

论著

应用纤维膜过滤方法从鱼肠内容物中分离到一株布氏弓形杆菌

骆海朋

(北京市疾病预防控制中心 营养与食品卫生所,北京 100013)

摘要:目的 建立弓形杆菌的分离培养方法。方法 通过纤维滤膜过滤的方法对菌悬液过滤,用 CCDA 平板对弓形杆菌进行分离培养。将分离到的可疑菌落进行分纯培养,然后通过生化和 16S rRNA 序列分析进行鉴定。结果 从鱼肠内容物中分离到一株疑似菌株,对其进行表型生化分析和 16S rDNA 全序列分析,鉴定该菌为布氏弓形杆菌。结论 该检验方法适用于对弓形杆菌进行分离培养。

关键词:布氏弓形杆菌;分离培养;鱼

中图分类号:R117;Q939.39 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)02-0109-04

Isolation of a Strain of *Arcobacter butzleri* from the Content of Fish Intestine

LUO Hai-peng

(Institute of Nutritional and Food Hygiene, Beijing Centers for Diseases Control and Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective To explore a method for screening *Arcobacter* spp. **Method** Filtering the suspensions containing *Arcobacter* with a fiber filter membrane technique, and using CCDA plates to isolate the strain. **Results** One suspected strain was isolated from fish. The phenotype characters and 16S rDNA of this strain were analyzed and identified as *Arcobacter butzleri*. **Conclusion** The method is reliable for screening *Arcobacter* spp.

Key words: *Arcobacter*; Isolation; Fish

弓形杆菌属过去被划分到弯曲菌属,这类细菌的很多特征与弯曲菌相似,如在微需氧条件下生长最佳、氧化酶阳性、具有鞭毛能够快速穿梭运动,但弓形杆菌在普通的大气环境下也能够培养,同时在菌体形态上也与弯曲菌有明显区别。布氏杆菌(*Arcobacter butzleri*)的名称过去为布氏弯曲杆菌(*Campylobacter butzleri*),1977年从流产的牛胎中分离到该菌。Vandamme 根据 DNA-rRNA 杂合法, DNA-DNA 杂合法表型分析及测定 DNA 碱基比,认为“*C. butzleri*”应该列入一个新的属 *Arcobacter* 即弓形杆菌属,建立了弓形杆菌属^[1]。弓形杆菌属主要包括嗜低温弓形杆菌(*Arcobacter cryaerophilus*)、布氏弓形杆菌(*Arcobacter butzleri*)、硝化弓形杆菌(*Arcobacter nitrofigilis*)、斯氏弓形杆菌(*Arcobacter skirrowii*)和 *Arcobacter sulfidicus*。

弓形杆菌为革兰氏阴性的弧状杆菌,不形成芽孢,大小 $0.2 \sim 0.9 \times 0.5 \sim 3 \mu\text{m}$,在菌体生长时间过长时会变成球形或半球形,具有极鞭毛,可以快速穿梭运动。微需氧条件下生长最佳,但也能够耐受

有氧的环境。15~30℃条件下能生长,但是4℃条件下不能生长,代谢为呼吸型,对糖类不发酵,氧化酶阳性,硝酸盐还原为阴性,马尿酸水解实验阴性,吡嗪酰胺水解酶阴性,麦康凯琼脂上能够生长。这个属是非常特别的一类菌,除了与人类和动物的腹泻有关,有的还与植物的固氮有关,有的还可以还原硫,在自然界中的作用还不是很清楚。尽管这个属主要被认为与人类和动物的感染相关,但是在其他环境,如水体、污泥、油田、含盐的环境中也能分离到,其作用还不太清楚。布氏弓形杆菌可以从动物性食品中分离到,禽类被认为是最大的储存库,但在水产品和生牛奶中的分布还不太清楚。有关鱼肠道中该菌的存在尚未见报道^[1]。

