

# 水产品中弧菌的 PCR 技术检测研究进展

桑燕娇, 宁喜斌\* (上海海洋大学, 上海 201306)

**摘要** 水产品中副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌均是食源性致病菌, 对这些菌种灵敏、快速的检测方法对水产品安全以及保护人类健康极为重要。主要综述了水产品中副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌的分子生物学检测研究进展。

**关键词** 副溶血性弧菌; 溶藻弧菌; 创伤弧菌; PCR 技术

**中图分类号** S986.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)33-11871-04

## Research Progress of PCR Technology Detection of *Vibrio* in Aquatic Products

SANG Yan-jiao, NING Xi-bin\* (Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* in aquatic products are foodborne pathogens. Sensitive, rapid detection methods for seafood safety and the protection of human health is extremely important. This paper summarizes that research progress of molecular biology detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* in aquatic products.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio vulnificus*; PCR technology

水产品由于其具有丰富的营养、鲜美的味道、脂肪含量低、蛋白质含量高等特点, 已成为风靡全球的健康食品, 且食用的地区及人群在不断扩大<sup>[1]</sup>, 因此它的安全性得到了很大的关注。水产品易受到不同程度的污染, 其中受到弧菌污染比较严重, 所以对水产品中微生物的分析和监控, 能使水产品的质量和安全性得到提高<sup>[2]</sup>。

目前检测弧菌的方法有传统的生理生化测定; 分子生物学技术, 如 LAMP、PCR 检测技术, 核酸探针技术, 16sRNA 检测技术等; 免疫学方法, 如 ELISA 技术、Western blot、免疫荧光技术等<sup>[3]</sup>; 传感器技术, 如电化学技术、电子鼻技术等。笔者主要综述 PCR 技术检测水产品中副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌的研究进展。

## 1 水产品中弧菌概述

弧菌是一类重要的食源性致病菌, 广泛分布于水产品中, 是水生动植物弧菌病的病原体, 主要引起人体肠道疾病、伤口感染和败血症等病症<sup>[3]</sup>。

**1.1 副溶血性弧菌** 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是革兰氏阴性嗜盐菌, 隶属弧菌科中的弧菌属, 它是一种人畜共患病菌<sup>[4]</sup>。其主要致病性在于它可以产生 3 种溶血性毒素, 分别为不耐热溶血毒素 (thermolabile hemolysin, TLH)、耐热直接溶血毒素 (thermostable direct hemolysin, TDH) 和耐热相关直接溶血毒素 (thermostable related hemolysin, TRH), 分别由 *tlh*、*tdh*、*trh* 基因编码。

人若食用了受该菌污染的水产品后, 会引发食物中毒, 主要症状为腹泻、肠痉挛、恶心等典型肠胃炎反应, 严重者可引起败血症<sup>[5]</sup>。根据国家食源性疾病预防网数据显示<sup>[6]</sup>, 副溶血性弧菌引起的食物中毒, 在发生规模及人群暴露规模呈明显上升趋势, 已经高居微生物性食物中毒首位。

**1.2 溶藻弧菌** 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 又名解藻阮

酸弧菌、解藻酸弧菌或解藻阮酸贝内克氏菌, 是革兰氏阴性短杆菌, 隶属弧菌科中的弧菌属, 为嗜盐嗜温性、兼性厌氧菌<sup>[7]</sup>, 是一种人和海洋动物共感染的病原菌<sup>[8-9]</sup>。溶藻弧菌广泛分布于海洋及江河入海口水域, 并且数量居海水类弧菌之首<sup>[10]</sup>, 但由于其是嗜温菌, 因此从夏季到冬季, 由赤道向两极随着温度的降低其数量也明显减少<sup>[11-12]</sup>。此外, 在海洋动物中也存在着大量的溶藻弧菌<sup>[13]</sup>。

溶藻弧菌的致病性主要取决于弧菌与宿主细胞之间的相互作用, 其致病过程包括粘附、侵袭、体内增殖及产生毒素等<sup>[14]</sup>。溶藻弧菌的致病作用主要与它产生的各种毒力因子有关, 其毒力因子主要有粘附素、胞外产物 (如碱性丝氨酸蛋白酶和胶原蛋白酶等)、外膜蛋白及摄铁系统等<sup>[15-16]</sup>。

