



版本号
PCR-39-1CH

食品微生物副溶血性弧菌检验及 注意事项 GB 4789.7-2013

一、副溶血性弧菌的生物学特性

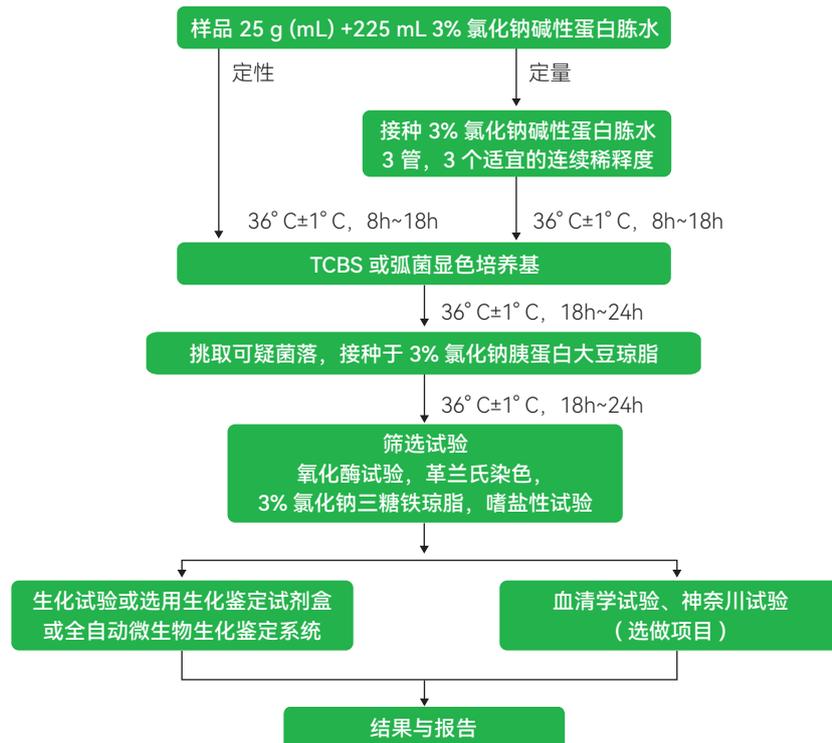
副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 属于弧菌科弧菌属, 革兰氏阴性, 无芽孢, 呈弧状、杆状、卵圆状等多种形态, 单端鞭毛; 兼性厌氧菌, 嗜盐、对葡萄糖、甘露醇、麦芽糖等发酵产酸。

流行病学特征

主要存在于温带地区海水、海水沉积物和鱼虾、贝类等海产品中, 是沿海国家及地区食物中毒的主要致病菌, 主要污染水产制品或交叉污染肉制品等其他食品, 人食用这些生、半生或交叉污染的海产品可能导致急性肠胃炎、关节炎等, 有时甚至引起原发性败血症。

副溶血性弧菌的检验

二、检验步骤



流程图 8-1 副溶血性弧菌检验程序

三、操作步骤

3.1 样品制备

3.1.1 非冷冻样品采集后应立即置 7 °C ~ 10 °C 冰箱保存, 尽可能及早检验; 冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2 °C ~ 5 °C 不超过 18 h 解冻。

3.1.2 鱼类和头足类动物取表面组织、肠或鳃。贝类取全部内容物, 包括贝肉和体液; 甲壳类取整个动物, 或者动物的中心部分, 包括肠和鳃。如为带壳贝类或甲壳类, 则应先在自来水中洗刷外壳并甩干表面水分, 然后以无菌操作打开外壳, 按上述要求取相应部分。

3.1.3 以无菌操作取样品 25 g (mL), 加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min, 或拍击式均质器拍击 2 min, 制备成 1:10 的样品匀液。如无均质器, 则将样品放入无菌乳钵, 自 225 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中取少量稀释液加入无菌乳钵, 样品磨碎后放入 500 mL 无菌锥形瓶, 再用少量稀释液冲洗乳钵中的残留样品 1 ~ 2 次, 洗液放入锥形瓶, 最后将剩余稀释液全部放入锥形瓶, 充分振荡, 制备 1:10 的样品匀液。