弓形杆菌属与人类的胃肠炎有关,与畜类的胃肠炎和流产有关。在发展中国家,未处理的水是一个潜在的感染源;在工业化国家,最重要的人类感染源可能是食品。从鸡、牛、鹅、火鸡和猪中可以分离到该菌,禽类中流行性较高。对人感染的研究相对较少。Taylor^[2]鉴定在泰国儿童的腹泻样本中布氏弓形杆菌占2.4%。Vandenberg^[3]报道,在人便样本中布氏弓形杆菌在类弯曲菌的种类中排在第4,是一种潜在的食源性致病菌。

收稿日期:2009-12-01

作者简介:骆海朋 男 主管检验师 研究方向为食品微生物检验

E-mail: haipengluo123@sina.com

本文主要根据参考文献^[3]中的方法来设计分离培养的方法,通过对鸡、鸭、猪粪便和鱼肠道内容物等对弓形杆菌进行分离培养,摸索该菌分离培养的方法。

1 材料及方法

1.1 样本

猪、鸡、鸭的新鲜粪便各 10 份,采自房山区阎村镇的个体养殖户。淡水鱼的肠内容物 10 份,采自昌平区某农贸市场。

1.2 培养基

CCDA 琼脂平板(英国 OXOID),血平板(北京赛莫飞舍尔生物技术公司)。

1.3 微需氧条件

微需氧产气袋(法国生物梅里埃)放到厌氧盒(法国生物梅里埃)制造微需氧环境。

1.4 0.45 μm 微孔纤维滤膜(上海兴亚净化材料厂)

1.5 分离培养方法

取适量新鲜粪便于中试管,加入约 10 ml 生理盐水充分振荡混匀,制成菌悬液。将 0.45 μm 微孔纤维滤膜贴于 CCDA 平板表面,将粪便的上清液取约 0.5 ml 滴加到滤膜表面,静置约 15 min。取下滤膜,放置于 30 °C 恒温培养箱培养 2~3 d。挑取可疑菌落进行纯培养分析。

1.6 微需氧条件下生长的鉴定

将可疑菌接种于血平板,于 36 °C 微需氧环境培养 24 h,同时也放到有氧环境培养 24 h,进行观察比较。

1.7 形态及运动能力观察

通过革兰氏染色,在油镜下观察菌体的形态特征。用营养肉汤的增菌液在暗视野显微镜下观察其运动能力。

1.8 生化鉴定

通过 API20E 试剂条做普通的生化反应,包括 ONPG、ADH、LDC、ODC、CIT、H₂S、URE、TDA、IND、VP、GEL、GLU、MAN、INO、SOR、RHA、SAC、

RHA、SAC、MEL、AMY、ARA。选取需要的生化项目进行鉴定分析,同时用氧化酶试剂(梅里埃)、触酶试剂(3% 双氧水)作补充生化试验。分别以 25、30、42 °C 做生长温度的试验。接种于麦康凯琼脂平板,做 Mac 生长试验。

1.9 16S rDNA 序列分析样本

将分离的纯培养物,交生物工程(上海)有限公司进行处理。

鉴定方法:根据文献中对该属各个菌的表型生化特征的描述进行,也可以通过该菌 16S rDNA 全序列分析的结果对其进行辅助判断。

2 结果

2.1 分离培养的结果

从鱼肠的内容物中分离到 1 株弓形杆菌,鉴定为布氏弓形杆菌,在鸡、鸭、猪的粪便中没有分离到弓形杆菌。

2.2 形态及动力观察结果

该菌革兰氏染色为阴性,菌体形态为弯曲状的杆菌,见图 1。用营养肉汤接种该菌,过夜培养,于暗视野显微镜下观察其动力,可见快速穿梭的运动。

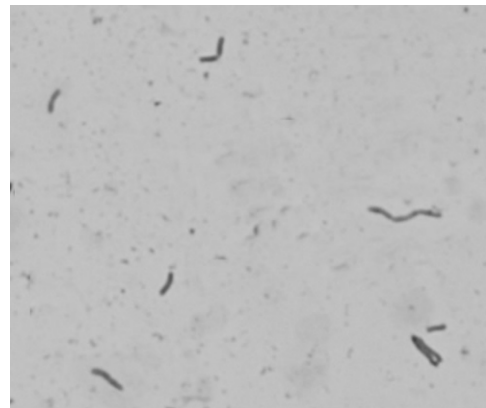


图 1 布氏弓形杆菌在油镜下的形态(×1000)