**1.3 创伤弧菌** 创伤弧菌 (*vibrio vulnificus*) 是一种带有荚膜的革兰氏阴性嗜盐菌, 属于弧菌属第五群, 与霍乱弧菌、肠炎弧菌同属致病性弧菌, 广泛分布于虾类、鱼类及贝母类等水生动物体内<sup>[17]</sup>。经研究发现, 人一旦感染了创伤弧菌, 短时间内会引起伤口炎症, 严重时会导致败血症, 而且发病迅速, 死亡率较高<sup>[18]</sup>, 尤其是对于已经患有肝坏死、慢性肾功能衰竭和免疫功能低下以及有糖尿病病史的患者<sup>[19]</sup>。

根据创伤弧菌的生化、遗传、血清学试验的差异和受感染宿主的不同, 将其分为 3 种生物型<sup>[20-21]</sup>。生物型 I 产吡啶, 人类感染通常表现为散发形式, 且几乎都是由生物型 I 所致; 生物型 II 不产吡啶, 是鱼类的重要病原菌, 特别是对鳗鱼的感染性很强, 但后来 Amaro 等试验证实, 它也是人类疾病的条件致病菌<sup>[22]</sup>; 生物型 III 于 1996 年首次报道可引起人类败血症和软组织感染<sup>[23]</sup>。经研究发现, 创伤弧菌的致病因子主要有细胞外蛋白酶、弹性蛋白酶、金属蛋白酶、溶细胞毒素等。

## 2 PCR 技术的研究进展

PCR 是 1985 年由美国 Kary Mullis 等首创并由美国 Cetus 公司开发的一项体外扩增 DNA 的方法, 应用该方法可使极微量的特定 DNA 片断在几小时内迅速扩增至百万倍<sup>[24]</sup>。PCR 技术具有灵敏度高、快速准确、特异性强、应用范围广等优点<sup>[24]</sup>。随着人们对于食品安全问题越来越重视, PCR 技

**基金项目** 上海市科委工程中心建设项目 (11DZ2280300); 上海市精品课程资助项目。

**作者简介** 桑燕娇 (1990-), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事食品安全、微生物学研究。

**收稿日期** 2014-10-15

术在食品中的应用得到了广泛的推广,主要用于微生物中致病菌、益生菌的检测,并制定出解决方案。PCR技术主要分为常规PCR、多重PCR、实时荧光定量PCR。下面主要对这3种PCR技术检测副溶血性弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌进行了综述。

**2.1 常规PCR技术** 常规PCR技术主要应用于环境、食品、临床等不同来源样品的快速检测。

**2.1.1 常规PCR技术检测副溶血性弧菌。**李志峰等检测副溶血性弧菌的标准株和分离株,其灵敏度可达 $2.4 \times 10^2$  CFU/ml,并将扩增的*tlh*基因测序结果与GenBank中已收录的*tlh*基因序列比较,两序列的同源性达99%;结果表明该检测方法快捷、特异性好、敏感性高<sup>[25]</sup>。王华丽等利用*toxR*基因检测副溶血性弧菌并对PCR反应体系进行多次优化<sup>[26]</sup>;结果表明该检测方法的灵敏度及检测时间等指标均优于钟凯等<sup>[27]</sup>的报道。黄晨阳等基于*toxR*基因的环引物PCR法和已报道的PCR法对副溶血性弧菌和食品样品进行检测,并优化反应条件<sup>[28]</sup>;结果表明2种方法检测副溶血性弧菌的特异度均为100%,检出限分别为 $4 \times 10^3$  CFU/ml和 $5 \times 10^4$  CFU/ml。因此基于*toxR*基因的环引物PCR法检测副溶血性弧菌的特异性更强,检出限更低,检测所需时间更短,能够较好地满足卫生防疫机构快速检测副溶血性弧菌的需要。何晓华等将人工构建扩增内标引入PCR检测体系,从而检测副溶血性弧菌<sup>[29]</sup>;经试验发现,该PCR反应体系的检测灵敏度为 $1.16 \times 10^2$  CFU/ml。结果表明,该试验方法能特异地检测副溶血性弧菌,并可有效地排除假阴性,提高检测准确率。