3.2 增菌

3.2.1 定性检测

将 3.1.3 制备的 1:10 样品匀液于 36 °C ±1 °C 培养 8 h ~ 18 h。

3.2.2 定量检测

3.2.2.1 用无菌吸管吸取 1:10 样品匀液 1 mL，注入含有 9 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管内，振摇试管混匀，制备 1:100 的样品匀液。

3.2.2.2 另取 1 mL 无菌吸管，按 5.2.2.1 操作程序，依次制备 10 倍系列稀释样品匀液，每递增稀释一次，换用一支 1 mL 无菌吸管。

3.2.2.3 根据对检样污染情况的估计，选择 3 个适宜的连续稀释度，每个稀释度接种 3 支含有 9 mL 3% 氯化钠碱性蛋白胨水的试管，每管接种 1 mL。置 36 °C ±1 °C 恒温箱内，培养 8 h ~ 18 h。

3.3、分离培养

对所有显示生长的增菌液，用接种环在距离液面以下 1cm 内沾取一环增菌液，于 TCBS 平板或弧菌显色培养基平板上划线分离。一支试管划线一块平板。于 36 °C ±1 °C 培养 18h ~ 24h。典型的副溶血性弧菌在 TCBS 上呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落，用接种环轻触，有类似口香糖的质感，直径 2mm ~ 3mm。从培养箱取出 TCBS 平板后，应尽快（不超过 1h）挑取菌落或标记要挑取的菌落。典型的副溶血性弧菌在弧菌显色培养基上的特征按照产品说明进行判定。

3.3.1、氧化酶试验：挑选纯培养的单个菌落进行氧化酶试验，副溶血性弧菌为氧化酶阳性。

3.3.2、涂片镜检：将可疑菌落涂片，进行革兰氏染色，镜检观察形态。副溶血性弧菌为革兰氏阴性，呈棒状、弧状、卵圆状等多形态，无芽胞，有鞭毛。

3.3.3、挑取纯培养的单个可疑菌落，转种 3% 氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层，36 °C ±1 °C 培养 24h 观察结果。副溶血性弧菌在 3% 氯化钠三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色不变或红色加深，有动力。

3.3.4、嗜盐性试验：挑取纯培养的单个可疑菌落，分别接种 0%、6%、8% 和 10% 不同氯化钠浓度的胰胨水，36 °C ±1 °C 培养 24h，观察液体混浊情况。副溶血性弧菌在无氯化钠和 10% 氯化钠的胰胨水中不生长或微弱生长，在 6% 氯化钠和 8% 氯化钠的胰胨水中生长旺盛，继续进行下列有关试验。

3.3.5、生化试验：取纯培养物分别接种含 3% 氯化钠的甘露醇试验培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、MR-VP 培养基，36 °C ±1 °C 培养 24h ~ 48h 后观察结果；3% 氯化钠三糖铁琼脂隔夜培养物进行 ONPG 试验。

操作注意事项

- 1、样本在收集后应该立即被冷却 (7~10 °C)，然后尽快检验，
- 2、带贝壳类或甲壳类样品前处理时，应先在符合生活饮用水卫生标准的流水中洗刷外壳并甩干表面水分，然后以无菌操作打开外壳后取样；
- 3、注意分离时所选增菌液的部位，副溶血性弧菌在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中增菌后呈均匀混浊生长，培养基表面容易形成菌膜，分离时，要求“液面以下 1cm 内”在这个范围内，应该目标菌最多、没有干扰的区域；
- 4、一般样品中含有多种弧菌比较常见，分离时一定要在平板上多级稀释划线，不要一条线划线到底，培养出来发现没有分开。