2.3 微需氧生长试验结果

相对于有氧条件,菌落在微需氧条件下生长较大。

2.4 生化结果(见表 1)

表 1 布氏弓形杆菌的生化实验结果

生化反应	氧化酶	触酶	麦康凯	葡萄糖	甘露醇	肌醇	山梨醇	鼠	李糖	蔗糖	麦芽糖	蜜二糖	阿拉伯糖
结果	+	+	生长	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
生化反应	25 °C	30 °C	42 °C	尿素酶	硫化氢								
结果	生长	生长	生长	-	-								

2.5 16S rDNA 序列分析结果

S110(2)序列如下共 1234 bp
A A TGTA TA GGTA A TA TGCCTCTTA CTA A
GGGA TA A CA A TTGGA A A CGA TTGCTA A TA

CCTTA TA TTCCTTTTTA T CA A A A GA TA A A A
A GGGA A A GA TTTA TTGCTA A GA GA T TA
GCCTGTA TTGTA TCA GTTA GTTGGTGGGGTA A
TG GCCTA CCA A GA CGA TGA CGCA TA A

CTGGTTTGA GA GGA TGA TCA GTCA CA CTGGA A
 CTGA GA CA CGGTCC A GA CTCCTA CGGGA
 GGCA GCA GTGGGA A TA TTG CA CA A TGGA
 CGA A A GTCTGA TGCA GCA A CGCCGC GTGGA
 GGA TGA CA CA TTTCCGTGCGTA A A CTCCTT
 TTA TA TA A GA A GA TA A TGA CGGTA TTA TA
 TGA A TA A GCA CCGGCTA A CTCCGTGCCA GCA
 GCCGCGGTA A T A CGGA GGGTGCA A GCGTTA
 CTCGGA A TCA CTGGG CGTA A A GA GCGTGTA
 GCGGGA TTGA TA A GTTTGA A GTGA A A TCCTA
 TA GCTTA A CTA TA GA A CTGCTTTGA A A A
 CTGTTA A TCTA GA A TGTGGGA GA GGTA GA
 TGGA A TTTCTGGTGTA GGGTA A A A TCCGTA
 GA GA TCA GA A GGA A TA CCGA TTGCGA A
 GGCGA TCTA CTGGA A CA A T A TTGA CGCTGA
 GA CGCGA A A GCGTGGGGA GCA A A C A GGA
 TTA GA TA CCCTGGA GTCCA CGCCCTA A A CGA
 T GTA CA CTA GTTGTGTGA GGCTCGA CCTTGCA
 GTA A T GCA GTTA A CA CA TTA A GTGTA
 CCGCCTGGGGA GTA CG CTCGCA A GA TTA A A A
 CTCA A A GGA A TA GA CGGGGA CC CGCA CA A
 GCGGTGGA GCA TGTGGTTTA A TTCGA CGA T A
 CA CGA A GA A CCTTA CCTGGA CTTGA CA TA
 GTA A GA A T GA TTTA GA GA TA GA TTA
 GTGTCTGCTTGCA GA A A CTTG CA TA CA
 GGTGCTGCA CGGCTGTCTGCA GCTCGTGTCTG TGA
 GA TGTTGGGTTA A GTCCCGCA A CGA GCGCA A
 CCC TCGTCCTTA GTTGCTA A CA GTTCGGCTGA
 GA A CTCTA A G GA GA CTGCCTA CGCA A GTA
 GGA GGA A GGTGA GGA TGA CGTCA A GTCA TCA
 TGGCCCTTA CGTCCA GGGCTA CA CA CGTGCTA
 CA A TGGGGTA TA CA A A GA GCA GCA A TA
 CGGT GA CGTGGA GCA A A TCTCA A A A A
 TGCCTCCCA GTTCGGA TTGTA GTCTGCA A CTCGA
 CTA CA TGA A GTTGGA A TCGCT A GTA A TCGTA
 GA TCA GCTA TGCTA CGGTG

