

出口食品副溶血性弧菌检验方法

Method for detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in Food for export

SN 0173—92

代替ZB X04002—86

1 主题内容与适用范围

本标准规定了海产食品中副溶血性弧菌检验方法。

本标准适用于海产食品中副溶血性弧菌检验，其他食品可参照使用。

2 设备与材料

- 2.1 试管：17mm×170mm、15mm×150mm、10mm×100mm。
- 2.2 吸管：1mL、10mL。
- 2.3 培养皿：直径90mm。
- 2.4 广口瓶或三角瓶。
- 2.5 电动均器。
- 2.6 电动试管振荡器。
- 2.7 37℃恒温箱。
- 2.8 42℃恒温水浴箱。
- 2.9 试管架。

3 培养基及试剂

- 3.1 30g/L氯化钠稀释液：见9.1。
- 3.2 60g/L氯化钠蛋白胨水(PW)：见9.2。
- 3.3 氯化钠多粘菌素B肉汤(SPB)：见9.3。
- 3.4 硫代硫酸钠、柠檬酸钠、胆盐、蔗糖琼脂(TCS)：见9.4。
- 3.5 氯化钠三糖铁琼脂(TSI)：见9.5。
- 3.6 嗜盐性试验用胰胨水(TB)：见9.6。
- 3.7 胰酪大豆琼脂斜面(TSA)：见9.7。
- 3.8 氨基酸试验用培养基(I)：见9.8。
- 3.9 氨基酸试验用培养基：见9.9。
- 3.10 V-P半固体琼脂(VP)：见9.10。
- 3.11 糖分类分解试验用培养基：见9.11。
- 3.12 42℃生长试验用培养基：见9.12。
- 3.13 O/F试验用培养基(OLGB)：见9.13。
- 3.14 神奈川现象试验用费氏琼脂(WA)：见9.14。

4 样品制备

- 4.1 冷冻样品应在45℃以下不超过15 min或在2~5℃不超过18 h解冻。若不能及时检验，应放于-15℃左右保存；非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验，若不能及时检验，应置于6~10℃冰箱保存，在24h内检验。
- 4.2 取样：以无菌操作进行。
- 4.2.1 鱼类：取鱼体不同部位。
- 4.2.2 贝类：取内脏或含内脏的全部内脏；如为带壳贝类，则应先在清洁的流水中洗刷净外壳，然后以无菌操作打开贝壳，取出内脏或含内脏的全部肌肉和贝壳。
- 4.2.3 甲壳类：取包括鳃及肠的部分或整体。
- 4.3 以无菌操作称取50g试样放于均质杯中，以灭菌剪刀充分剪碎。

4.4 加30g/L氯化钠稀释水450mL，均质(8 000r/min)1 min，使成1:10稀释液(如无均质器，则应以剪刀尽量剪碎，加450mL稀释水使成1:10稀释液，并充分振荡)。

- 4.5 用1 mL灭菌吸管吸取1:10稀释液1mL，注入装有9mL30g/L氯化钠稀释水的试管内，振荡试管混合均匀，制成1:100稀释液。
- 4.6 每一稀释度换取1支1 mL灭菌吸管，按上项操作顺序进行10倍递增稀释。稀释倍数要依据有关标准、规定、要求或样品污染情况而定。

5 增殖培养与分离

5.1 对新鲜样品，可选择3个连续适宜的稀释度，分别以1 mL灭菌吸管各吸取1 mL稀释液，接种10mL单料氯化钠多粘菌素B肉汤中，进行选择性的增殖培养，每一稀释度接种3管(若选择的稀释度为接种1g样品时，则应以10mL灭菌吸管吸取1:10稀释液10mL，接种10mL双料氯化钠多粘菌素B肉汤中)。

对经加热、辐射处理或冷藏、冻结的样品，可按以上操作先将样品接种于60g/L氯化钠蛋白胨水于37℃前增菌18~24h，然后将培养物以接种环转种到氯化钠多粘菌素B肉汤中进行选择性增殖。

