

嗜盐性细菌培养检测海产品中副溶血性弧菌 的效能评价与分析

郭艳飞*

(瓦房店市疾病预防控制中心, 大连 116300)

摘要: 目的 评价和分析在大连地区海产品副溶血性弧菌检测中应用嗜盐性细菌培养检测的价值。**方法** 采集 46 份海产品样本, 研究时间为 2023 年 7 月至 2023 年 10 月, 均来自大连地区, 培养并分离嗜盐性细菌, 实施菌株耐盐性试验并鉴定和分析副溶血性弧菌毒力, 分析海产品副溶血性弧菌特性及检出情况。**结果** 共计筛选出嗜盐菌株及耐盐菌株 45 株, 20% 盐度下获得率为 44.44%, 15% 盐度下获得率为 55.56%, 50°C 培养环境下获得率为 11.11%。分离菌株在 25% NaCl 浓度下持续生长且 10% NaCl 浓度下菌株长势最好, 检出 17 株中度嗜盐菌, 耐盐菌株数量为 28 株。**结论** 在大连地区海产品副溶血性弧菌检测中应用嗜盐性细菌培养检测可提高副溶血性弧菌检出率, 而且毒力鉴定结果表明副溶血性弧菌毒力较强, 具有引发食物中毒的潜在危险, 相关部门必须加强海产品副溶血性弧菌检验以保证饮食安全。

关键词: 嗜盐性细菌培养; 海产品; 副溶血性弧菌; 饮食安全

Evaluation and analysis of the efficacy of halophilic bacterial culture in detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafood

GUO Yan-Fei*

(Wafangdian Center for Disease Control and Prevention, Dalian 116300, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate and analyze the value of halophilic bacteria culture in the detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Dalian area. **Methods** 46 samples of Marine products were collected from Dalian from July 2023 to October 2023, and halophilic bacteria were cultured and isolated. The salt-tolerance test was carried out to identify and analyze the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*, and the characteristics and detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Marine products were analyzed. **Results** A total of 45 halophilic and salt tolerant strains were screened, with a yield of 44.44% at 20% salinity, 55.56% at 15% salinity, and 11.11% at 50°C cultivation environment. The isolated strains continued to grow at a concentration of 25% NaCl, and the best growth was observed at a concentration of 10% NaCl. Seventeen moderately halophilic bacteria were detected, with a total of 28 salt tolerant strains. **Conclusion** The detection rate of *Vibrio parahaemolyticus* in Marine products in Dalian area can be improved by using halophilic bacteria culture detection. The results of virulence identification show that *Vibrio parahaemolyticus* has strong virulence and potential risk of food poisoning.

* 通信作者: 郭艳飞, 微生物副主任技师, 微生物检验科员, 研究方向为微生物检验相关方面。E-mail: 2665152669@qq.com

*Corresponding author: GUO Yan-Fei, Deputy Chief Technician of Microbiology, Microbiology Laboratory Member, Building 7, Changxing Garden, Wenlan Street, Wafangdian City, Dalian 116300, China. E-mail: 2665152669@qq.com

Relevant departments must strengthen the detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Marine products to ensure dietary safety.

KEY WORDS: halophilic bacterial culture; seafood; *Vibrio parahaemolyticus*; food safety

0 引言

副溶血性弧菌广泛存在于海底沉积物、近海岸海水以及贝类、鱼类等海产品中,属于革兰氏阴性嗜盐性病原菌,含盐量为0.5%~8%的环境中适宜生长,具有兼性厌氧的特点^[1]。副溶血性弧菌属于人类食源性疾病感染常见病原菌,一旦人类误食被副溶血性弧菌污染、交叉污染或者未充分煮熟的海产品可诱发胃肠炎疾病,使得患者产生强烈的不适感,严重损害人类健康,副溶血性弧菌属于我国沿海地区食源性疾病主要致病菌^[2-3],为沿海地区食物中毒的重要原因以及引发肠道感染的主要病原菌。食品安全与国计民生息息相关,近年来受污染问题等因素的影响,由副溶血性弧菌引发的食物中毒事件在细菌性食物中毒中占据比例呈升高趋势,主要通过贝类、鱼类等海产品传播,若食物中副溶血性弧菌数量达到105~106 CFU/mL时即可诱发疾病,因此精准检测海产品中副溶血性弧菌对于提高食品安全以及维护人们饮食安全与身体健康有重要价值^[4-5]。嗜盐性细菌培养为筛选嗜盐菌的常用手段,具有快速、高效等特点,能够准确反映食品受污染程度,在食品副溶血性弧菌检测中有着广泛的应用。本次研究探讨在大连地区海产品副溶血性弧菌检测中应用嗜盐性细菌培养的检测价值,研究时间为2023年7月至2023年10月,研究结果现报告如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源