**2.1.2 常规PCR技术检测溶藻弧菌。**韩一凡等根据溶藻弧菌*toxR*基因的高变区序列设计引物,进行特异性和敏感性试验<sup>[30]</sup>。结果表明,该方法能特异地检测出溶藻弧菌,每个PCR反应检测的灵敏度为0.01 pg的DNA和 $3.7 \times 10^3$  CFU/ml的细菌,可用于对感染溶藻弧菌的水生动物疾病进行诊断。庞兴红等根据溶藻弧菌毒力菌株HN08155的1个新的特异性基因序列设计了1对特异性引物SDRHf和SDRHr,从而建立了与HN08155具有相似遗传型的溶藻弧菌毒力菌株PCR快速分子检测试剂盒<sup>[31]</sup>。结果表明,该方法具有快速、灵敏度高、特异性强等优点,为海产品及水体中溶藻弧菌的检测提供了一种有效方法。

**2.1.3 常规PCR技术检测创伤弧菌。**Kumar等建立了检测海产品创伤弧菌*gyrB*基因的PCR程序,结果发现所有的创伤弧菌都出现一条285 bp的特异性条带,其他细菌没有特异扩增,发现该法的特异性强<sup>[32]</sup>。石琰璟等采用*vwhA*基因检测创伤弧菌,灵敏度为 $3.6 \times 10^2$  CFU/ml比PCR-琼脂糖凝胶电泳检测方法高一个数量级<sup>[33]</sup>。结果表明,该方法具有较高灵敏度和良好特异性,操作简单、检测速度快。邓曦等利用Design-Expert软件中的Box-Behnken中心组合试验原理,设计一组3因素3水平试验,通过响应曲面分析,得到优化培养参数为:含盐量3.65%,pH 6.75,培养温度37℃,在该条件下培养液的 $OD_{595nm}$ 为0.520;然后用PCR对样品进行快

速检测,发现该菌的检出率高达23.3%;结果表明,该法能快速有效检测水产品中存在的创伤弧菌<sup>[34]</sup>。

**2.2 多重PCR技术** 多重PCR是在普通PCR的基础上发展起来的,指在同一PCR反应体系中同时加入多对扩增不同基因的引物,达到一次反应可以同时扩增多个基因的目的,这样提高了检测的通量,大大缩短了检测的时间。

吴彩云等建立了一种双重PCR方法,运用该方法可同时检测携带有*tlh*和*tdh*基因的副溶血性弧菌毒力菌株<sup>[35]</sup>。结果表明,该法不但具有常规PCR的优点,而且还能节省耗材和时间,可用于检测水产食品以及临床样品中的副溶血性弧菌的毒力菌株。Bej等根据副溶血性弧菌的*tlh*、*tdh*和*trh*基因设计引物,运用多重PCR检测111份样品中的副溶血性弧菌<sup>[36]</sup>,结果发现,该方法灵敏度高、特异性强,而且能区分产毒株和非产毒株,远优于传统细菌学方法。

张新中等针对创伤弧菌和副溶血性弧菌的*gyrB*基因的不同位点设计引物,从而对3种海产品进行了创伤弧菌和副溶血性弧菌的检测,结果在部分海产品中能特异地检测到目标菌株<sup>[37]</sup>。该方法快速、灵敏度高、特异性强,为海产品的创伤弧菌和副溶血性弧菌的检测提供了有效的方法。刘阳等根据副溶血性弧菌和溶藻弧菌的*toxR*基因序列设计针对这2种细菌的2对特异性引物,建立能够快速同时检测这2种细菌的双重PCR方法,并对该反应体系的特异性和灵敏度进行检测<sup>[38]</sup>。结果显示,纯培养细菌VP和VA的检测灵敏度分别为 $2.32 \times 10^3$  CFU/ml和 $2.56 \times 10^3$  CFU/ml,临床病料检测灵敏度分别为2 CFU和3 CFU;与其他菌无交叉反应;研究表明,该方法操作简便、快速、特异性强、灵敏度高、稳定性好,并且经济实惠,值得推广应用。魏霜等以细菌16S rRNA基因为扩增内标靶序列,针对溶藻弧菌*gyrB*基因、副溶血性弧菌*collagenase*基因、创伤弧菌*vwhA*基因、霍乱弧菌*ompW*基因,分别设计特异性引物,建立多重PCR体系,对其灵敏度和特异性进行评价,并将建立的五重PCR应用于弧菌的筛选<sup>[39]</sup>。结果显示,该方法能够快速、灵敏、准确地检测溶藻弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌4种食源性致病菌,灵敏度高,并能有效指示PCR反应的假阴性,适用于食品中常见致病性弧菌的快速筛检。