- 5.2 37℃培养18~24h。
- 5.3 氯化钠多粘菌素B肉汤如有菌生长，则以3mm直径接种环分别取一环菌液，划线于硫代硫酸钠、柠檬酸钠、胆盐、蔗糖琼脂(TCS)平板上。
- 5.4 37℃培养18~24h。
- 5.5 副溶血性弧菌在蔗糖琼脂(TCS)平板上的典型菌落呈圆形，边缘整齐、湿润、稍混浊、半透明，多数具尖心、斗笠状，蓝绿色菌落，直径2~4mm。

6 生化鉴定

- 6.1 在蔗糖琼脂(TCS)平板上如出现典型或可疑菌落，每个平板至少挑取两个菌落，每个菌落分别顺次接种到下列培养基进行鉴别试验。
 - 6.1.1 无盐胰胨水。
 - 6.1.2 30g/L氯化钠胰胨水。
 - 6.1.3 氯化钠三糖铁琼脂：先穿刺后划线。
 - 6.1.2 37℃培养18~24h。
- 6.3 选取在氯化钠三糖铁斜面上产碱，在底是产酸，不产气，不产硫化氢；在无盐胰胨水中几乎不生长；在30g/L氯化钠胰胨水中生长旺盛的菌株进行革兰氏染色、镜检，副溶血性弧菌为革兰氏阴性，呈棒状、弧状、卵圆状等多形态，两端浓染、无芽胞。如符合，继续进行以下生化鉴定。
 - 6.3.1 嗜盐性试验：各取一环30g/L氯化钠胰胨水培养物，分别接种到70g/L及100g/L氯化钠胰胨水中，37℃培养18~24h。
 - 6.3.2 细胞色素氧化酶试验：取一环30g/L氯化钠胰胨水培养物划线到胰酪大豆琼脂斜面上，37℃培养18~24h。
 - 6.3.3 赖氨酸脱羧酶试验：在6.1.2的30g/L氯化钠胰胨水培养物中加赖氨酸试剂后观察反应。
 - 6.3.4 赖氨酸脱羧酶试验：由氯化钠三糖铁斜面以接种针取少许培养物接种到赖氨酸试验用培养基中，37℃培养18~24h。
 - 6.3.5 精氨酸双水解酶试验：按上项同样操作，将培养物接种到精氨酸试验用培养基中，37℃培养18~24 h。
 - 6.3.6 V-P试验：以接种针由氯化钠三糖铁斜面取少许培养物穿刺V-P半固体琼脂，37℃培养18~24h。在加V-P试剂前应先观察动力。沿穿刺线周围呈扩散性生长为动力阳性。
 - 6.4 副溶血性弧菌生化特性的判定及进一步试验如下。
 - 6.4.1 如所分离的菌株符合表1特性，按第7章报告结果。

表1 副溶血性弧菌的生化特性

鉴定程序	生化项目	反应
初筛	氯化钠三糖铁	
	斜面	产碱
	底层	产酸，不产气
	硫化氢	阴性
	嗜盐性	
生化鉴别	无盐胰胨水	几乎不生长
	30g/L氯化钠胰胨水	生长旺盛
	70g/L氯化钠胰胨水	明显生长
	100g/L氯化钠胰胨水	几乎不生长
	氨基酸	阳性
	V-P	阴性
	动力	阳性
扩大生化鉴别	细胞色素氧化酶	阳性
	赖氨酸脱羧酶	阳性
	精氨酸双水解酶	阳性
	42℃生长	阴性
	蔗糖	不分解
	O/F试验	发酵型

- 6.4.2 如表1生化项目(扩大生化试验项目除外)中，仅有一项生化试验不符合时，按以下步骤做进一步鉴定。
 - 6.4.2.1 蔗糖分解试验，42℃生长试验，O/F试验。如仍符合副溶血性弧菌特性，可按第7章报告结果，如果其中有一项不符合，即可排除。
 - 6.4.2.2 副溶血性弧菌与有关细菌的鉴别可参考表2进行。

