

连云港海域副溶血性弧菌的分布状况及危害性评估

王洪斌, 阎斌伦, 邵营泽, 徐加涛

(淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要:对连云港周边不同海域的海水及海产品中的副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)进行分离,对检出菌株进行溶血性及耐药性检测。菌株检出率78%,溶血素阳性率68%,文蛤浸养感染率及死亡率20%~30%;耐药性检测结果表明,其对GN、SXT、TE、CAZ、CTX、CRO、CI、DO和NOR较为敏感,耐药率低于10%;对FR和AMP的耐药率在60%以上。连云港海域内及海产品中均存在副溶血性弧菌的污染,其中TRH型毒素分布较多。对海水养殖行业及人体健康具有潜在危险性。

关键词:连云港;副溶血性弧菌;分布状况;危害性

中图分类号:S931.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2008)01-0062-03

海水集约化养殖业的飞速发展,促进了水体的营养富集化进程,弧菌类为主的各种致病菌导致养殖生物诸多病害的发生,给养殖业带来巨大的损失。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是一种嗜盐性细菌,分布于海湾、近海海域、盐湖及海产品中,是海洋水体及海洋生物的主要致病菌之一。副溶血弧菌能感染海水鱼类、对虾、甲壳类等多种水产动物,是一类严重危害海水养殖的重要病原菌,同时也是沿海地区夏秋季食物中毒的主要病原菌。

为了解江苏连云港周边海域及海产品中该菌的分布状况及其潜在危害性,为水产决策部门及养殖单位提供科学依据,我们对该海域的海水及海产品中的副溶血性弧菌进行了分离,并对检出菌株进行溶血性检测、抗生素敏感试验及文蛤毒力试验。

1 材料与方法

1.1 样本

2006年9、10月份收集江苏省连云港市沿海不同区域的海水(一般海水、水产养殖池海水)21份,海产品样本分别采自连云港市墟沟、新浦水产品市场(海洋鱼类、章鱼、乌贼、对虾、文蛤等),共计47份。海水样本通过离心处理(5 000 r/min, 5 min),收集沉淀物待用。海产品用流水冲洗体表,鱼体去头去鳞,虾、贝去壳待检。

1.2 仪器与试剂

TCBS琼脂购自青岛高科园海博生物技术有限

公司;碱性蛋白胨水、3.5%氯化钠三糖铁琼脂为本单位微生物实验室配制;抗生素药敏纸片(氨苄西林AMP、呱拉西林PIP、头孢拉定CAZ、阿莫西林AMC、头孢CTX、头孢曲松GRO、氯霉素CI、庆大霉素GN、阿米卡星AK、强力霉素DO、痢特灵FR、四环素TE、甲氧苄啟SXT、诺氟沙星NOR、环丙沙星CIP)购自杭州天和微生物试剂有限公司;API-20NE试条及VITEK-NFC试卡购自法国生物梅里埃公司。

1.3 方法

1.3.1 定性试验 用灭菌剪刀取鱼肉及虾腹节肌肉、贝类肌肉25 g,在225 mL灭菌碱性蛋白胨水中充分均质后,于37℃、18 h增菌,划线接种TCBS平板,海水沉淀物同样增菌后划线,挑取TCBS平板上草绿色圆形菌落接种在三糖铁斜面,用API-20NE试条及VITEK试卡进行鉴定,耐盐试验(0、3.5%、7%、10% NaCl)作进一步鉴定。样本接种及菌株分离按操作规程进行(叶应妩和王毓三,1997)。

1.3.2 溶血素检测试验 将分离菌的纯培养物接种于羊血琼脂平板(3.5% NaCl)上,检测耐热血素(thermostable direct hemolysin, TDH)和不耐热血素(thermostable related hemolysin, TRH),经37℃、18~24 h培养,观察溶血情况,菌苔周围出现溶血圈为阳性。阳性菌株用PCR法检测基因。根据Genebank中序列(M88112)设计引物,上游:5, -CG ATG AAA CTA AGA CTC TAC TT-3;下游:5, -GC TTA AAT TTG TGA CTT ACA TT-3;以随机抽取的1株阳性菌株基因组为模板进行PCR扩增。条件为94℃预变性5 min,95℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸40 s,72℃终止延伸10 min。