**2.3 荧光定量PCR技术** 荧光定量PCR是指在PCR反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号积累实时检测整个PCR进程,通过Ct值和标准曲线对样品中的DNA(或cDNA)的起始浓度进行定量,从而计算待测样品的初始模板的方法<sup>[40]</sup>。

**2.3.1 荧光定量PCR技术检测副溶血性弧菌。**George等利用荧光定量PCR检测牡蛎中副溶血性弧菌*tdh*阳性株,与传统的PCR检测方法比较,结果显示该方法更快速、准确、灵敏度更高<sup>[41]</sup>。孙宏迪等根据副溶血性弧菌*tdh*基因设计合成引物及TaqMan探针,利用阳性质粒和模拟样本建立副溶血性弧菌的实时荧光定量PCR检测方法<sup>[42]</sup>。结果表明,该方法的检测灵敏度可达 $10^2$  CFU/ $\mu$ l,并且特异性强,重复性好。LO等运用双重PCR杂交探针建立的以*toxR*和*tdh2*为

目标基因的荧光定量检测体系<sup>[43]</sup>与 Tyagi 等建立的以 SYBR 为荧光染料的荧光定量 PCR 方法<sup>[44]</sup>相比,检测效果更敏感快速。许龙岩等根据副溶血性弧菌的 *toxR* 基因和 *tdh* 基因,建立基于 TaqMan 探针双重荧光 PCR 体系,进行副溶血性弧菌的特异性、敏感性试验,其最低检测浓度达到  $3.6 \times 10^2$  CFU/ml<sup>[45]</sup>。结果表明,该方法特异性好、灵敏度高,可用于食品中副溶血性弧菌的特异性及毒力基因检测。

**2.3.2 荧光定量 PCR 技术检测溶藻弧菌。**目前利用荧光定量 PCR 技术检测溶藻弧菌只有王海波等研究了,他们根据溶藻弧菌胶原酶基因 *colH* 的保守序列设计 1 对引物和 1 条 TaqMan 探针,优化反应体系中的引物浓度和探针浓度,评价此反应体系的特异度<sup>[46]</sup>。结果发现,优化的反应体系中较普通 PCR 提高了 100 倍,特异度为 100%。结果表明,该法能够灵敏和特异地检测溶藻弧菌,可以作为溶藻弧菌的快速检测方法。

**2.3.3 荧光定量 PCR 技术检测创伤弧菌。**Panicker 等采用 TaqMan 实时 PCR 方法检测 *vvhA* 基因的 3 对寡核苷酸引物和 2 个探针<sup>[47]</sup>,结果发现,81 株创伤弧菌都出现阳性扩增结果,而 25 株非弧菌细菌和 12 株非目标弧菌的扩增结果都为阴性。结果表明,该方法具有快速、特异性强等特点。吴增辉等根据位于 *vvhA* 基因序列保守区设计引物和 TaqMan 探针,进行实时荧光定量 PCR 检测,检测灵敏度可达 0.01 ng<sup>[48]</sup>。结果表明,该方法具有快速、稳定、敏感、特异等优点,适合用于临床实验室进行创伤弧菌引起的败血症和创口感染快速诊断。潘军航等根据 *vvhA* 基因序列设计的引物和探针进行实时荧光定量 PCR 检测,发现建立的实时荧光定量 PCR 特异性强,仅对创伤弧菌呈阳性结果,对预增菌 5 h 后经 QIAamp DNA miniKit 提取的 DNA 进行实时荧光定量 PCR 检测,其检测效果最佳,灵敏度达 1.4 CFU/ml<sup>[49]</sup>。结果表明,该方法具有快速、特异性强、敏感高等特点,且能在 8 h 内完成在牡蛎等海产品中创伤弧菌的快速检测。