表2 副溶血性弧菌与有关细菌鉴别表

试验	副溶血性弧菌	溶藻弧弧菌	鳃弧菌	创伤弧菌	河弧菌	麦氏弧菌	嗜水气单胞菌	类志贺邻单胞菌
TCBS(蓝绿色菌落)	+	-	-	+	-	-	-	+
42℃生长	+	+	-	-	v	v	-	-
盐耐变异性试验(生长)								
0%氯化钠	-	-	-	-	-	-	+	+
60g/L氯化钠	+	+	+	+	+	+	-	-
80g/L氯化钠	+	+	v	-	+	v	-	-
100g/L氯化钠	-	+	-	-	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	-	+	-	V	-	+
精氨酸双水解酶	-	-	V	-	+	+	V	+
鸟氨酸脱羧酶	+	V	-	V	-	-	-	V
蔗糖发酵	-	+	+	-	+	+	V	-
乳糖发酵	-	-	-	+	-	V	V	V
甘露醇发酵	+	+	+	V	+	+	+	-
阿拉伯糖发酵	+	-	-	-	+	-	V	-
V-P试验	-	+	v	-	+	+	V	-

注：空白处表示未试验；v表示可变的。

7 报告结果

生化试验符合副溶血性弧菌特性的菌株，按增菌培养阳性管数，应用表3(管法)，查出每100g样品中的副溶血性弧菌MPN值。检验结果报告为每100g样品中副溶血性弧菌的最近似值为××个。

表3 每克样品中的最近似值(管法MPN)

阳性管数			MPN	阳性管数			MPN
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3	1	0	0	3.6
0	0	1	3	1	0	1	7.2
0	0	2	6	1	0	2	11
0	0	3	9	1	0	3	15
0	1	0	3	1	1	0	7.3
0	1	1	6.1	1	1	1	11
0	1	2	9.2	1	1	2	15
0	1	3	12	1	1	3	19
0	2	0	6.2	1	2	0	11
0	2	1	9.3	1	2	1	15
0	2	2	12	1	2	2	20
0	2	3	16	1	2	3	24
0	3	0	9.4	1	3	0	16
0	3	1	13	1	3	1	20
0	3	2	16	1	3	2	24
0	3	3	19	1	3	3	29
2	0	0	9.1	3	0	0	23
2	0	1	14	3	0	1	39
2	0	2	20	3	0	2	64
2	0	3	28	3	0	3	95
2	1	0	15	3	1	0	43
2	1	1	20	3	1	1	75
2	1	2	27	3	1	2	120
2	1	3	34	3	1	3	160
2	2	0	21	3	2	0	93
2	2	1	28	3	2	1	150
2	2	2	35	3	2	2	210
2	2	3	42	3	2	3	290
2	3	0	29	3	3	0	240
2	3	1	36	3	3	1	460
2	3	2	44	3	3	2	1100
2	3	3	53	3	3	3	>1100

注：当报告每100g样品中副溶血性弧菌的最近似值时，可将查表所得数字乘以100。

8 神奈川现象及血清学实验(根据需要可进行)

8.1 神奈川现象试验

- 8.1.1 以接种环将30g/L氯化钠胰胨水培养物点种于充分干燥的费氏琼脂平板上。可先在平板背面以玻璃铅笔划出若干小区，使一个平板能做多次试验。
- 8.1.2 37℃培养18~24h。
- 8.1.3 在24h以内观察结果，阳性结果在菌落周围有一清晰的透明环。

8.2 血清学鉴定：副溶血性弧菌的抗原分为O、K、H三种。血清学分型以O及K抗原进行鉴定。

8.2.1 K抗原凝集试验

- 8.2.1.1 将经生化试验证实为副溶血性弧菌的菌株转种在两支30g/L氯化钠普通琼脂斜面上，37℃培养18h。
- 8.2.1.2 以2mL20g/L氯化钠溶液洗下一支琼脂斜面培养物，制成浓厚悬液。
- 8.2.1.3 先以K多价抗血清进行玻片凝集试验，在1min内观察反应。阳性凝集者，另进行自然凝集试验，若自然凝集试验为阴性，再以该K多价抗血清中的单因子抗血清进行试验。
- 8.2.1.4 与单因子抗血清出现阳性凝集的，为该菌株的相应K抗原。

