	8	1	0	0	-
虾姑 <i>Mantis shrimp</i>	虾头 <i>Head</i>	7	1	0	0	-
	虾肉 <i>Meat</i>	8	0	-	0	--
总计(份) <i>Total (portion)</i>	161	29 (18.01%)	5 (3.11%)	9 (5.59%)	7 (4.35%)	

注: - : 未进行生化试验鉴定。

Note: - : Not identified with biochemical tests.

通过 161 份样品检测对 2 种方法进行比较得出, TCBS 上呈黄色菌落的样品占总样品 18.01%, 辛辛那提弧菌的检测出率仅为 3.11%, 即传统弧菌检测方法 TCBS 对辛辛那提弧菌的阳性检出率为 17.24%; TCBS 上呈黄色菌落的平板中包含大量的非辛辛那提弧菌菌株。VciDM 上呈黄色菌落的样品占总样品 5.59%, 辛辛那提弧菌的检测出率为 4.35%, 即 VciDM 对辛辛那提弧菌的阳性检出率为 77.78%, VciDM 上呈黄色菌落的平板几乎全部是辛辛那提弧菌, 其特异性强。

综上所述: VciDM 方法检测辛辛那提弧菌比传统方法中 TCBS 具有更高的检测效率与鉴别能力, 可消除非辛辛那提弧菌的干扰, 如溶藻弧菌, 从根本上降低可疑菌落的数量, 如果用 VciDM 代替 TCBS 分离鉴别辛辛那提弧菌可减少大量生化试验的工作量, 缩短检测时间, 降低检测成本, 减少人力与物力的消耗。

3 结论

本文设计研究出的 VciDM 特异性(即选择性)好, 辛辛那提弧菌的菌落为黄色; 其他致病菌如: 非 O1 型霍乱弧菌、溶藻弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、宋氏志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157、金黄色葡萄球菌等的菌落或呈绿色或不生长; 灵敏性高(平板效率高), 与嗜盐琼脂相比, 其出菌效率为(82.14 ± 4.45)%; 用 mAPW 增菌培养 18 h, 取增菌液划线接种 VciDM 平板, 37°C ± 0.1°C 培养 16–24 h, 快速筛选辛辛那提弧菌的方法是可行的, 并且比传统方法所用的 TCBS 等培养基具有更高的检测效率, 结果易于观察, 可大幅度减少进一步菌种验证的工作量和试剂消耗量, 为相关标准的制定提供必要的参考; 适用于各级检验机构, 更值得在基层的致病性弧菌日常筛检和监测中推广使用。

参考文献

- [1] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科技出版社, 2003: 623–627.
- [2] David Hendricks Bergey, John G. Holt, Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wikins, 1994: 190–194.
- [3] Angelo Depaola JR, Kaysner CA. U.S. Bacteriological Analytical Manual, 2004. (Chapter 9th). <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070830>.
- [4] Marianne D Miliotis, Jeffrey W Bier. International handbook of foodborne pathogens. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003: 295–322.
- [5] 张淑红, 吴清平, 张菊梅, 等. 副溶血性弧菌显色培养基检测效果初步评价. 微生物学通报, 2008, 35(1): 145–148.
- [6] 蔡俊鹏, 孙丽滢. 深圳赤潮中霍乱弧菌噬菌体的分离筛选及生物学特性分析. 微生物学通报, 2010, 37(1): 12–18.
- [7] 吕海沧. 食品中五种主要的致病性弧菌的 PCR 检测方法研究. 福建农林大学, 2007: 14–18.
- [8] Brayton PR, Bode RB, Colwell RR, et al. *Vibrio cincinnatiensis* sp. nov., a new human pathogen. *J Clin Microbiol*, 1986, 23(1): 104–108.
- [9] 张保强, 董力群, 王逊, 等. 致病性弧菌的研究概况. 职业与健康, 2006, 22(24): 2170–2172.
- [10] Bode RB, Broyton PR, Colwell RR, et al. A new *Vibrio* species, *Vibrio cincinnatiensis*, causing meningitis: successful treatment in an adult. *Ann Intern Med*, 1986(104): 55–56.
- [11] Wuthe HH, Aleksic S, Hein W. Contribution to some phenotypical characteristics of *vibrio cincinnatiensis*. Studies in one strain of a diarrhoeic human patient and in two isolates from aborted bovine fetuses. *Zentralbl Bakteriol*, 1993(279): 458–465.
- [12] 寇运同, 刘晨光, 林修光, 等. 同时检测食品中的多种致病性弧菌. 检验检疫科学, 2003, 13(2): 1–3.
- [13] 赵广英, 申科敏, 励建荣. 副溶血性弧菌增菌培养基及培养条件改进. 食品科技, 2009, 34(11): 279–283.
- [14] 毛芝娟, 卓华龙, 杨季芳, 等. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡, 2001, 20(2): 187–192.
- [15] 战文斌, 周丽, 俞开康, 等. 一种新的中国对虾弧菌病原菌——产气弧菌. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 21–28.
- [16] 李志明. 食品卫生微生物学检验学. 北京: 化学工业出版社, 2008: 113.
- [17] 牛天贵, 张宝芹. 食品微生物检验. 北京: 中国计量出版社, 2003: 413–456.
- [18] Lise Høi, Inger Dalsgaard, Anders Dalsgaard. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(5): 1721–1724.
- [19] 王苏斌, 郑海涛, 邵谦谦, 等. SPSS 统计分析. 北京: 机械工业出版社, 2003: 160–165.