

冰鲜金鲳鱼样品中一株副溶血性弧菌的 分离与鉴定

柯艳坤, 阚式绂, 钟雷响, 汪清, 罗国强, 但琨*

(深圳市农产品质量安全检验检测中心, 深圳 518005)

摘要: **目的** 对一株分离于冰鲜金鲳鱼样品中的菌株进行分析鉴定。**方法** 利用 TCBS 培养基和弧菌选择性培养基从冰鲜金鲳鱼样品中分离到 1 株菌株 sznjV083, 并对该菌株的菌落形态、生理生化特征及其分子生物学特性进行分析。同时进行副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)标准菌株 ATCC33847, 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)标准菌株 ATCC27562 的质控检验。**结果** 该菌株在 TCBS 平板上呈现蓝绿色菌落, 而在弧菌显色平板上呈现深蓝色菌落, 其全自动生化鉴定结果显示其为创伤弧菌。PCR 试验和 16S rDNA 序列分析表明, 该菌株为副溶血性弧菌并与参考菌株 *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP(登陆号 CP003973.1)的同源性最高。且该菌株的毒力基因 *tdh*、*trh* 检测为阴性。**结论** 分离于冰鲜金鲳鱼样品中的菌株 sznjV083 为副溶血性弧菌。在副溶血性弧菌的检测中, 除了常规的生理生化等方法外, 还应该结合 16S rDNA 基因序列分析或 PCR 方法提高检测结果的特异性和灵敏度, 以保证检测结果的真实性和准确性。

关键词: 副溶血性弧菌; 生理生化特征; PCR; 16S rDNA 序列; 系统发育树

Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from iced fresh *Trachinotus ovatus*

KE Yan-Kun, KAN Shi-Fu, ZHONG Lei-Xiang, WANG Qing, LUO Guo-Qiang, DAN Kun*

(Shenzhen Inspection and Testing Centre for Quality and Safety of Farm Products, Shenzhen 518005, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and identify a bacterium which isolated from ice fresh *Trachinotus ovatus* sample. **Methods** A bacterium named sznjV083 was isolated from ice fresh *Trachinotus ovatus* sample on TCBS and vibrio chromogenic medium, and then physiological and biochemical characteristics were characterized, and molecular biological characteristics were analyzed. At the same time, the standard strain ATCC33847 (*Vibrio parahaemolyticus*) and standard strain ATCC27562 (*Vibrio vulnificus*) were tested for quality control. **Results** Its colonies features on TCBS were blue-green and on vibrio chromogenic medium were dark-blue. VITEK 2 Gram-Negative identification card showed that it was *Vibrio vulnificus*. Real-time PCR showed that it was *Vibrio parahaemolyticus*. The results about sequence analysis of 16S rDNA and phylogenetic tree showed that sznjV083 was very closed to *Vibrio Parahaemolyticus* BB22OP (Accession CP003973.1). The virulence genes *tdh* and *trh* were detected as negative. **Conclusion** Comprehensive

基金项目: 深圳市科技计划资助项目(JCYJ20140419145738522)

Fund: Supported by Science and Technology Program Projects of Shenzhen (JCYJ20140419145738522)

*通讯作者: 但琨, 高级兽医师, 主要研究方向为农产品质量安全和动物性食品安全。E-mail: dkd2009@qq.com

*Corresponding author: DAN Kun, Senior Veterinarian, Shenzhen Inspection and Testing Centre for Quality and Safety of Farm Products, Shenzhen 518005, China. E-mail: dkd2009@qq.com

analysis of the results of real-time PCR and 16S rDNA sequence analysis, bacterium sznjV083 which isolated from ice fresh *Trachinotus ovatus* sample was belonged to *Vibrio parahaemolyticus*. In the detection of *Vibrio parahaemolyticus*, in addition to the conventional physiological and biochemical methods, the experiment should also improve the specificity and sensitivity of detection results according to molecular biological method, such as the 16S rDNA gene sequence analysis or PCR method.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; physiological and biochemical characteristics; PCR; 16S rDNA; phylogenetic tree