3.4 培养基原理解析

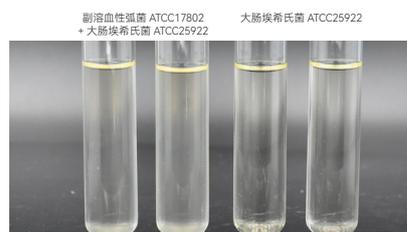
3% 氯化钠碱性蛋白胨水

蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。

3.5 硫代硫酸盐 - 柠檬酸盐 - 胆盐 - 蔗糖 (TCBS) 琼脂

· 配方中多价蛋白胨、酵母膏粉提供碳氮源、维生素和生长因子；氯化钠可刺激弧菌的生长；蔗糖是可发酵的糖类；胆酸钠、牛胆汁粉、硫代硫酸钠和柠檬酸钠及较高的 pH 可抑制革兰氏阳性菌和大肠菌群；硫代硫酸钠与柠檬酸铁反应作为检测硫化氢产生的指示剂；溴麝香草酚蓝和麝香草酚蓝是 pH 指示剂；琼脂是培养基的凝固剂。

· 副溶血性弧菌不发酵蔗糖，不会使培养基 pH 降低，因而在该培养基上为绿色菌落，创伤和拟态弧菌都不发酵蔗糖，需进一步确证鉴定，霍乱弧菌发酵蔗糖为黄色。

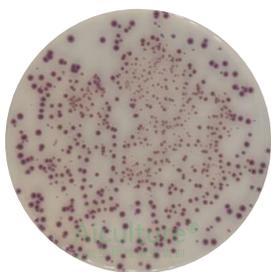


副溶血性弧菌
蓝绿色呈圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落，
H₂S 阴性

图 8-1

3.6 弧菌显色培养基

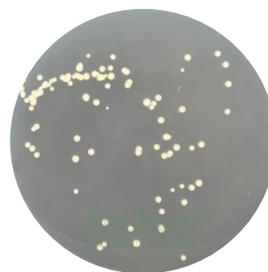
· 配方中蛋白胨和酵母膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；蔗糖为可发酵的糖类；抑菌剂抑制大部分非弧菌细菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；混合色素与副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上产生品红色菌落（副溶血性弧菌）和绿-蓝绿色的菌落（霍乱弧菌和创伤弧菌）。



副溶血性弧菌 ATCC17802



霍乱弧菌 VbO



副溶血性弧菌 ATCC17802

图 8-2

3.7 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

· 胰蛋白胨、大豆蛋白胨提供氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长；琼脂为凝固剂。

3.8 氧化酶试验

原理：氧化酶使细胞色素 C 氧化，氧化型细胞色素 C 再氧化对苯二胺试剂形成紫色复合物，产生颜色反应。

操作：滴加 1 滴氧化酶试剂到一小块洁净滤纸上，用玻棒或接种环（铂或塑料）挑取适量新鲜菌苔涂在试剂润湿的纸片上；30 秒内出现蓝紫色为阳性，延迟反应或无颜色变化为阴性



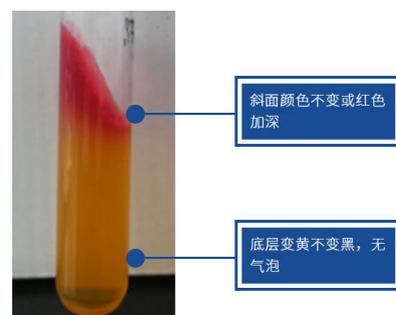
阳性

阴性

图 8-3

3.9 3%氯化钠三糖铁琼脂

· 蛋白胨、牛肉膏粉提供氮源、维生素、矿物质；乳糖、葡萄糖、蔗糖为可发酵糖类，其产酸时通过酚红指示剂测出，酸性呈黄色，碱性呈红色；硫代硫酸钠可被某些细菌还原为硫化氢，与硫酸亚铁中的铁盐生成黑色硫化铁；较高含量的氯化钠维持弧菌均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂。



斜面颜色不变或红色加深

底层变黄不变黑，无气泡

副溶血性弧菌在 3%氯化钠三糖铁琼脂上的特征

图 8-4

附录 A

3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证

1、产品用途：用于副溶血性弧菌增菌培养。

2、检验原理：蛋白胨提供碳源、氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠和高 pH 值可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长。

