

用一种方法同时检测水产品中的多种致病性弧菌*

寇运同¹ 刘晨光² 雷质文¹ 林修光¹

(¹ 青岛出入境检验检疫局 青岛 266002)

(² 青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

提要 建立了水产品中 12 种致病性弧菌的同一检测方法。确定了增菌、分离培养基、培养温度等关键参数。新方法有较好的特异性, 简便、快速, 灵敏度 < 0.4 个/g; 对 200 份水产品的检测结果显示, 新方法的检测结果同常规培养法的结果完全相符。

关键词 致病性弧菌, 同时检测, 水产品

中图分类号 TS207.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0046-04

致病性弧菌是一类重要的食源性病原菌, 是许多国家进口水产品的必检项目。该菌广泛地存在于自然环境, 特别是海水中^[1-3]; 海产品中有较大程度的污染^[2-5]。致病性弧菌的检测主要有 FDA, AOAC, ISO, GB 等方法, 这些方法均是单一弧菌的检验方法。虽然 NMKL 方法规定了 4 种致病性弧菌的检验方法, 但仍远远不能满足要求。本文首次建立了水产品中致病性弧菌的同一检测程序, 成功做到了用同一方法同时检测食品中的 12 种致病性弧菌。该方法大大简化了工作程序, 节省了检测成本。类似研究, 国内外未见报道。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器设备

生化培养箱, 广东医疗器械厂; 破伤风梭菌细菌浊度标准由中国药品生物制品检定所研制。

1.1.2 培养基

碱性蛋白胨水 (APW)、改良蛋白胨水 (MBP)、营养肉汤、营养琼脂、庆大霉素琼脂, 北京陆桥公司; TCBS, 上海生物制品鉴定所、默克公司; 弧菌琼脂, 军事医学科学院北京流行病学研究所; 4 号琼脂, 浙江省军区后勤部卫生防疫检验所。

1.1.3 菌株

副溶血弧菌 ATCC17802, 20571(s.1); 创伤弧菌 IMG13545T; 溶藻弧菌 ATCC17749; 鳗弧菌 ATCC19105; 梅氏弧菌 ATCC7708; 梅式弧菌 7029; 拟

态弧菌 IMG7896; 河流弧菌 IMG7894T; 辛辛那提弧菌 ATCC35912; 弗尼斯弧菌 IMG7910T; 费氏弧菌 ATCC7744; 霍利斯弧菌 GIP101886; 美人鱼弧菌 ATCC35084T; 大肠杆菌 ATCC43889; 金黄色葡萄球菌 26001; 肠炎沙门氏菌 50041。主要来源于北京药品生物制品鉴定所和中国海洋大学。另有自备菌株 5 株: 副溶血弧菌 3 株; 溶藻弧菌 1 株, 嗜水气单胞菌 1 株。

1.1.4 样品

取自出口冷冻食品或从市场购买。

1.2 实验方法

1.2.1 方法建立

1.2.1.1 增菌培养基的选择 用待试菌株增菌液分别接种碱性蛋白胨水、多粘菌素 B 肉汤、营养肉汤等增菌培养基中, 于 37℃ 培养 24 h, 观察生长情况。

1.2.1.2 分离培养基的筛选 待试菌株经 MBP 增菌 24 h, 经破伤风梭菌浊度标准确定, 将增菌液稀释至 100 个/mL。取稀释液 1 mL 分别涂布待试平板。于 37℃ 培养 24 h 或 48 h 后观察待试菌株生长情况。

* 国家质量监督检验检疫总局制订标准项目 B027-1999 号。

第一作者: 寇运同, 出生于 1969 年, 理学硕士, 高级工程师。电话: 0532-2679567-6124, E-mail: smartkou@hotmail.com

收稿日期: 2003-01-13; 修回日期: 2003-01-29

况。

1.2.1.3 分离培养基的特异性实验 待试菌株新鲜增菌液分别涂布待试平板,于 37℃ 培养 24 h 或 48 h 后观察待试菌株生长情况。

1.2.1.4 培养温度的选择 采用 TCBS、海水-蔗糖琼脂对致病性弧菌的新鲜 MBP 增菌肉汤,取经标准确定浓度为 100 个/mL 的菌液 1 mL,涂布接种。于 37℃ 培养 24 h 或 48 h 后观察待试菌株的生长情况。

1.2.1.5 鉴定程序的设计 根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第 9 版和新版 FDA 微生物检验手册所列生化特性,设计致病性弧菌鉴定程序。