1 引言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于弧菌属(*Vibriosis*), 是一种革兰氏阴性多形态杆菌、无芽孢、广泛存在的海洋细菌, 主要分布于沿岸海水、海河交界处及海产品中, 是沿海地区引起食物中毒的主要病原菌。副溶血性弧菌引起人类食物中毒和急性肠胃炎已成为全球重要的公共卫生问题之一^[1-3]。该菌是美国海产品消费相关人类胃肠炎的首要原因, 是日本、印度等亚洲国家细菌性食源性疾病的首要原因。在我国 2003-2008 年 12 个省份上报国家食源性疾病预防网的数据显示, 每年副溶血性弧菌均为食源性疾病预防事件的最常见病因^[4]。因此, 在市售海产品中检测该菌对源头控制副溶血性弧菌引起的食源性疾病预防有重要意义, 通过了解市售海产品中副溶血性弧菌的污染状况, 可以提醒消费者采用合理的加工和食用方法。本研究从冰鲜金鲳鱼样品中分离出一株弧菌 sznjV083, 通过对其菌落形态、生理生化特征及其分子生物学特性进行分析研究, 最终确定为一株副溶血性弧菌, 并与已报到的 *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP(登陆号 CP003973.1) 的 16S rDNA 一致。最后对该菌株是否携带编码耐热性溶血毒素(thermostable direct hemolysin, TDH)的 *tdh* 基因和编码 TDH 相关溶血毒素(TDH related hemolysin, TRH)的 *trh* 基因进行检测。本研究不仅为进一步了解深圳市售冰鲜金鲳鱼样品中副溶血性弧菌的污染状况提供数据, 并为有效、准确地鉴定来源于海产品中副溶血性弧菌提供了良好的参考价值。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验仪器: MIR-262 生化培养箱, 日本 SANYO

公司; HVE-50 自动高压灭菌器, 日本 HIRAYAMA 公司; Leica DM2000 显微镜, 德国莱卡公司; 杜邦 BAX® System Q7 全自动病原微生物检测系统, 美国杜邦公司; 全自动微生物鉴定分析系统 VITEK 2 Compact, 法国梅里埃公司; 拍击式均质器, 西班牙 interscience 公司。

主要试剂: 碱性蛋白胨水(APW)、3% 氯化钠碱性蛋白胨大豆琼脂购自北京陆桥公司; VITEK 2 GN 革兰氏阴性菌鉴定卡购自法国梅里埃公司; 弧菌显色培养基购自科玛嘉公司; BAX®系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的 PCR 检测试剂盒购自美国杜邦公司; 副溶血弧菌(TDH、TRH 基因)检测试剂盒购自深圳市生科源技术有限公司。

标准参考菌株: 副溶血性弧菌标准菌株 ATCC33847, 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)标准菌株 ATCC27562, 购自上海慧耘生物科技有限公司。

实验样品: 2014 年 9 月份购于深圳某批发市场冰鲜金鲳鱼。

2.2 实验方法

2.2.1 取样与增菌

参考 GB 4789.7-2013, 食品卫生微生物学检验: 副溶血性弧菌检验中所述方法: 以无菌操作取样品 25 g, 加入到 3%氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 混匀, 37 °C 培养 8 h ~ 18 h。同时将标准菌株 ATCC33847, ATCC27562 进行复壮。

2.2.2 分离培养

将上述增菌液挑取一环划线接种 TCBS 琼脂平板, 37 °C 培养 18 h, 从 TCBS 琼脂平板上挑取可疑形态单菌落划线于弧菌显色培养基上, 37 °C 培养 24 h。

2.2.3 纯培养

挑取弧菌显色培养基上的可疑单个菌落在 3% 氯化钠碱性蛋白胨大豆琼脂纯化培养 24 h。

2.2.4 初步鉴定

2.2.3 纯培养的菌落进行氧化酶试验, 接种 3%氯

化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层,嗜盐性试验以及革兰氏染色。

2.2.5 生化确定鉴定

2.2.3 纯培养的且 2.2.4 初步鉴定符合副溶血性生理生化特征的菌落在全自动微生物鉴定分析系统 VITEK 2 Compact 进行生化鉴定。

2.2.6 BAX®系统 PCR 检测

将 2.2.5 生化确定鉴定的菌落用 BAX®系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的 PCR 检测试剂盒进行荧光 PCR 检测,操作按照说明进行。

