

海产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及与临床分离株的生化性状比较

宁喜斌¹ 刘代新¹ 张继伦^{2*}

(1. 上海水产大学食品学院 上海 200090)

(2. 上海出入境检验检疫局 上海 201202)

摘要: 利用 TCBS 和科玛嘉两种选择性培养基从 60 份海产品中初筛得到 27 株疑似副溶血性弧菌, 经生化鉴定, 27 株均为副溶血性弧菌, 其中 22 株是从鲜活海产品中分离得到, 5 株从冷冻海产品中分离得到。进一步与临床上得到的 32 株副溶血性弧菌进行了四个特殊生化试验的比较, 结果发现副溶血性弧菌临床分离株与海产品分离株在溶血、脲酶及枸橼酸盐利用 3 个生化试验上存在差异, 而阿拉伯糖利用试验无差异, 这为根据生化性状研究不同来源副溶血性弧菌提供基础。

关键词: 副溶血性弧菌, 海产品分离株, 临床分离株, 生化性状

Vibrio parahaemolyticus from Seafood: Their Isolation, Identification Phenotypic Comparison with Clinical Isolates

NING Xi-Bin¹ LIU Dai-Xin¹ ZHANG Ji-Lun^{2*}

(1. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

(2. Shanghai Entry-exit Inspection And Quarantine Bureau, Shanghai 201202)

Abstract: In this paper, two selective media—TCBS agar and CHROMagar—were utilized for the isolation of *Vibrio parahaemolyticus* (Vp). According to the biochemical identification, all the 27 suspected strains which were isolated from 60 samples of seafood were identified to be Vp, 22 strains of them were from fresh seafoods and 5 strains were from frozen ones. With further research on 4 special biochemical tests, comparing these 27 Vp strains with 32 Vp clinic strains isolated from patients, there were some difference in Hemolysis test, Urease test and Citrate test, while no significant difference in Arabinose test. As such, it supplies a theoretic basis for studying in biochemical characteristics of Vp from different sources.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Seafood isolates, Clinical isolates, Biochemistry characteristics

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp) 是革兰氏阴性嗜盐细菌, 隶属弧菌科中的弧菌属, 它是一种人畜共患病菌^[1]。主要存在于近海岸的海水、

海底沉积物和鱼虾、贝类等海产品中, 是引起食源性疾病的主要病原之一。污染了大量该菌而又未经良好加工处理的海产品被人类食用后, 会引发突发

性食物中毒,可导致患者出现腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐、发烧等典型胃肠炎反应。副溶血性弧菌还可导致海鲷、九孔鲍、斑节虾、对虾、牙鲆及文蛤等水产动物致病,间接影响人类的健康^[2]。目前研究认为,与副溶血性弧菌致病力相关的主要毒力因子为溶血素类,包括耐热直接溶血素(Thermostable Direct Hemolysin, TDH)、TDH-相关溶血素(TDH-related Hemolysin, TRH)和不耐热直接溶血素(Thermolabile Hemolysin, TLH),它们分别由*tdh*、*trh*及*tl*基因编码,*tdh*阳性菌株可以使氯化钠血琼脂平板产生 β -溶血现象,而*trh*阳性菌株一般表现为脲酶阳性,*tl*基因的表型特征还未见报道^[3-8]。

国外报道,大部分(约90%)副溶血性弧菌临床分离株溶血阳性,而小部分(1%~2%)海产品分离株溶血阳性^[6]。黄上媛等^[9]研究了临床上分离的42株副溶血性弧菌的脲酶试验,有15株脲酶阳性,认为副溶血性弧菌检测时不可忽视脲酶阳性的菌株。潘自降等^[10]对53株不同来源的副溶血性弧菌进行了脲酶检测,均为阴性。本研究从东海区域的海产品中分离得到了副溶血性弧菌,并与本区域从腹泻患者粪便中分离得到的临床株在溶血试验和脲酶试验进行比较,并在阿拉伯糖利用试验和枸橼酸盐利用试验上进行了初步研究,找出两种来源的副溶血性弧菌在这些生化反应上的差异,为根据生化性状研究不同来源副溶血性弧菌提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:副溶血性弧菌标准菌株 *V. p1.2164*,购于中科院普通菌种保藏中心。副溶血性弧菌临床分离(食物中毒或胃肠炎等病人)株共32株,其中8株由上海市浦东新区疾病预防控制中心分离,16株由上海市金山区疾病预防控制中心分离,8株由浙江省舟山市疾病预防控制中心分离。