### 3 总结与展望

通过上述研究可以发现,荧光定量 PCR 技术的灵敏度比较高,但是成本比较高,对于基层单位使用负担比较大,与其他 2 种技术相比其省去了凝胶电泳的繁琐操作,避免了试验过程中污染,既减少了假阳性的发生率,又缩短了检测时间,近年来已被广泛应用于临床、食品等样品中致病菌的检测;而常规 PCR 技术虽然成本低,但是它不能定量,灵敏性相对较低;多重 PCR 技术的体系比较复杂,需要花费更多的时间去摸索稳定的体系,以及要避免引物之间形成二聚体,干扰试验结果,但它消耗的时间和试剂比较少,而且还可减少或避免因操作步骤过多而污染所带来的假阳性等问题。

随着研究的深入,人们可以加强溶藻弧菌对哺乳动物特别是人类的致病机理的研究,对创伤弧菌的研究也需进一步的推进,对弧菌假阴性的研究以及各种弧菌间是否有交叉污染也要进一步的深入研究。相信随着分子生物学的发展,新的技术、仪器不断的出现,PCR 会不断完善,特别是与各种分子技术的融合和创新,这将会促使水产品中的弧菌快速、准

确、灵敏、特异、大规模检测的实现。

### 参考文献

- [1] 莫意平, 娄永江, 裴迪红, 等. 水产品安全性关键控制问题的研究[J]. 中国水产, 2005(11): 68-70.
- [2] 莫意平, 娄永江, 裴迪红, 等. 水产品安全性关键控制问题的分析与研究[J]. 北京水产, 2004(2): 4-7.
- [3] 杭莉. 淡水产品中弧菌菌群组成及主要菌群致病性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [4] LEE K K. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone[J]. *Microbes Infect*, 2003, 5: 481-485.
- [5] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003.
- [6] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
- [7] STEFAN H, HELMUT W, KARIN N B, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2000, 203: 169-175.
- [8] 封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 等. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 331-334.
- [9] 张灵芝, 闫冰, 曲桂娟. 一起溶藻弧菌引起食物中毒事故的调查报告[J]. 医学动物防制, 2005, 21(4): 312-313.
- [10] 林业杰, 陈亢川, 陈拱立, 等. 溶藻弧菌噬菌体的分离[J]. 微生物学报, 1993, 33(4): 285-289.
- [11] VASCONCELOS G J, STANG W J, LAIDLAW R H. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from Estuarine Areas of Southeastern Alaska[J]. *J. Appl Microbiol*, 1975, 4: 557-559.
- [12] CHAN K Y, WOO M L, LO K W, et al. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of hong kong[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 6: 1407-1411.
- [13] RIPABELLI G, SAMMARCO M L, GRASSO G M, et al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 49: 43-48.
- [14] 吴后波, 潘金培. 病原弧菌的致病机理[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 422-426.
- [15] 陈强, 鄢庆彬, 马姓. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 83-89.
- [16] 魏霜. 溶藻弧菌及其毒力相关基因的检测[D]. 济南: 济南食品学院, 2013.
- [17] CHIANG S R, CHUANG Y C. *Vibrio vulnificus* infection; clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2003, 36(2): 81-88.
- [18] HAQ S M, DAYAL H H. Chronic liver disease and consumption of raw oyster: a potentially lethal combination—a review of *Vibrio vulnificus* septicemia[J]. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(5): 1195-1199.
- [19] HEE EUN LEE, SOO YOUNG KIM, SEI JONG KIM, et al. Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(10): 2887-2892.
- [20] 陈艳, 付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2008, 35(2): 91-96.
- [21] 邢丽萍. 创伤弧菌生物学研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1833-1836.
- [22] AMARO C, BOSCA E G. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1454-1457.
- [23] BISHARAT N, COHEN D I, HARDING R M, et al. Hybrid *Vibrio vulnificus*[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(1): 30-35.
- [24] 李平兰. PCR 技术及其在食品微生物检测中的应用[J]. 食品科学, 1998, 19(7): 3-5.
- [25] 李志峰, 聂军, 陈义忠, 等. 一种快速检测副溶血性弧菌的 PCR 方法[J]. 解放军预防医学杂志, 2005, 22(6): 443-444.
- [26] 王华丽, 史贤明, 杨官品. 海产品中副溶血性弧菌 PCR 检测方法的建立与评价[J]. 农业生物技术学报, 2007, 14(4): 627-628.
- [27] 钟凯, 田静, 李业鹏, 等. 食品中副溶血性弧菌 PCR 快速检测方法的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(4): 317-320.
- [28] 黄晨阳, 于龙, 兰智杰, 等. 基于 *toxR* 基因的 PCR 检测副溶血性弧菌的方法建立[J]. 河南预防医学杂志, 2013, 24(5): 327-330.
- [29] 何晓华, 余水静, 陈万义, 等. 添加有扩增内标的副溶血性弧菌 PCR 检测方法[J]. 微生物学报, 2010(3): 387-394.
- [30] 韩一凡, 莫照兰, 李杰, 等. 溶藻弧菌的 PCR 快速检测方法[J]. 中国海