2.2.7 复壮后的标准菌株 ATCC33847, ATCC27562 也按 2.2.2-2.2.6 方法进行鉴定。

2.2.8 16S rDNA 序列测定

纯化的菌株送生物工程(大连)有限公司进行 16S rDNA 菌种鉴定。

2.2.9 副溶血性弧菌毒力基因 *tdh*、*trh* 的检测

tdh 基因和 *trh* 基因检测参见试剂盒(深圳市生科源)方法。

3 结果与分析

3.1 分离培养结果

菌株在 TCBS 平板上呈绿色、圆形、光滑中心突起的菌落。而在弧菌显色平板上是深蓝色、圆形、光滑突起的菌落,命名该菌株为 sznjV083。标准参考菌株副溶血性弧菌 ATCC33847 在弧菌显色平板上呈紫红色菌落,创伤弧菌 ATCC27562 呈浅蓝色菌落。

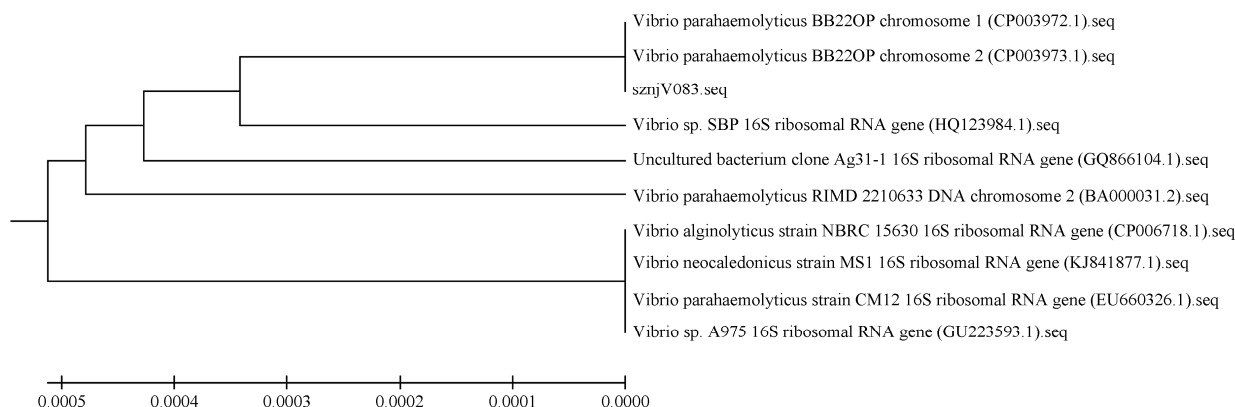
3.2 生理生化鉴定结果

将分离得到的菌株 sznjV083 以及标准参考菌株 ATCC33847、ATCC27562 进行生理生化鉴定,比较分析发现,菌株 sznjV083 8%氯化钠胰胨水、10%氯化钠胰胨水、3%阿拉伯糖和 3%甘露醇等指标均为阳性,与副溶血性弧菌 ATCC33847 一致,与创伤弧菌 ATCC27562 不同,符合副溶血性弧菌典型菌株的特征。而 VITEK 2 GN 革兰氏阴性菌鉴定卡鉴定为创伤弧菌,结果见表 1。

表 1 分离菌株 sznjV083 和标准菌株的生理生化
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of sznjV083, ATCC33847, and ATCC33847

实验项目	结果		
	分离菌株 sznjV08	ATCC33847	ATCC27562
革兰氏染色	杆状、弧状、无芽孢	杆状、弧状、无芽孢	杆状、弧状、无芽孢
氯化钠三糖铁试验	斜面呈紫红色,底层为黄色,不产气及硫化氢	斜面呈紫红色,底层为黄色,不产气及硫化氢	斜面呈紫红色,底层为黄色,不产气及硫化氢
氧化酶	+	+	+
无盐胰胨水	-	-	-
6%氯化钠胰胨水	+	+	+
8%氯化钠胰胨水	+	+	-
10%氯化钠胰胨水	微弱生长	微弱生长	-
42℃生长	+	+	+
3%阿拉伯糖	+	+	-
3%乳糖	-	-	-
3%蔗糖	-	-	-
3%甘露醇	+	+	-
ONPG	+	-	+
GN 革兰氏阴性菌鉴定卡	98% <i>Vibrio vulnificus</i>	99% <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99% <i>Vibrio vulnificus</i>

注: + 示阳性; - 表示阴性。



注: 0.0000 表示无差异性

图 1 菌株 sznjV083 的 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the bacterium sznjV083 based on 16S rDNA sequence

3.3 BAX®系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的实时荧光 PCR 检测结果

通过 BAX®全自动病原菌(弧菌)检测系统对菌株 sznjV083 和标准菌株 ATCC33847、ATCC27562 的 DNA 特异性片段进行实时荧光 PCR 分析, 检测结果显示: 菌株 sznjV083 为副溶血性弧菌, 标准菌株 ATCC33847 结果则为副溶血性弧菌, ATCC27562 为创伤弧菌。