根据该序列到 Ribosomal Database Project 进行序列匹配,给出的结果是:该菌属于 domain Bacteria- phylum Proteobacteria- class Epsilonproteobacteria- oeder Campylobacteria-family Campylobacteraceae- genus Arcobacter。确定为弓形杆菌属。

同时还给出弓形杆菌属中 4 种细菌相似性值 (similariry score): 与布氏弓形杆菌 ATCC 49616、AY621116 的相似性值为 1.000,与嗜低温弓形杆菌 CCUG 17802 的相似性值为 0.868,与斯氏弓形杆菌 DQ464344 的相似性值为 0.842,与 *Arcobacter*

cibarius 的相似性值为 0.872。从细菌相似性值上看该菌与布氏弓形杆菌的亲缘关系最近。

2.6 表型生化特征鉴定结果

该菌的形态、动力、生长特性及生化特征符合弓形杆菌属的特征,同时根据参考文献^[4]中对布氏弓形杆菌的表型生化特征描述,对这株菌进行分析,判断该菌为布氏弓形杆菌。

3 讨论

目前对该菌还没有标准的分离培养方法,主要是参照弯曲菌的分离培养方法进行,对不同样本采取的分离方法有所区别:①最早的分离培养方法是采用半固体培养基分离培养,这个培养基是用来分离钩端螺旋体的。②对禽类样本的分离有的采用加入 5% 羊血的 CAT broth 进行增菌培养,再用 0.45 μm 的滤器进行过滤,在非选择性的血平板上滴加 5~6 滴,30 °C,30 min 干燥后,在有氧条件下培养 8 d,每天进行观察,直到发现有可疑菌落生长^[5]。③对人的便样用 1:5 布氏肉汤稀释悬浮,50 mm 直径 0.45 μm 纤维孔径滤膜放到含 5% 羊血的 MH 平板,将 8 滴悬液滴到滤膜的表面,在 37 °C 放置 30 min 干燥,过滤后,移去滤膜,将平板放入 37 °C 微需氧培养。挑取可疑菌落进行分析^[3]。④海水的检测方法是先用 200 μm 孔径的滤膜过滤,再用 64 μm 孔径的滤膜滤过 3 L,再用 0.2 μm 孔径的滤膜进行浓缩,浓缩后再用无菌海水悬浮,最终体积为 3 ml,混合后用 Arcobacter broth (OXOID) 增菌 30 °C 24 h,再用 CCDA 平板进行分离培养,挑取可疑菌落进行鉴定^[6]。

建立可靠、实用的弓形杆菌的检测方法是对其进行研究的基础,本次试验所采用的方法经验证可以用于对弓形杆菌分离培养,但还需进一步的完善。虽然文献报道从鸡、鸭、猪可以分离到该菌,但是本次试验并没有分离到。可能与分离的方法和采样的数量有关。如果在滤膜孔径的选择,或者采用滤器将菌液过滤,对过滤到的滤液进行分离培养,也许会提高分离的能力^[5]。

从淡水鱼肠内容物分离到布氏弓形杆菌还是首次报道。该菌与人类的腹泻密切相关,目前在国内对该菌的研究报道很少,后期应开展对食品及腹泻病人中弓形杆菌的研究,以进一步了解该菌在我国食品中的存在情况及我国人群对该菌的感染状况。

参考文献

- [1] GARRITY G M. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag 2005:1161-1165.