检测海产品样本包括对虾4份、鱼类2份及多种贝类40份,共计46份,均购自大连地区海鲜市场,采样量:200 g/份数,完成采集后立即保存于4℃环境下并立即送往实验室进行检测。

1.2 仪器及试剂

振荡培养箱(HZQ-F100,苏州奇乐电子科技有限公司)、M-H培养基(HBPM6232,9 cm×10个,青岛海博生物技术有限公司)、科玛嘉弧菌显色培养基(1000 mL,法国科玛嘉)。

蒸馏水(Ⅱ级);MgSO₄·7H₂O(99%,廊坊纳博化学技术有限公司);KCl(62%-99%,巩义市亚铝材料有限公司);柠檬酸三钠(99%,山东鑫捷化工科技有限公司);酵母提取物(99%,山东萍聚生物科技有限公司);酪蛋白氨基酸(BR,上海康朗生物科技有限公司);巨噬细胞(Hepatic macrophages, HM);培养基(DMEM/F-12,上海雅吉生物科技有限公司);葡萄糖(50 mg/mL,重庆睿雅生物科技有限公司);胰蛋白胨(99%,上海缘肽生物技术有限公司);FeCl₃·7H₂O(99%,上海一基实业有限公司);NaBr(99%,湖北成丰化工有限公司);

NaHCO₃(99.5%,广州泽隆化工科技有限公司);CaCl₂·7H₂O(77%,潍坊海之源化工有限公司);213培养基(500 mL,美国菌种保藏中心(American Type Culture Coll Edtion, ATCC))。

1.3 嗜盐性细菌培养及分离

通过培养基(Culture Medium, CM)进行富集及分离培养,包括1000 mL蒸馏水、MgSO₄·7H₂O 20.0 g、KCl 2.0 g、柠檬酸三钠 3.0 g、酵母提取物 10.0 g、酪蛋白氨基酸 7.5 g。巨噬细胞(Hepatic macrophages, HM)培养基:1000 mL蒸馏水、葡萄糖 1.0 g、酵母提取物 1.0 g、胰蛋白胨 0.5 g、FeCl₃·7H₂O 0.05 g、NaBr 0.23 g、NaHCO₃ 0.06 g、KCl 2.0 g、CaCl₂·7H₂O 0.36 g、MgSO₄·7H₂O 1.0 g。ATCC 213培养基:蒸馏水 1000 mL、酵母提取物 1.0 g、胰蛋白胨 2.5 g、KCl 5.0 g、CaCl₂·7H₂O 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 10 g。

将琼脂20 g加入至固体培养基中,设置盐度NaCl浓度为20%、15%,将pH调节至约7.2,然后以121℃持续灭菌,时间为15 min。配制浓度菌悬液,浓度:1×10⁴ CFU/mL,将菌悬液1 mL加入至100 mL 3% NaCl蛋白胨(浓度:3%)水中,确保最终浓度达到1×10² CFU/mL。将菌悬液加入至液体富集培养基中(比例为1:40),为了确保嗜盐细菌所处环境的适宜性,分别于37℃及50℃环境下进行持续振荡培养,其中,37℃下浓度分别为15%、20%,50℃下浓度为15%,持续培养3 d。随后以相同比例进行3次转接,富集培养嗜盐细菌,取1 mL富集培养液,以稀释平板法进行平板涂布,然后在恒温箱下持续培养3~4 d,依照菌落大小、形态以及颜色、表面特征等实施初步筛选,通过单菌落反复划线的方式连续进行3~4次分离纯化,在培养液中接种纯化后单菌落,实施振荡培养直至呈稍浑浊状,采用混合甘油法进行保存,保存温度为-20℃,在无菌操作台上完成各项操作。