3.4 16S rDNA 序列测定结果

利用 MEGA 5.2 软件生物学分析软件, 将测序得到的菌株 sznjV083 16S rDNA 序列与其它 9 株典型菌株进行遗传信息学分析, 结果表明菌株 sznjV083 的 16S rDNA 与参考菌株 *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP(登陆号 CP003973.1)的同源性最高, 差异性为 0.0000(见图 1)。结合其菌落特征、生理生化以及 PCR 鉴定结果, 可确定该菌株是副溶血性弧菌。

3.5 毒力基因检测结果

通过对菌株 sznjV083 的毒力基因 *tdh*、*trh* 进行检测, 结果均为阴性。

4 讨论与结论

对于副溶血性弧菌的鉴定, 现在大多采用传统培养分离的方法, 如 GB 4789.7-2013 和美国 FDA 细菌分析手册进行, 该方法用时周期长, 过程繁琐, 且生化鉴定会出现假阳性和假阴性的结果^[5]。目前, 分子生物学检测方法也运用在副溶血性弧菌的检测中,

如 SN/T 3196-2012 中采用的 BAX®系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的荧光 PCR 检测方法, 能快速筛选出水产品中三种弧菌; 行标 No. 2010B152 《产毒副溶血性弧菌快速检验方法》中的第一法特异性三重 PCR, 能快速检测副溶血性弧菌及致病性副溶血性弧菌^[6]。张蕾^[7]等建立了副溶血性弧菌免疫纳米磁珠结合环介导等温扩增技术(LAMP), 可以高效、特异性富集副溶血性弧菌, 缩短了检测时间等。

本研究从冰鲜金鲳鱼中分离到的菌株 sznjV083 在 TCBS 平板上呈现绿色菌落, 为了弥补 TCBS 平板特异性差的缺点^[8,9], 我们又利用弧菌显示平板和生理生化鉴定进一步验证其菌落形态, 发现菌株 sznjV083 在弧菌显色平板上呈现出深蓝色, 不属于常见弧菌在弧菌显色平板上呈现的颜色^[9], 标准菌株 ATCC33847、ATCC27562 在弧菌显色平板上的菌落符合应有的菌落特征。虽然菌株 sznjV083 初步生理生化与副溶血性弧菌的特性相符, 但 GN 革兰氏阴性菌鉴定卡鉴定后得出的结论为创伤弧菌(表 1)。

为了准确鉴定菌株 sznjV083, 本研究进行了 BAX®系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的荧光 PCR 检测和 16S rDNA 序列分析, 并采用 MEGA 5.2 软件对菌株的 16SrDNA 测序结果进行遗传分析(图 1), 荧光 PCR 检测结果为副溶血性弧菌, 16S rDNA 序列遗传分析显示实验菌株 sznjV083 和参考菌株 BB22OP(登录号 CP003973.1)的同源性无任何差异, 说明该菌株可能是来源于 BB22OP 的菌株。而与其他参考菌株同源性比较结果发现, 与 HQ123984.1 和 GQ866104.1 的同源性差异分别为 0.033%和 0.042%,

与 BA000031.2 的同源性差异为 0.048%, 而在与其他 4 株参考菌株 CP006718.1、KJ841877.1、EU660326 和 GU223593.1 进行同源性差异分析时, 我们发现该实验菌株与其同源性差异均为 0.051%。综上所述, 根据菌落形态、生理生化特征及其分子生物学特性, 确定菌株 sznjV083 为一株副溶血性弧菌。

菌株 sznjV083 的生化特性与副溶血性弧菌应有的生化性状有差异, 分析可能是由于该菌修复不完全如在低温生长环境生长(该样品为冰鲜状态)或者是因为增菌时发生变异(使用选择性增菌液 APW)而导致^[9,10]。分子流行病学证据证实 *tdh* 和 *trh* 基因与肠胃炎发生有必然联系, 证明 *tdh* 和 *trh* 都是副溶血性弧菌的毒力基因^[11,12], 菌株 sznjV083 *tdh* 和 *trh* 基因均未检出, 表明该菌株不会导致对人类致病, 可能为该菌株从水产品中分离得到的有关^[13,14], 也吻合中国副溶血性弧菌水产品分离株毒力基因携带率非常低的情况^[5]。