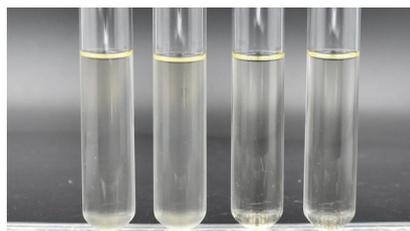


表 8-1：3% 氯化钠碱性蛋白胨水验证。

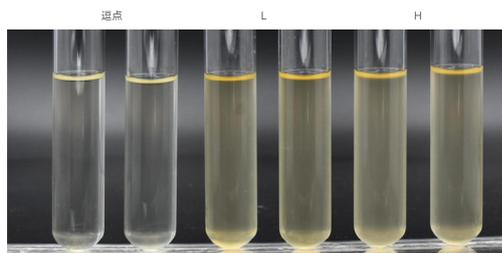
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
3% 氯化钠碱性蛋白胨水	副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	113CFU(副溶血性弧菌 ATCC17802) +2367CFU(大肠埃希氏菌 ATCC25922)	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落	在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落	符合
		L 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落		符合
		H 品牌	/		在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	2367CFU	5CFU	在 TSA 上 < 100CFU	符合
		L 品牌	/		多不可计		不符合
		H 品牌	/		多不可计		不符合

1. 副溶血性弧菌 ATCC17802 + 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水上的菌落特征：品红色菌落；
2. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水上的菌落特征：在 TSA 上 < 100CFU；

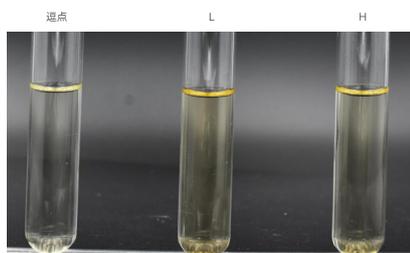
3、典型特征图片：



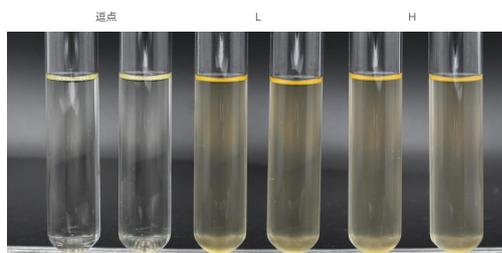
逗点 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌后现象



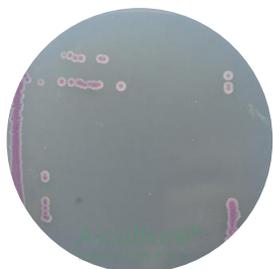
副溶血性弧菌 ATCC17802+ 大肠埃希氏菌 ATCC25922 3% 氯化钠碱性蛋白胨水竞品比对



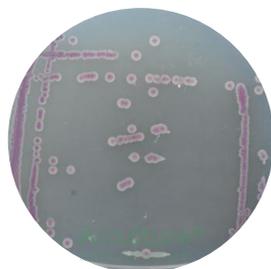
3% 氯化钠碱性蛋白胨水空白竞品比对



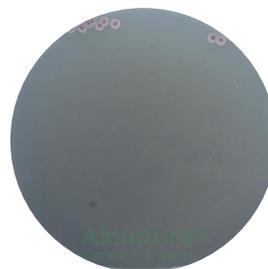
大肠埃希氏菌 ATCC25922 3% 氯化钠碱性蛋白胨水竞品比对



逗点混菌划线弧菌显色板



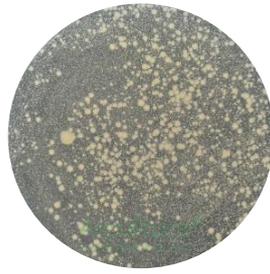
L 品牌混菌划线弧菌显色板



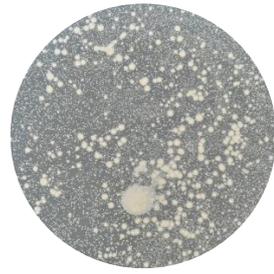
H 品牌混菌划线弧菌显色板



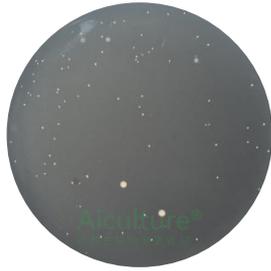
逗点大肠埃希氏菌倾注 TSA



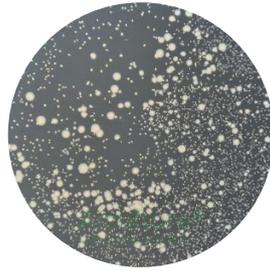
L 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