1.1.2 海产品:30份购于上海市东方国际水产中心(冷冻品),30份购于浙江舟山水产市场(鲜活品)。

1.1.3 培养基及主要试剂:3.5%的氯化钠三糖铁琼脂、TCBS琼脂等培养基及鉴定用生化试剂购于上海市疾病预防控制中心;氯化钠血琼脂基础培养基由上海市疾病预防控制中心配制,新鲜无菌兔血由

上海出入境检验检疫局动物室刘俊平老师提供;科玛嘉弧菌显色培养基(CV)购于上海科玛嘉微生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 海产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定:1)海产品的处理:参照资料^[11]和^[12]。

2)副溶血性弧菌的初筛^[12-14]:海产品稀释液在副溶血性弧菌增菌液中增菌,划线接种于TCBS琼脂,培养,挑取绿色或蓝绿色菌落转接于科玛嘉弧菌显色培养基,挑选的紫红色菌落。这些菌落中符合以下条件的菌株为疑似菌株:三糖铁试验,斜面产碱变红,底层产酸变黄,不产气,硫化氢阴性;在无盐蛋白胨水及10%盐蛋白胨水上不生长,3%盐蛋白胨水上旺盛生长,7%盐蛋白胨水上明显生长;革兰氏染色阴性,弧状或短杆状。

3)副溶血性弧菌的复筛:疑似菌株生化鉴定参照^[12,14-17],包括蔗糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖及O/F发酵试验,赖氨酸脱羧、精氨酸双水解及鸟氨酸脱羧酶试验,氧化酶、 β -半乳糖苷酶、VP、甲基红、明胶液化、硝酸盐利用、动力、42℃生长及靛基质试验。实验方法参照资料^[12,15,18],同时以标准菌株 *V. p1.2164* 作对照。

1.2.2 副溶血性弧菌海产品分离株与临床分离株4种生化试验的比较:1)溶血试验:新鲜兔血脱纤后,配制成20%的红细胞悬液,然后按10%的比例加入到氯化钠血琼脂基础培养基中,制成氯化钠血琼脂平板。活化后的菌株点接于平板上,37℃培养,在24h以内观察溶血情况。

2)脲酶试验:副溶血性弧菌海产品分离株和临床分离株,分别接种于3.5% Rustigian氏尿素培养液,30℃培养18h~24h,阳性反应则培养液由粉红变为紫红色,阴性变黄或不变色。

3)阿拉伯糖利用试验:副溶血性弧菌海产品分离株和临床分离株,接种于3.5%阿拉伯糖生化发酵培养基,37℃培养18h~24h,阳性反应则培养液由绿色变为黄色,阴性不变色。

4)枸橼酸盐利用试验:副溶血性弧菌海产品分离株与临床分离株,接种于枸橼酸盐培养基,在30℃培养1d~4d,每日观察结果。培养基呈绿色为阴性,变为深蓝色为阳性。

2 结果与分析

2.1 海产品中副溶血性弧菌分离、鉴定及检出情况

2.1.1 海产品中副溶血性弧菌的初筛：1) 两种选择性培养基的初步分离：60 份增菌液划线于 TCBS 琼脂上，得到蓝色或蓝绿色菌落共 35 份，从 35 份 TCBS 琼脂上各挑取 1 个蓝色或蓝绿色菌落转接至科玛嘉弧菌显色培养基上，得到紫红色菌落 27 份。这 27 份菌各取 1 个单菌落在氯化钠营养琼脂斜面常温保存 1 份，同时作为初步分离菌株，做进一步的初筛试验。

2) 三糖铁试验、嗜盐性试验及革兰氏染色的特性：27 株初步分离菌同时做三糖铁试验、嗜盐性试验及革兰氏染色，试验结果均符合要求。最终从 60 份海产品中初筛得到 27 株疑似副溶血性弧菌，进一步做生化试验鉴定。

2.1.2 海产品中副溶血性弧菌的复筛：根据资料^[12,14-16]，对照副溶血性弧菌标准菌株的主要特征，生化鉴定结果如表 1。所有鉴定项目中除甲基红试验(+/-为 23/4)和靛基质试验(+/-为 26/1)外，其它生化试验均与副溶血性弧菌标准菌株 *V. p1.2164* 相符合，且与资料^[15,16]相符，所以初筛得到的 27 株疑似菌株均为副溶血性弧菌。60 份海产品中在 TCBS 上得到 35 份绿色或蓝绿色菌落，但最终得到 27 株副溶血性弧菌，这是因为 TCBS 虽是一种选择性培养基，但能够在其上长成绿色菌落的海洋弧菌还有拟态弧菌、创伤弧菌以及霍利斯弧菌等，而这三种弧菌在科玛嘉弧菌显色培养基上的颜色分别为绿色、绿色及乳白色，副溶血性弧菌在科玛嘉弧菌显色培养基上为紫红色^[13]，科玛嘉弧菌显色培养基应用不仅提高了分离的准确性，而且可以在初筛阶段淘汰大部分其他弧菌，减少了复筛的工作量。