1.4 菌株耐盐性试验

针对分离待测菌株实施液体培养直至OD₆₀₀值达到约1.0,向不同NaCl浓度液体培养基中接种1%待测菌株,NaCl浓度分别为0.20%、5.00%、10.00%、15.00%、20.00%及25.00%,分别设置3个重复,设置恒温水温度分别为37℃及50℃,连续水浴培养36 h,然后实施生物量OD₆₀₀值测定。

1.5 观察指标

分析海产品副溶血性弧菌特性及检出情况。

2 结果与分析

所采集的46份海产品样本中总计检出副溶血性弧菌富集筛选结果显示共计筛选出嗜盐菌株及耐盐菌株45株,见表1、

图1。根据耐盐性试验分析结果可知所获取的分离菌株在25% NaCl浓度下持续生长,10% NaCl浓度下菌株长势最佳,NaCl浓度为0%及2%时菌株变化不明显,未见明显长势,菌株菌落主要呈圆形,颜色主要包括乳黄色、乳白色以及乳白相间颜色,细胞形态以球状与长杆状为主,也可见短杆状,仅占据较小比例,均属于革兰氏阴性菌。

表1 嗜盐菌株及耐盐菌株检出情况及检出条件分析 [株 (%)]

Table 1 Analysis of detection status and detection conditions of halophilic and salt tolerant strains [% of Strains]

| 检出条件 | 检出条件 | 数量 (株) |
|---------|--------|-------------|
| 盐度 | 15% 盐度 | 25 (55.56%) |
| | 20% 盐度 | 20 (44.44%) |
| 嗜盐微生物分类 | 嗜盐 | 17 (37.78%) |
| | 耐盐 | 28 (62.22%) |

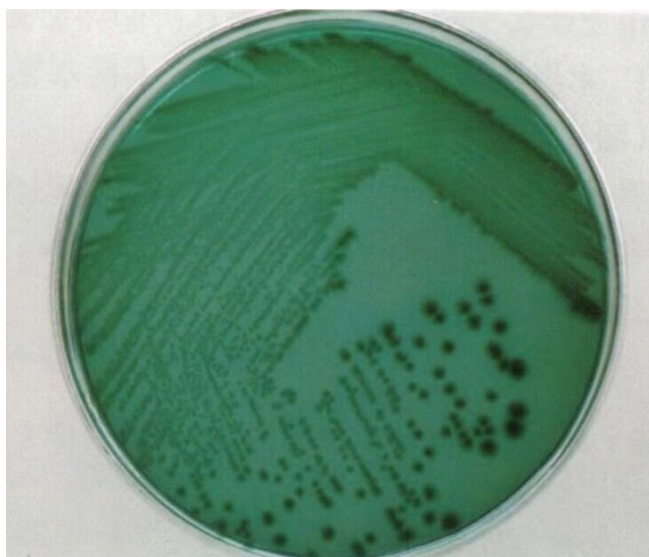


图1 副溶血性弧菌

Fig.1 *Vibrio parahaemolyticus*

3 讨论与结论

作为嗜盐胸革兰氏阴性短杆菌,副溶血性弧菌属于弧菌科弧菌属,为常见致病菌,同时也是全球范围内人们食用未经充分烹调或者生食后发生的食源性急性肠胃炎主要致病原因,在中国范围内属于食源型疾病主要致病病原菌,具有很强的致病性,广泛存在于海产品、近海岸海水中,不但可诱发细菌性食物中毒,还会导致人畜共患病^[6]。近年来,随着我国沿海地区水产养殖规模呈持续扩大的趋势,水产品的安全性问题以及食品质量问题日益突出。2017年至2020年期我国因溶血性弧菌感染引发的胃肠炎患者数量高达3033例^[7],我国青岛、宁波、海口等城市贝类海产品中副溶血性弧菌检出率不高不下,达到32.6%~57.3%,食源性疾病发生风险与污染存在直接关联,污染程度越高则食源性疾病的发病风险也越高^[8]。日本福岛核电站核污水排海事件发生后,人们对海产品的安全性关注度不断升高。人体感染副溶血性弧菌原因在于摄食了经副溶血性弧菌污染的食物,临床症状主要表现为发热、呕吐及腹泻等,对人