收稿日期:2007-07-02

基金项目:淮海工学院海洋学院重点学科建设项目。

作者简介:王洪斌,1966年生,男,江苏连云港人,硕士,讲师,主要从事微生物技术方面的教研工作。E-mail:whbvirus@126.com

1.3.3 感染文蛤试验 随机取海水养蛤池中检出菌株 3 株,用 24 h 培养菌制成生理盐水菌悬液,加入饲养文蛤的玻璃缸中,每天加入 2.0×10^8 个/mL 菌悬液 12 mL,共加 7 d,水体中菌密度为 5.4×10^5 个/mL;同时以不加菌为对照组。

1.3.4 药敏试验 药敏试验采用 WHO 推荐的 K-B 法,结果按美国临床实验室 (NCCLS) 1999 年标准进行判断。

2 结果

2.1 定性试验

本研究中 31% 的样品来自连云港沿海不同水体,69% 来自农贸市场, Vp 的检出率为 78%, 其中市场样品平均菌量最高,其次是水产养殖池,一般海水中较低 (见表 1), 样品含菌量的差别说明副溶血性弧菌的污染状况。经耐盐试验检测,检出菌均具有一定的嗜盐性,在 3.5%、7.0% NaCl 蛋白胨水中均能良好生长,而在 0、10% NaCl 浓度中不生长。

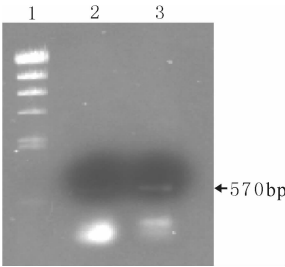
2.2 溶血素检测试验

将检出菌株分别划线接种在羊血琼脂平板 (3.5% NaCl) 上,68% (36/53) 菌株为阳性。阳性菌株随机抽取 1 株 PCR 法检测 *trh* 基因,扩增出预期大小的特异性条带 (见图 1), 结果与羊血琼脂平

板检测一致。

表 1 不同采样点副溶血性弧菌检测结果
Tab.1 The test results of *Vibrio parahaemolyticus* in different sampling sites

采样点 Sampling sites	样本数/ 个 Samples	不同样品菌量中的 Vp 检出率/% The detection rate of Vp in different samples				
		0	$<10^2$	$10^2 \sim 10^3$	$10^3 \sim 10^4$	$>10^4$
一般海水	10	60	20	10	10	0
养殖池海水	11	37	18	37	8	0
市场海产品	47	10	40	37	3	10



1 - λ DNA Marker (HindIII/EcoRI); 2 - 阴性对照 (无菌水为模板); 3 - 阳性结果 (阳性菌株)。
1 - λ DNA Marker (HindIII/EcoRI); 2 - negative control (sterile water for templates); 3 - positive results (positive strain).

图 1 *trh* 基因 PCR 结果

Fig.1 The PCR results of *trh* gene

2.3 感染文蛤试验

感染文蛤的试验结果见表 2。

表 2 感染文蛤的试验结果

Tab.2 Infected clams support the findings of the trial

菌株号 Strain	菌液日添 加量/mL the additive quantities of bacteria	文蛤数/ 只 Clams	第 1 天 1 d	第 2 天 2 d	第 3 天 3 d	第 4 天 4 d	第 5 ~ 7 天 5 ~ 7 d	感染率/ % Infection	死亡率/ % Death rate
12	12	10	正常	正常	死亡 1 只	死亡 2 只	7 只正常	30	30
14	12	10	正常	正常	正常	死亡 2 只	8 只正常	20	20
21	12	10	正常	正常	正常	死亡 1 只	死亡 2 只	30	30
对照	0	10	正常	正常	正常	正常	死亡 1 只	10	10

2.4 药敏试验结果

检出副溶血性弧菌对 15 种抗生素的耐药情况如图 2 所示。耐药率最高的是 AMP, 为 71%; 其次为 FR 61%、PIP 30%、CIP 29%、AK 26%、AMC 10%、GN 7.8%、SXT 6.3% 和 TE 5%; 副溶血性弧菌 CAZ、CTX、CRO、CI、DO 和 NOR 耐药性极低。