- [2] TAYLOR D N , KIEHLBAUCH J A , TEE W ,et al. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea [J]. *J Infect Dis* ,1991 ,163 :1062-1067.
- [3] VANDENBERG O ,DEDISTE A ,HOUF K ,et al. *Arcobacter* Species in Humans [J]. *Emerg Infect Dis* ,2004 ,10 (10) :1864-1867.
- [4] STEPHEN L W . Danish veterinary laboratory , DK-1790 Copenhagen V , identification methods for campylobacters , helicobacters and related organisms [J]. *Denm Clin Microl Rev* , 1996 ,9(3) :405-422.
- [5] IBRAHIM ATABAYA H ,WAINØB M ,MADSEN M. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry [J]. *Inter J Food Microbiol* ,2006 ,109 :139-145.
- [6] FERA M T ,MAUGERI T L ,GUGLIANDOLO C ,et al. Detction of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea [J]. *Appl Environ Microbiol* ,2004 ,70(3) :1271-1276.

论著

各国(地区)食用色素的使用现况与比对分析

邹志飞¹ 蒲民² 李建军² 陈永红¹

(1. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广东 广州 510623;
2. 国家质量监督检验检疫总局标准法规中心, 北京 100088)

摘要:食用色素分为焦油色素、天然色素和其他3类。按化学结构,食用焦油色素分为偶氮类、三芳基甲烷类、氧杂蒽类、荧光酮类、喹啉衍生物和靛系染料,天然色素分为四吡咯(卟啉类)衍生物、异戊二烯衍生物、花青苷类衍生物、酮类衍生物、醌类衍生物和其他类。食用色素的编码有INS、E-Number、CI以及部分国家(地区)对合成色素的代号。本文分类介绍了中国大陆、CAC、俄罗斯、欧盟、美国、加拿大、日本,以及中国香港、中国澳门和中国台湾10个国家(地区)的食用色素管理规定与允许使用品种。对各国(或地区)食品添加剂标准表述方式、禁止使用色素的规定、对焦油色素应用态度差异、允许使用色素(焦油色素、天然色素和其他类)品种的使用差异,以及食用色素使用范围与限量差别进行了比对分析,提出了我国出口食品生产应根据出口国(或地区)标准确定色素的使用,我国对进口食品应根据其来源确定重点关注色素品种与限量的建议,并分析了食用色素应用发展的趋势。

关键词:食用色素; 使用标准; 差异比对

中图分类号:R15; TS251 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)02-0112-10

Usage Status and Comparison Analysis of the Food Colour in Some Countries (Regions)

ZOU Zhi-fei , PU Min , LI Jian-jun , CHEN Yong-hong

(Inspection and Quarantine Technology Center of GDCIQ , Guangdong Guangzhou 510623 , China)

Abstract: Food colour was divided into three categories , that was tar pigments , natural pigments and others. Edible tar pigment was classified to azo , triarylmethane , xanthene , fluorescent ketone , quinoline derivatives and indigo dye , and natural pigment was classified to tetrapyrroles (porphyrins) derivatives , isoprene derivatives , anthocyanin derivatives , ketone derivatives , quinone derivatives and the others according to their chemical structure. There are INS , E-number , C. I. and the code about synthetic pigment in some countries (regions) in food color. The regulations and the use varieties about food colour of China , CAC , Russia , EU , US , Canada , Japan , HongKong China , Macao China and Taiwan China were introduced respectively. Comparison analysis about differences in formulation of food additieve standard , prohibition about colour variety , attitude about usage of edible tar colour , and colour variety (tar colour , natural colour and others) , scope and limits about colour usage were performed with comparative analysis. Colour usage in the produce of export food in accordance with standard of destination , focus on variety and limit of colour in import food according to their sources was proposed , and trends about usage of food colour was Prospected also.

收稿日期:2009-06-04

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2007IK068);广东出入境检验检疫局科技项目(2005GDK26);国家质量监督检验检疫总局公益性行业科研专项(10-54)

作者简介:邹志飞 男 副主任医师 研究方向为食品安全与食品毒理学 E-mail zouzhidei@126.com