1.2.2 方法验证

1.2.2.1 特异性 待试菌株人工污染样品后,按照新建方法进行增菌、分离和鉴定。

1.2.2.2 灵敏度试验 致病性弧菌的新鲜 MBP 增菌肉汤,经细菌浊度标准比浊确定菌液浓度后,用 APW 进行稀释,污染样品后进行检测。该操作

应在 15~20 min 内完成。

1.2.2.3 用新建方法检测自然污染样品 用新建方法对出口食品和市售食品进行致病性弧菌的检验,同时用 SN 标准对相同样品进行霍乱弧菌和副溶血弧菌的检测。

2 结果与分析

2.1 方法建立

2.1.1 增菌培养基的选择

将 21 株待试菌株分别在碱性蛋白胨水、多粘菌素 B 肉汤、营养肉汤等增菌培养基增菌培养。结果发现,除霍利斯弧菌生长较弱外,其他致病性弧菌可以在碱性蛋白胨水和营养肉汤中良好生长;除副溶血弧菌生长较好外,其他致病性弧菌和非弧菌在多粘菌素 B 肉汤中生长较弱;非弧菌在营养肉汤中的生长情况明显比在碱性蛋白胨水中好。另外,将碱性蛋白胨水中的氯化钠浓度增加到 2%,发现弧菌的生长状况更好。

表 1 致病性弧菌在 5 种培养基上的菌落大小

Tab.1 The size of the *Vibrios* in five media

菌种	菌落直径(mm)				
	海水-蔗糖琼脂	TCBS	弧菌琼脂	庆大霉素琼脂	4 号琼脂
霍乱弧菌 O ₁ 型	1.5	1.4	1.3	1.4	1.4
霍乱弧菌 O ₁₃₉ 型	1.4	1.5	1.4	1.3	1.4
副溶血性弧菌	2.3	2.6	2.2	—	—
创伤弧菌	2.2	2.2	2.2	2.0	2.0
溶藻弧菌	1.6	1.5	1.2	—	—
最小弧菌	2.4	2.0	2.2	1.7	1.6
梅氏弧菌	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0
河流弧菌	1.7	1.8	1.6	—	—
辛辛那提弧菌	1.3	1.1	1.1	—	—
费氏弧菌	1.2	1.2	1.1	—	—
美人鱼弧菌	1.1	1.0	—	—	—
霍利斯弧菌	1.1	—	—	—	—
鲨鱼弧菌	1.3	1.2	1.2	—	—

2.1.2 分离培养基的选择

由表 1 可以看出,作为应用较广的选择性培养基,TCBS 有 11 种致病性弧菌生长良好,霍利斯弧菌不能生长;弧菌琼脂有 9 种致病性弧菌生长良好,霍利斯、美人鱼和鲨鱼弧菌生长较弱;庆大霉素琼脂、4 号琼脂仅有少数几种致病性弧菌能生长。海水-蔗糖琼脂作为非选择性培养基,所有致病性弧菌均能良好

生长。考虑到食品中大量的非致病性弧菌,甚至非弧菌的存在,建议用选择性培养基进行菌落分离或计数。从实验结果可以看出,TCBS 是检测出口食品中致病性弧菌计数的较为理想的培养基。致病性弧菌在 TCBS 培养基上形成绿色至蓝绿色或黄色菌落。需要注意的是,TCBS 的质量对分离效果影响很大。

2.1.3 杂菌抑制力实验

海水-蔗糖琼脂对杂菌的抑制力较弱,4种非致病性弧菌均可良好生长;TCBS琼脂、弧菌琼脂都有较强的抑制杂菌的能力,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌生长较弱;嗜水气单胞菌可以良好生长。

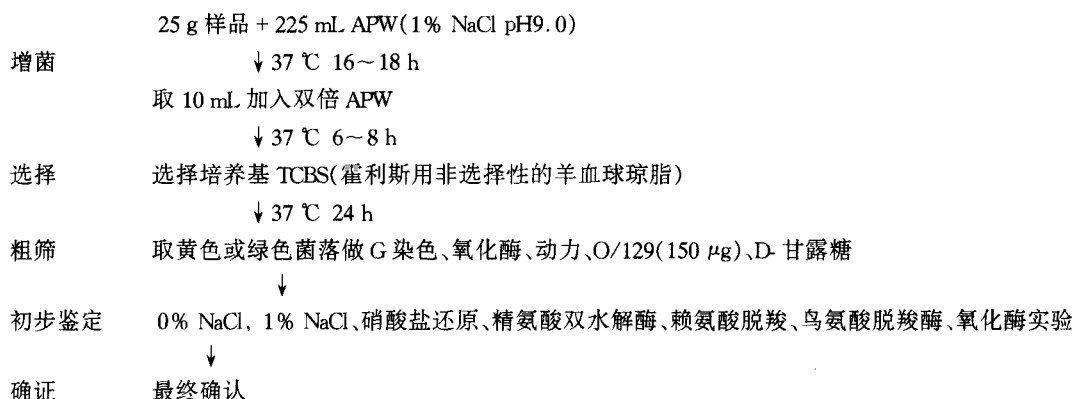
2.1.4 最适生长温度的选择

根据相关文献,选择20,25,30,37,42,45,50℃进行致病性弧菌生长情况试验。结果发现,在TCBS培养基上培养24h后,30℃和37℃培养平板上的菌落生长情况最好,25℃以下,菌落生长缓慢;42℃以上