副溶血性弧菌 BB22OP(登录号 CP003973.1)是一株在 1980 年代于孟加拉国分离的环境菌株^[15]。我们后续将对菌株 sznjV083 的生化特性产生变化的原因以及与 BB22OP 的遗传进化关系进行研究。

通过本研究的结果, 我们建议在副溶血性弧菌检测工作中除了常规的生理生化鉴定外, 还应该结合分子生物学的方法如 PCR、16S rDNA 序列分析等方法鉴定, 以保证检测结果的真实性和准确性。

参考文献

- [1] 蒋原. 食源性病原微生物检测指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [2] Jiang Y. Guide for detection of foodborne pathogenic microorganisms [M]. Beijing: China Standard Press, 2010.
- [3] Vengadesh L, Wai-Fong Y, Learn-Han L, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia [J]. Front Microbiol, 2015, 6(33): 1–11.
- [4] 贾文祥. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [5] Jia WX. Medical Microbiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.
- [6] Wu Y, Wen J, Ma Y, et al. Epidemiology of food borne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003–2008 [J]. Food Control, 2014, 46: 197–202.
- [7] 李薇薇, 王晓英, 郭云昌. 中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 239–243.
- [8] Li WW, Wang XY, Guo YC. Distribution of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in China [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(3): 239–243.
- [9] 陈丽萍, 刘忠民, 陈芸, 等. 特异性三重 PCR 快速检测副溶血性弧菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(4): 764–775.
- [10] Chen LP, Liu ZM, Chen Y, et al. Specific multiplex-PCR method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Microbiol, 2014, 41(4): 764–775.
- [11] 张蕾, 张海予, 曾静, 等. 海产品中副溶血性弧菌免疫磁分离和环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5): 401–405.
- [12] Zhang L, Zhang HY, Zheng J, et al. A novel method of nano-immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification for detecting *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(5): 401–405.
- [13] 赵广英, 申科敏, 励建荣. 水产品中多种致病性弧菌的分离鉴定[J]. 食品科技, 2009, 34(11): 279–283.
- [14] Zhao GY, Sheng KM, Li JR. Isolation and identification of the *Pathogenic vibrio* in aquatic products [J]. Food Sci Technol, 2009, 34(11): 279–283.
- [15] Hara-Kudo Y, Nishina T, Nakagawa H, et al. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(12): 5819–5823.
- [16] 陈露露, 盛满钰, 张海燕, 等. 副溶血性弧菌在不同冻藏时间内生化性状变化的研究[J]. 食品工业, 2011, 8: 89–91.
- [17] Chen LL, Sheng MY, Zhang HY, et al. The exploration of the changes of biochemical properties of *Vibrio Parahaemolyticus* in different frozen storage time [J]. Food Ind, 2011, 8: 89–91.
- [18] 张捷, 李兆杰, 王煜, 等. 基于分子马达生物传感器技术的副溶血性弧菌分子分型方法的初步研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1279–1289.
- [19] Zhang J, Li ZJ, Wang Y, et al. A preliminary study on molecular typing method for *Vibrio parahaemolyticus* based on molecular motor biosensor [J]. J Microbiol, 2013, 40(7): 1279–1289.
- [20] Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrioparahaemolyticus* with gastroenteritis [J]. Infect Immun, 1990, 58(11): 3568–3573.
- [21] 程苏云, 李恩民, 张俊彦, 等. 不同来源的副溶血性弧菌生物学特性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 112–113.
- [22] Cheng SY, Li NM, Zhang JY, et al. Biologic Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources [J]. Chin J Food Hyg, 2006, 18(2): 112–113.

- [14] 宁喜斌, 刘代新, 张继伦. 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[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 918–922.
- Ning XB, Liu DX, Zhang JL. *Vibrio parahaemolyticus* from seafood: their isolation, identification phenotypic comparison with clinical isolates [J]. J Microbiol, 2008, 35(6): 918–922.
- [15] Jensen RV, Depasquale SM, Harbolick EA, *et al.* Complete genome sequence of prepandemic *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Genome Announcements, 2013, 1(1): 1–2.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



柯艳坤, 硕士, 兽医师, 主要研究方向为食源性致病菌和寄生虫的检验。
E-mail: keyankun2004@126.com



但 琨, 学士, 高级兽医师, 主要研究方向为农产品质量安全和动物性食品安全。
E-mail: dkd2009@qq.com