- 洋大学学报:自然科学版,2009(6):1237-1240.
- [31] 庞兴红,周永灿,徐先栋,等.基于一种新基因的溶藻弧菌毒力菌株检测方法的建立[J].水产科学,2011,30(6):342-346.
- [32] KUMAR H S, PARVATHI A, KARUNASAGAR I, et al. A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths[J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 111(3):216-220.
- [33] 石琰琛,王建广. PCR-核酸薄膜层析法检测创伤弧菌[J]. 青岛科技大学学报:自然科学版,2012,33(2):164-167.
- [34] 邓曦,唐书泽,周鹏飞,等.创伤弧菌的优化培养及快速检测[J]. 食品工业科技,2014,35(6):197-201.
- [35] 吴彩云,蔡俊鹏,杨汝德,等.双重 PCR 检测携带有 *tl* 和 *tdh* 基因的副溶血性弧菌毒力菌株[J]. 水产科学,2004,23(5):5-9.
- [36] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 36:215-225.
- [37] 张新中,文万饶,徐先栋,等.双重 PCR 在创伤弧菌和副溶血性弧菌快速检测中的应用[J]. 现代渔业信息,2007,22(9):11-13.
- [38] 刘阳,孔繁德,徐淑菲,等.副溶血性弧菌和溶藻弧菌双重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国预防兽医学报,2012,34(8):647-650.
- [39] 魏霜,洗钰茵,赵晖,等.多重 PCR 检测四种食源性病原弧菌[J]. 中国农业科学,2013(8):19.
- [40] 刘阳,孔繁德,徐淑菲,等.副溶血性弧菌检测技术的研究进展[J]. 经济动物学报,2012,16(1):49-54.
- [41] BLACKSTONE G M, NORDSTROM J L, VICKERY M C L, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2):149-155.
- [42] 孙宏迪,杜晰颖,汪周佳,等.副溶血性弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J]. 解放军医学杂志,2010,35(8):969-972.
- [43] LO C L, LEUNG P H, YIP S P, et al. Rapid detection of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by a sensitive and specific duplex PCR-hybridization probes assay using Light Cycler[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(2):575-584.
- [44] TYAGI A, SARAVANAN V, KARUNASAGAR I, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(2):124-130.
- [45] 许龙岩,袁慕云,曹际娟,等. TaqMan 探针双重荧光 PCR 法检测副溶血性弧菌[J]. 食品科学,2013,34(18):263-266.
- [46] 王海波,张京云,王多春,等.溶藻弧菌 TaqMan 实时 PCR 快速检测体系的建立[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(5):1150-1152.
- [47] PANICKER G, BEJ A K. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10):5702-5709.
- [48] 吴增辉,楼永良,卢中秋,等.基于 *vvhA* 基因 TaqMan 实时荧光定量 PCR 快速检测创伤弧菌的研究[J]. 中华急诊医学杂志,2007,16(5):477-481.
- [49] 潘宇航,金大智,梅玲玲,等.实时荧光定量 PCR 快速检测创伤弧菌的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2010(6):1314-1318.