2.1.3 海产品中副溶血性弧菌的检出率：本研究最终从海产品中分离得到 27 株副溶血性弧菌，冷冻海产品与鲜活海产品中副溶血性弧菌的检出情况如表 2。27 株副溶血性弧菌 22 株来自于鲜活海产品，5 株来自于冷冻的海产品，鲜活海产品的副溶血性弧菌的检出率 73.33% 远大于冻产品的检出率 16.67%，因为低温条件下副溶血性弧菌可能进入活的非可培养状态^[19,20]。

表 1 分离菌生化特征及其与标准副溶血性弧菌的比较
Table 1 Comparison of isolated strains with standard *Vibrio parahaemolyticus* in biochemistry tests

鉴定项目 Test items	分离菌 Isolated strains	标准菌株 <i>V. p 1.2164</i>
蔗糖 Sucrose	-	-
乳糖 Lactose	-	-
甘露醇 Mannitol	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+
VP	-	-
甲基红 MR	+/-	+
动力 Motility	+	+
明胶 Gelatin liquefaction	+	+
硝酸盐 Nitrate	+	+
靛基质 Indole	+/-	+
氧化酶 Oxidase	+	+
赖氨酸脱羧 Lysine decarboxylase	+	+
精氨酸双水解 Arginine dihydrolyase	-	-
鸟氨酸脱羧 Ornithine decarboxylase	+	+
-半乳糖苷酶 ONPG	-	-
O/F Oxidation/Fermentation	F	F
42 生长 Growth in 42℃	+	+

注：+：阳性；-：阴性；+/-：阳性多于阴性；F：发酵型

Note: +: Positive; -: Negative; +/-: Positive one exceed negative one; F: Fermentation

表 2 两种类型的海产品副溶血性弧菌的检出率
Table 2 The isolating rate of *Vibrio parahaemolyticus* from the fresh and frozen seafood

样品种类 Sample type	样品数 Sample number	检出数 Isolating number	检出率 Isolating rate
冻产品 Frozen seafood	30	5	16.67%
鲜活产品 Fresh seafood	30	22	73.33%

2.2 副溶血性弧菌海产品分离株与临床分离株的 4 种特殊生化试验比较

27 株海产品分离株与 32 株临床分离株副溶血性弧菌四种生化试验的结果见表 3。由表 3 可以看出，27 株副溶血性弧菌海产品分离株脲酶试验全部阴性，而溶血试验、阿拉伯糖利用试验和枸橼酸盐利用试验的阳性率分别为 25.93%、92.59% 和 66.67%，而 32 株副溶血性弧菌临床分离株脲酶试验、溶血试验、阿拉伯糖利用试验和枸橼酸盐利用试验的阳性率分别为 12.50%、87.50%、90.63%

表3 副溶血性弧菌临床分离株和海产品分离株的四种生化试验比较
Table 3 Compared seafood isolates with clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* in four biochemistry tests

菌株来源 Source of strain	菌株数 Number of strain	生化试验阳性比率 Positive proportion of biochemistry test			
		脲酶试验 Urease test	溶血试验 Hemolysis test	阿拉伯糖利用试验 Arabinose test	枸橼酸盐利用试验 Citrate test
临床分离株 Clinical isolates	32	12.50%	87.50%	90.63%	87.50%
海产品分离株 Seafood isolates	27	0%	25.93%	92.59%	66.67%

和 87.50%。所以，副溶血性弧菌海产品分离株与临床分离株的阿拉伯糖利用试验没有区别，其它 3 种生化试验是有差异的。临床分离株溶血阳性和脲酶阳性的比率远大于海产品分离株，副溶血性弧菌临床分离株利用枸橼酸盐的能力稍强于海产品分离株。

3 讨论与结论

用 TCBS 从 60 份海产品中得到 35 份绿色或蓝绿色菌落，转接到科玛嘉弧菌显色培养基得到 27 份紫红色，经鉴定 27 份均为副溶血性弧菌，同时选用 TCBS 和科玛嘉两种选择性培养基，提高了副溶血性弧菌的检验效率。而分别从 30 份鲜活海产品和 30 份冷冻海产品中得到 22 株和 5 株副溶血性弧菌，前者的检出率 73.33% 远大于后者 16.67% 的检出率，但是副溶血性弧菌在低温条件下会进入活的非可培养的状态，用常规的培养方法无法检测到其是否存在，其在特定条件下会复苏，所以冷冻海产品具有潜在的威胁性^[19]。