菌落生长变弱,直至不能生长。由此可见,培养温度过高或过低都不利于该类细菌的生长,30~37℃是该类细菌生长的适宜温度。

2.1.5 可疑菌落的鉴定

为了简化工作程序,减少工作量,根据《伯杰氏细菌鉴定手册》和FDA微生物检验手册所列生化特性,设计了从粗筛、初级鉴定到最终确认的一套鉴定程序,大大增加了可操作性。具体检验、鉴定程序如下:



2.2 方法验证

2.2.1 确定致病性弧菌的检测低限,如表2所示。

从表2可以看出,每0.12~0.25个/g即可检出,与

其他病原菌培养法检测低限比,有较高的灵敏度^[6]。

2.2.2 食品中检测致病性弧菌的检测情况

作者用新建方法检测了200份样品。从检测结果看,出口企业加工的食品致病性弧菌污染率很低:30

表2 新建方法的灵敏度试验

Tab.2 Sensitivity test of the new method

项目	浓度(个/mL)								
	10	5	1	0.5	0.3	0.2	0.1	0.05	0
霍乱弧菌 O ₁ 型	+	+	+	+	+	+	+	-	-
霍乱弧菌 O ₁₃₉ 型	+	+	+	+	+	+	+	-	-
副溶血性弧菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-
创伤弧菌	+	+	+	+	+	+	-	-	-
溶藻弧菌	+	+	+	+	+	+	+	+	-
拟态弧菌	+	+	+	+	+	+	+	+	-
梅氏弧菌	+	+	+	+	+	+	-	-	-
河流弧菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-
辛辛那提弧菌	+	+	+	+	+	+	-	-	-
费氏弧菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-
美人鱼弧菌	+	+	+	+	+	-	-	-	-
霍利斯弧菌	+	+	+	+	+	-	-	-	-
鲨鱼弧菌	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+ :检测结果为阳性;- :检测结果为阴性。

份牡蛎中检出副溶血弧菌 1 例, 50 份鳕鱼、50 份鲈鱼、30 份单冻马哈鱼均未检出致病性弧菌。而市售产品却有不同程度的检出: 10 份牡蛎中检出副溶血弧菌 1 例、拟态弧菌 1 例; 10 份鱿鱼中检出副溶血弧菌 1 例; 10 份基尾虾中未检出致病性弧菌; 10 份鲮鱼未检出致病性弧菌。由于仅有分别针对霍乱弧菌和副溶血弧菌的标准检测方法, 作者用 SN 标准分别对霍乱弧菌和副溶血弧菌进行了检测。两种方法对这两种菌的检测结果一致。

3 讨论

近年来, 国外要求检测的致病性弧菌的种类越来越多, 仅在 1998~2000 年之间, 我国出口的水产品就曾因霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌等多个项目超标被国外制裁。我们的进出口水产品也要求同时检测多种致病性弧菌。作者在日常工作中发现, 每种弧菌采用不同的方法检测费时费力, 给工作带来诸多不便。作者研究了众多相关方法, 设计了一套检测程序, 首次实现了 12 种致病性弧菌的同时检测。方法简便易行、权威准确。

本研究除了致病性弧菌的增菌、分离和鉴定程序, 同时根据重要生化特性将鉴定程序分段进行, 而将大大优化了鉴定程序, 增加了可操作性。

参考文献

- 1 Chakraborty S. Pathogenic *Vibrios* in the natural aquatic environment. *Rev Environ Health*, 1997, 12(2): 63-80
- 2 王 敏, 姜允涛, 王晓春, 等. 大连市致病性弧菌分布与病原学研究. *中国卫生检验杂志*, 1997, 7(6): 337
- 3 吴 玲, 张景隆, 倪语星, 等. 沿海五省市致病性弧菌的分布调查与病原学研究. *中华流行病学杂志*, 1998, 19(5): 37
- 4 Baffone W. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int J Food Microbiol*, 2000, 54(1-2): 9-18
- 5 伍碧雯, 连建华, 陈蔓霞, 等. 广州部分市售海产品致病性弧菌污染情况调查. *广东医学院学报*, 1999, 15(3): 235
- 6 Avoyne C. Detection of *Listeria* spp. in food samples by immunomagnetic capture: Lister test method. *Journal of Food Protection*, 1997, 60(4): 377-384

DETECTION OF *Vibrios* IN SEAFOOD USING THE SAME METHOD

KOU Yun-Tong¹ LIU Chen-Guang² LEI Zhi-Wen LIN Xiu-Guang²

(¹Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of People's Republic of China, Qingdao, 266002)

(²Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Received: Jan., 13, 2002

Key Words: Pathogen *Vibrios*, Detection, Seafood

Abstract

We established a rapid, sensitive and specific method which can detect 12 *Vibrios* at the same time, finding the best enrich medium, isolation medium and culture temperature. Limit to detection for *Vibrios* in seafood is below 0.4CFU per g. 200 seafood samples were detected by the new method and other methods, with a completely coincident result.

(本文编辑: 刘珊珊)