(上接第 11800 页)

区。应该选择多年生常绿草本植被,并适当拉长草坪的修剪间隔,以充分发挥其阻挡和过滤作用;灌木和小乔木也应多选择常绿植被(如山茶、木犀等),而高大乔木则宜以阔叶为主、常绿和落叶并重。

**3.2 加强立体绿化** 我国人多地少,城市中土地更为稀缺。立体绿化是缓解用地紧张和生态效益这一矛盾的有效方法。因此,在城市建设中要利用多种边角土地和立体空间进行绿化,弥补平面绿化的不足。如开展围墙绿化、窗台透绿、破墙透绿、交通护栏绿化、阳台绿化、电线杆装饰绿化等来创建绿色景观。

**3.3 设立立交桥和地下通道,加强道路绿化** 道路扬尘是粉尘来源中的一个重要部分。随着工业的发展和人们生活水平的提高,道路拥挤的情况日益严重,不但影响了人们正常的生产生活,还恶化了环境。在城市道路上,尤其是主干路,要设立立交桥和地下通道,缓解交通拥挤,也可一定程度上减少道路扬尘。与此同时,还要对道路进行全方位立体化的绿化,绿化类型也应以复合型绿地为主,植被种类也应以荷花玉兰、樟等滞尘能力强的植被为主。

**3.4 适当增加常绿灌木(小乔木)比重** 研究表明,叶片滞尘效果最好的是在离地 0.6 m ~ 1.1 m 之间的高度,而 110 cm 和 170 cm 时的叶片滞尘量没有明显区别。杨士军等学者研究也表明,叶片滞尘效果最好的是在离地 0.6 m ~ 2.6

m 的高度<sup>[8]</sup>。因此应在绿地内增加这一高度范围的植被(如红花檵木、山茶、大叶黄杨等),从而有效减少空气中粉尘的含量。

**3.5 定期对叶片进行淋洗** 经测定,植被在二周时(持续无降水天气)的滞尘能力达到最优状态,而此后滞尘效果减弱。因此,如果长时间不下雨则会阻碍滞尘性能的发挥。所以建议在粉尘污染比较严重的地区,如果长时间不下雨,应每隔两周左右实施人工降雨或对植被进行冲淋,特别是高度在 0.6 m ~ 1.7 m 范围内的叶片,从而保证其性能的发挥。

#### 参考文献

- [1] 柴一新,祝宁,韩焕金.城市绿化树种的滞尘效应——以哈尔滨市为例[J]. 应用生态学报,2002,13(9):1121-1126.
- [2] 王蓉丽,马玲,方英姿.山茶叶面积指数模型研究[J]. 北方园艺,2008(12):137-139.
- [3] 赵勇,李树人,阎志平.城市绿地的滞尘效应及评价方法[J]. 华中农业大学学报,2002(6):582-586.
- [4] 张家洋,刘兴洋,邹曼,等.37种道路绿化树木滞尘能力的比较[J]. 云南农业大学学报,2013,28(6):905-912.
- [5] 史晓丽.北京市行道树固碳释氧滞尘效益的初步研究[D]. 北京:北京林业大学,2010:28-33.
- [6] 粟志峰,刘艳,彭倩芳.不同绿地类型在城市中的滞尘作用研究[J]. 干旱环境监测,2002(9):162-163.
- [7] 陈芳,周志翔,郭尔祥,等.城市工业区园林绿地滞尘效应的研究[J]. 生态学杂志,2006,25(1):34-38.
- [8] 杨士军,罗峙停,李科煌.不同植物滞尘能力的初步研究[J]. 上海环境科学,2005(1):43-46.