副溶血性弧菌临床分离株的溶血试验、脲酶试验及枸橼酸盐利用试验的阳性比率分别为 87.50%、12.50% 和 87.50% 均大于海产品分离株在这三种试验 25.93%、0% 和 66.67% 的阳性比率，但是两种来源的菌株阿拉伯糖利用的阳性比率相当，均达到 90%。副溶血性弧菌临床株绝大多数可以产生的耐热性溶血毒素(TDH)，使氯化钠血琼脂培养基上出现溶血现象，而大多数环境分离株溶血阴性^[6]，而本研究从东海海域海产品中分离得到的副溶血性弧菌溶血试验阳性率达到 25.93%，不同区域分离的副溶血性弧菌有差异性^[21]，这需要更深入研究。研究表明^[7]，10% 左右临床分离株会产生耐热性溶血毒素相关毒素(TRH)，脲酶阳性菌株与之呈正相关性，

本研究中 12.50% 的临床分离株脲酶阳性。副溶血性弧菌临床分离株利用枸橼酸盐的能力强于海产品分离株，两种来源的菌株阿拉伯糖利用试验的阳性比例相当，副溶血性弧菌的生化性状与菌株来源的关系需要进一步探讨。

参考文献

- [1] Kuo-Kau Lee, Ping-Chung Liu, Chi-Yang Huang. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes and Infection*, 2003, **5**(6): 481-485.
- [2] 杨正时, 房海主编. 人与动物病原细菌学. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003, pp.609-622.
- [3] Honda T, Ni YX, Miwatani T, *et al.* Purification and characterization of hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 1988, **56**(4): 961-965.
- [4] Nishibuchi M, Taniguchi T, Mizawa T, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun*, 1989, **57**(9): 2691-2697.
- [5] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 1993, **4**: 106-113.
- [6] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable Direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*, 1995, **63**(6): 2093-2099.
- [7] Kaysner CA, Abeyta CJ, Stott RF, *et al.* Incidence of Urea-Hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in Willapa Bay, Washington. *App and Env Microbiol*, 1990, **56**(4): 904-907.
- [8] Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M, *et al.* Cloning and expression in *Esherichia coil* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin

- genes. *J Bacteriol*, 1985, **162**(2): 510–515.
- [9] 黄上媛, 刘永福, 周志红, 等. 脲酶阳性副溶血弧菌的临床及实验研究. 中华医学检验杂志, 1995, **18**(2): 84–86.
- [10] 潘自降, 坎 布, 沈 飙, 等. 副溶血弧菌海产品和临床分离株的表型及溶血素相关基因分析. 微生物学报, 2007, **47**(3): 508–511.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准(GB/T 4789.20-2003, 食品卫生微生物学检验: 水产食品检验). 北京: 中国标准出版社, 2003, pp.153–156.
- [12] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. 中华人民共和国国家标准(SN 0173-92, 出口食品副溶血性弧菌检验方法. 北京: 中国标准出版社, 1992, pp.1–11.
- [13] Yukiko HK, Tokuhiro N, Hiroshi N, *et al.* Improved method for detection *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *App and Env Microbiol*, 2001, **67**(12): 5819–5823.
- [14] 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准(GB/T 4789.7-2003, 食品卫生微生物学检验: 副溶血性弧菌检验). 北京: 中国标准出版社, 2003, pp.47–51.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Holt JG, Krigs NR. *Bergey's manual of bacteriology*. 9thEd. London: Williams and Wilkins Press, 1994, pp.1224–1289.
- [17] 马光刚, 郭福生, 王 娟, 等. 海产品中副溶血弧菌的分离与鉴定. 中国动物检疫, 2002, **19**(9): 25–28.
- [18] 管远志, 王艾琳, 李 坚主编. 医学微生物学实验技术. 北京: 化学工业出版社, 2006, pp.32–47.
- [19] 纪伟尚, 许 兵, 徐怀恕. 细菌的活的非可培养状态. 微生物学通报, 1990, **17**(6): 362–364.
- [20] 寇运同, 李伟才, 贾 臻, 等. 副溶血弧菌的活的非可培养状态的研究. 检验检疫科学, 2000, **10**(2): 16–18.
- [21] DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, *et al.* Molecular, serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *App and Env Microbiol*, 2003, **69**(7): 3999–4005.

编辑部公告

关于《微生物学通报》2008 年度开始专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特约编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 编辑部已开始接受 2008 年度专题刊申请, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: E - mail: tongbao@im.ac.cn 或 Tel: 010-64807511。

《微生物学通报》编辑部

2007 年 8 月 29 日