8.2.2 O抗原凝集试验

- 8.2.2.1 以20g/L氯化钠[含5% (V/V)甘油]溶液洗一支琼脂斜面培养物，将菌悬液经121℃高压灭菌1 h。
- 8.2.2.2 以离心沉淀法去上清液，再以20g/L氯化钠溶液4 000r/min离心15 min，洗两次沉淀后加0.5mL2%氯化钠溶液制成浓厚的菌悬液。
- 8.2.2.3 以已知K抗原对应的O群抗血清进行玻片凝集试验，同时以20g/L氯化钠溶液代替抗血清做自然凝集对照试验。
- 8.2.2.4 与抗血清出现强阳性凝集的，为该菌株的O抗原。
- 8.2.3 根据以上血清学试验结果，可报告为发现副溶血性弧菌O×K×血清型。

9 培养基及试剂

9.1 30g/L氯化钠稀释液

氯化钠	30.0g
蒸馏水	1000mL

加温溶解，调至pH7.0，121℃高压灭菌15min，以无菌操作分装于500mL广口瓶或500mL三角瓶，每瓶450mL及以17mm×170mm试管，每管3mL，做稀释液使用。

9.2 60g/L氯化钠蛋白胨水(PW)

蛋白胨	10.0g
氯化钠	60.0g
蒸馏水	1000mL

将各成分加热溶解，调至pH7.2，分装于17 mm×170 mm试管，每管10 mL。120℃高压灭菌15 min。

9.3 氯化钠多粘菌素B肉汤(SPB)

酵母浸膏	3.0g
蛋白胨	10.0g
氯化钠	20.0g
多粘菌素B	250单位/毫升培养基
蒸馏水	1000mL

将各成分(除多粘菌素B外)加热溶解，稍冷后加入多粘菌素B，调至pH7.4。分装于17 mm×170mm试管，每管10mL。121℃高压灭菌15min。灭菌后，立即将培养基取出放凉。

9.4 硫代硫酸钠、柠檬酸钠、胆盐、蔗糖琼脂(TCS)

酵母浸膏	5.0g
蛋白胨	10.0g
氯化钠	10.0g
柠檬酸钠	10.0g
硫代硫酸钠	10.0g
胆酸钠(以牛胆酸钠代替)	3.0g
牛胆汁粉(以混合胆盐代替)	5.0g
蔗糖	20.0g
柠檬酸铁	1.0g
琼脂	18.0g
溴麝香草酚蓝	0.04g
溴萘香草酚蓝	0.04g
蒸馏水	1000mL

除指示剂外，将各成分加热溶解，调至pH8.6，加入指示剂。此培养基不必高压灭菌，煮沸1~2min，待培养基稍凉后倾注平板。

在该平板上，溶藻弧菌为黄色菌落，而副溶血性弧菌为蓝绿色菌落。肠球菌、变形菌及大肠杆菌等有时也会生长，但其菌落一般较小，易与副溶血性弧菌区分。

9.5 氯化钠三糖铁琼脂(TSI)

牛肉浸膏	3.0g
蛋白胨	20.0g
乳糖	10.0g
蔗糖	10.0g
葡萄糖	1.0g
硫酸亚铁	0.5g
氯化钠	30.0g
琼脂	12.0g
酚红	0.024g

除琼脂和酚红外，将其他成分用蒸馏水400mL加热溶解，同时将琼脂置于600mL蒸馏水中，浸泡数分钟后，加热煮沸使完全溶解。然后将以上两液混合均匀。调至pH7.4，加入指示剂混匀，分装于15 mm×150 mm试管，每管3~4mL，115℃高压灭菌15 min。灭菌后摆成斜面，使高是斜面各约3 cm。

9.6 嗜盐性试验用胰胨水(TB)

胰胨	40.0g
酵母浸膏	12.0g
蒸馏水	4000mL

完全溶解后，分成4份，其中3份分别加入30g、70g、100g氯化钠，使成0%、30g/L、70g/L、100g/L不同浓度的氯化钠胰胨水。调至pH7.5。分装15mm×150mm试管，每管7mL。121℃高压灭菌15min。

9.7 胰酪大豆琼脂斜面(TSA)

胰胨	15.0g
植物蛋白胨	5.0g
氯化钠	30.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	000mL

将各成分加入水中，要不断搅拌，加热至煮沸1 min。分装于15 mm×150 mm试管，每管3 mL。121℃高压灭菌15min后制成斜面，最终pH7.3±0.2。