体健康可造成严重损害,此外,食源性疾病对我国国民经济发展也会造成阻碍,故而快速高效地检出海产品中的副溶血性弧菌具有非常重要的现实意义^[9-10]。

嗜盐性细菌培养在副溶血性弧菌检测中应用广泛,检测效能较高,可提高溶血性弧菌检出率,有助于为政府及相关部门及时采取防控措施提供重要指导。溶血性弧菌在海产品中广泛存在且毒力较强,容易较大食物中毒发生风险,影响食品安全,食源性暴发事件一旦发生,可造成严重不良影响,容易引发突发公共卫生事件,政府及相关部门必须加大对海产品溶血性弧菌的抽查和检验力度,加强持续性监测具有很大的必要性,能够及时检出溶血性弧菌并采取针对性的防控措施,有助于最大程度地保证广大居民的饮食安全。除此之外,还需要对广大居民及餐饮从业人员加强食品安全教育,使广大人民群众的食品安全意识获得全面提高,生食与熟食分开,避免发生交叉污染。食品监管部门应加强对食物样品的标准化管理和监督,以便对病原菌进行检测。嗜盐性细菌培养法属于嗜盐性细菌培养传统鉴定方法,具有较高的检查的效能且对技术水平要求相对较

低,应用价值较高^[11-12]。

综上所述,在大连地区海产品副溶血性弧菌检测中应用嗜盐性细菌培养检测副溶血性弧菌检出率较高,而且毒力鉴定结果表明副溶血性弧菌毒力较强,容易诱发食物中毒,相关部门有必要加强海产品副溶血性弧菌检验以使广大居民的饮食安全获得保证。

参考文献

- [1] WU XF, YAN W, CHEN LP, *et al.* Analysis of pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in food-borne diarrhea cases in Huzhou City, Zhejiang Province in 2021 [J]. Chin J Health Lab Technol, 2023, 33(06): 685-687.
- [2] 邓锦秀. 2022年食品中金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌的检测能力验证结果分析 [J]. 食品安全导刊, 2023, (27): 67-70.
- [3] PAUDYAL N, PAN H, LIAO X, *et al.* A meta-analysis of major foodborne pathogens in Chinese food commodities between 2006 and 2016 [J]. Foodborne Pathog Dis, 2018, 15(04): 187-197.
- [4] JIANG Y, CHU Y, XIE G, *et al.* Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 290: 116-124.
- [5] PRUENTE VL, JONES JL, MCGOUGH MD, *et al.* Effects of tumbling, refrigeration, and resubmersion on *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* levels in North Carolina cultured oysters (*C. virginica*) [J]. Aquaculture, 2022, 5(08): 546-552.
- [6] 罗心怡, 丁清龙, 周露. 两种副溶血性弧菌检测方法的比对 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(16): 5520-5523.
- [7] WHO. Advances in science and risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* associated with seafood [M]. FAO: Rome, Italy, 2021.
- [8] SHI C, YU L, WANG Y, *et al.* Detection and traceability analysis of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Qinhuangdao City [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(09): 3503-3507.
- [9] KONG LH, HE L, TANG M, *et al.* Traceability and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in two food poisoning incidents [J]. Clin Prev Med, 2022, 1(02): 1-12.
- [10] CHEN LN, LI F, SUN SQ, *et al.* Species diversity of culturable halophilic microorganisms isolated from Dingyuan salt mine, Anhui [J]. Microbiol China, 2019, 46(09): 2186-2197.
- [11] SONG XY, WANG YR, GUO L, *et al.* Application and improvement of swift quantitative microbiological risk assessment 2 tool in risk ranking of *Vibrio parahaemolyticus* in difference categories of seafood [J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(01): 83-87.
- [12] IBEKWE MA, MURINADA SE, PARK S, *et al.* Comparative use of quantitative PCR (qPCR), droplet digital PCR (ddPCR), and recombinase polymerase amplification (RPA) in the detection of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in environmental samples [J]. Water, 2020, 12(12): 3507

作者简介



郭艳飞, 微生物副主任技师, 微生物检验科
员, 研究方向为微生物检验相关方面。