H 品牌大肠埃希氏菌倾注 TSA



副溶血性弧菌 ATCC17802 计数 TSA



大肠埃希氏菌 ATCC25922 计数 TSA

图 8-5

4、验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802，L 品牌、H 品牌、逗点均满足国标在弧菌显色培养基平板上 > 10CFU，品红色菌落。L 品牌目标菌生长率最好，H 品牌最差，逗点生长率在 L 品牌、H 品牌之间。

4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点均符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求，L 品牌、H 品牌不符合国标在 TSA 上 < 100CFU 要求。

附录 B

弧菌显色培养基验证

1. 产品用途：用于弧菌特别是副溶血性弧菌的分离和初步鉴定。

2. 检验原理：蛋白胨和酵母膏粉提供氮源、维生素、氨基酸和碳源；蔗糖为可发酵的糖类；抑菌剂抑制大部分非弧菌细菌，氯化钠可维持均衡的渗透压；琼脂是培养基的凝固剂；混合色素与副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌所对应的酶发生特异性反应，水解底物，释放出显色基团，在淡黄色平板上产生品红色菌落（副溶血性弧菌）和绿 - 蓝绿色的菌落（霍乱弧菌和创伤弧菌）。

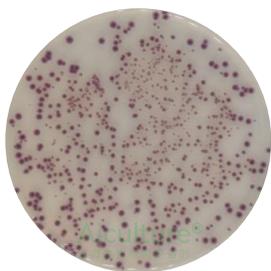
表 8-2：弧菌显色培养基验证



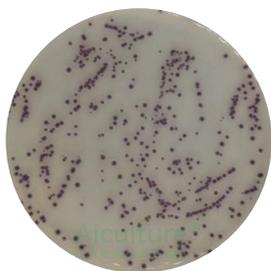
样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
弧菌显色培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	442	308	PR=1.4	PR ≥ 0.5	符合
		H 品牌	389		PR=1.3		符合
	霍乱弧菌 VbO	逗点	/	/	蓝绿色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	蓝色菌落	/	符合
	溶藻弧菌 ATCC33787	逗点	/	/	白色菌落	/	符合
		H 品牌	/	/	无色，不扩散	/	符合
大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合	
	H 品牌	/	/	G=0		符合	

1. 逗点副溶血性弧菌 ATCC17802 在弧菌显色板上的菌落特征：呈紫红色菌落，生长良好；H 品牌溶血性弧菌 ATCC17802 在弧菌显色板上的菌落特征：品红色菌落；
2. 逗点霍乱弧菌 VbO 在弧菌显色板上的菌落特征：蓝绿色菌落；H 品牌霍乱弧菌 VbO 在弧菌显色板上的菌落特征：蓝色菌落；
3. 逗点溶藻弧菌 ATCC33787 在弧菌显色板上的菌落特征：白色菌落；H 品牌溶藻弧菌 ATCC33787 在弧菌显色板上的菌落特征：无色，不扩散；
4. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在弧菌显色板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