试剂：10g/L盐酸四甲基对苯二胺水溶液

10g/Lα-萘酚乙醇溶液

将配制好的10g/L盐酸四甲基对苯二胺溶液置于带塞棕色玻璃瓶中，于5~10℃存放。此试剂极易氧化，宜现用现配。试验时，取37℃18~24h的胰酪大豆琼脂斜面培养物1支，将两种试剂各2~3滴从斜面上滴流下，2min内呈现显色者为细胞色素氧化酶试验阳性。

9.8 氨基酸试验用培养基(I)

培养基同9.6的30g/L氯化钠胰胨水。

氨基酸试剂(何凡克(DOYAS)氏试剂)：

对二甲氨基苯甲醛	10.0g
纯丙醇	150.0mL
浓盐酸	60.0mL

将试剂溶于丙醇中，然后慢慢加盐酸。加热至60℃后，呈深黄色，静置6~7h，变成黄色即可使用。试液宜小量配制，冰箱保存。久存后，试液变为黄褐色，不可继续使用。

在30g/L氯化钠胰胨水18~24h培养液中，滴加何凡克试剂0.1mL。出现红色环者为阳性，出现黄棕色环者为阴性。

9.9 氨基酸试验用培养基

9.9.1 赖氨酸脱羧酶培养基(LO)

酵母浸膏	3.0g
葡萄糖	1.0g
氯化钠	30.0g
1-赖氨酸	5.0g
溴甲酚紫	0.016g
蒸馏水	1000mL

除溴甲酚紫外，将各成分加入蒸馏水中，搅拌均匀，静置约10min，加热至完全溶解，调至pH8.7±0.1。分装于10mm×100mm试管，每管1 mL。121℃高压灭菌10min。灭菌后应立即取出放凉，接种培养后，培养基颜色变为深紫色的为阳性反应，变为黄色的为阴性反应。

9.9.2 精氨酸双水解酶试验用培养基(AD)

基础培养基同赖氨酸脱羧酶试验用培养基，精氨酸加入量同赖氨酸量。

9.10 V-P半固体琼脂(VP)

酵母浸膏	1.0g
蛋白胨	12.0g
葡萄糖	10.0g
氯化钠	30.0g
琼脂	3.0g
蒸馏水	1000mL

将各成分加入蒸馏水中，静置约10 min，搅拌、加热至溶解。调pH7.3±0.1，分装于10 mm×100mm试管，每管1 mL。121℃高压灭菌10min。灭菌后，立即取出放凉。

V-P试剂：

甲液：α-萘酚	6.0g
纯乙醇	100.0mL
乙液：氢氧化钾	40.0g
肌酸	0.3g
蒸馏水	100.0mL

先将氢氧化钾溶于水中，再加入肌酸。

以上试剂保存于冰箱中，可使用两个月。试验时，分别加甲液0.2 mL(约0滴)和乙液0.1 mL(约3滴)。加入试剂后呈现红色者为阳性，棕色为阴性。对阴性结果1 h后再做一二次检查。

9.11 糖分类分解试验用培养基

蛋白胨	10.0g
牛肉浸膏	3.0g
氯化钠	30.0g
溴甲酚紫	1000mL
蒸馏水	

除溴甲酚紫外，将各成分加热溶解，按1%量加入糖。调至pH7.0±0.2，加入溴甲酚紫。分装于10mm×100mm试管，每管1mL，112℃高压灭菌15min。

9.12 42℃生长试验用培养基

胰胨	17.0g
大豆胨	3.0g
氯化钠	30.0g
磷酸氢二钾	2.5g
葡萄糖	2.5g
蒸馏水	1000mL

除葡萄糖外，将各成分成混合溶液，煮沸1~2min，加入葡萄糖。调至pH7.3±0.2，分装于15mm×150mm试管，每管1mL，121℃高压灭菌，5min。

9.13 O/F试验用培养基(OLGB)

蛋白胨	2.0g
酵母浸膏	0.5g
氯化钠	30.0g
葡萄糖	10.0g
溴甲酚紫	0.015g
琼脂	3.0g
蒸馏水	