3、典型特征图片：



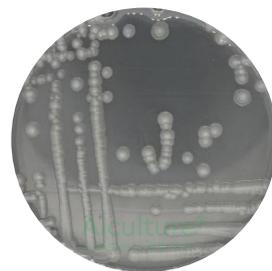
逗点副溶血性弧菌 ATCC17802



H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



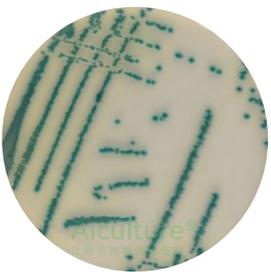
逗点溶藻弧菌 ATCC33787



H 品牌溶藻弧菌 ATCC33787



逗点霍乱弧菌 VbO



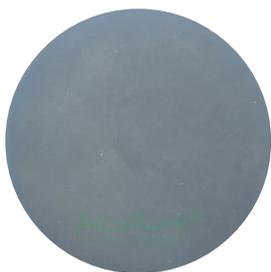
H 品牌霍乱弧菌 VbO



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌黄色葡萄球菌 ATCC6538



逗点弧菌显色培养基空白



H 品牌弧菌显色培养基空白

图 8-6

4、验证结果小结：

- 4.1 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802、逗点、H 品牌均满足国标 $PR \geq 0.7$ 的要求。H 品牌菌落生长速度更快；
- 4.2 选择性：大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、H 品牌均满足国标 $G \leq 1$ 的要求；
- 4.3 特异性：霍乱弧菌 VbO、溶藻弧菌 ATCC33787 逗点、H 品牌均满足菌落颜色特征要求
- 4.4 感观：两家平板颜色无显著差异。

附录 C

3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证



1. 产品用途：用于副溶血性弧菌的培养。

2. 检验原理：胰蛋白胨、大豆蛋白胨提供氮源、维生素、生长因子；高含量氯化钠可以抑制非弧菌类细菌生长，不影响副溶血性弧菌生长；琼脂为凝固剂。

表 8-3：3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数 (CFU)	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基	副溶血性弧菌 ATCC17802	逗点	79	62	PR=1.3	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	44		PR=0.7		符合
		H 品牌	92		PR=1.5		符合
	创伤弧菌落 ATCC 27562	逗点	312	370	PR=0.8	PR ≥ 0.7	符合
		L 品牌	490		PR=1.3		符合
		H 品牌	450		PR=1.2		符合

1. 副溶血性弧菌 ATCC17802 在 3%TSA 板上的菌落特征：生长率 PR ≥ 0.7；
2. 创伤弧菌落 ATCC 27562 在 3%TSA 板上的菌落特征：生长率 PR ≥ 0.7；

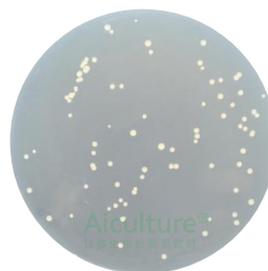
3. 典型特征图片：



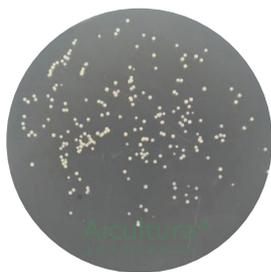
逗点副溶血性弧菌 ATCC17802



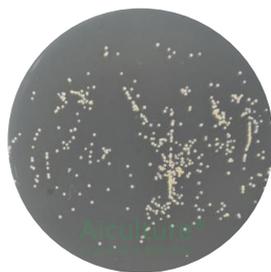
L 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



H 品牌副溶血性弧菌 ATCC17802



逗点创伤弧菌落 ATCC 27562



L 品牌创伤弧菌落 ATCC 27562



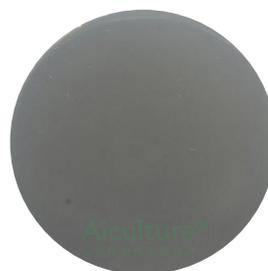
H 品牌创伤弧菌落 ATCC 27562



逗点 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白



L 品牌 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白



H 品牌 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂空白

图 8-7

4. 验证结果小结：

4.1 生长率：目标菌副溶血性弧菌 ATCC17802、创伤弧菌落 ATCC 27562，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR ≥ 0.7 的要求；

4.2 感观：三家平板颜色无显著差异。

COMPANY PROFILE

企业简介

逗点生物 (Biocomma) 成立于 2006 年, 总部位于深圳, 主营生命科学和医疗健康产品的研发、生产和销售, 业务遍布五十多个国家和地区。

公司为食品和临床检测提供样本前处理解决方案, 包括过滤耗材、色谱耗材和微生物培养基。同时为生命科学研发和生产型厂家提供滤芯、拭子、试剂瓶、无菌液体和培养基等产品。努力让世界更健康, 更美好。



逗点生物公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

WSW-01-002CH

深圳逗点生物技术有限公司
Biocomma Limited

地址: 深圳市龙岗区吉华街道甘坑社区甘李六路 12 号中海信创新产业城 12 栋 14 楼 1401-1406

TEL: 400-878-7248 WEB: www.biocomma.cn EMAIL: info@biocomma.com