3 讨论

本研究是国内首次对某一地区海域、海水养殖池以及本地海产品中的副溶血性弧菌分布状况进行的定量和定性检测的研究。微生物污染危险性评估在食品行业经常开展,而在海水养殖行业进行类似

评估的报道极少。

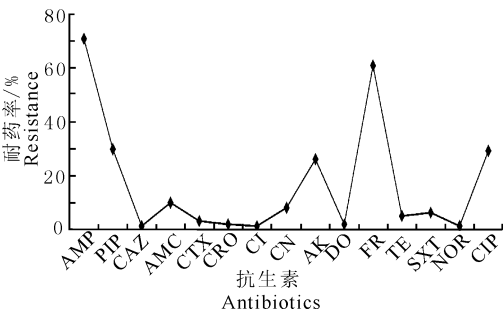


图 2 副溶血性弧菌的耐药性检测结果
Fig.2 The test results of *Vibrio parahaemolyticus* resistance

对副溶血性菌致病机制的初步研究发现其致病力主要有侵袭力、溶血毒素和尿素酶。流行病学调查表明其致病性与其溶血能力呈平行关系。产生2种类型的溶血素,即耐热的直接溶血毒素(TDH)和不耐热的溶血相关毒素(TRH)。2种溶血素均具有致死性,注射纯化的TDH 5 μ g或TRH 10 μ g,均可使5周龄的小鼠在1 min内死亡(Honda T et al, 1988)。Kishishita等(1992)研究认为,*trh*基因产物对人、鼠、羊、牛的红细胞均有溶血作用,*tdh*基因产物对羊的红细胞不敏感。本研究的溶血素检测,采用羊血琼脂,68%菌株为阳性,PCR检测*trh*基因加以肯定,说明TRH毒素较多,在海水、海水养殖池、海产品中均有一定的分布,市场海产品携带居多,对本地区水产养殖及人体健康有潜在的危险。本研究在采集样本时,正值文蛤养殖病害爆发,所以本研究中感染试验选用同时期的健康文蛤作为对象。一般认为溶藻弧菌和鳃弧菌很少经口传染引起弧菌病,副溶血弧菌引起的病害是否经口传染尚未见报道。本次试验结果表明,感染3d后文蛤有少量死亡,7d死亡率达20%~30%;但作者认为,供试样本偏少、

该时期的文蛤病害是否由副溶血性弧菌引起、采集的健康文蛤是否已经被感染、实验室条件与养殖池的差异性以及其它一些相关影响因素均存在着很大的不确定性,有关这方面的研究有待进一步深入。

副溶血性弧菌对GN、SXT、TE、CAZ、CTX、CRO、CI、DO、NOR较为敏感,耐药率低于10%;对FR和AMP的耐药率在60%以上。耐药性高与本地区在水产病害防治过程中经常使用FR、AMP有关。

参考文献:

- 叶应妩,王毓三. 1997. 全国临床检验操作规程(第2版)[M]. 南京:东南大学出版社.
- Honda T, et al. 1988. Purification and characterization of hemolysin produced by a clinical isolate of kanagawa phenomenon - negative vibrio parahaemolyticus and related to the thermostable direct hemolysin[J]. Infection and Immunity, 56(4): 961 - 965.
- Kishishita M, et al. 1992. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin - related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Appli & Environm Microbiol, 58(8): 2 449 - 2 457.

(责任编辑 万月华)

Study of the Pollution by *Vibrio parahaemolyticus* in Different Sea Area in the City of Lianyungang and its Otential Dangerous

WANG Hong-bin, YAN Bin-lun, SHAO Ying-ze, XU Jia-tao

(Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Lianyungang 222005, China)

Abstract: Understand the distribution of the *Vibrio parahaemolyticus* in the sea around the city of lian yun gang and that distribution in the marine product. Then study the toxicity and the drug tolerance of them. Methods: study the *Vibrato parahaemolyticus*, which were collected from salt water in different sea area or form different marine products in the city of Lian yun gang. The extracted samples were measured and analyzed for their haemolysin and drug resistance. The detection rate of the bacterium was 78%; the positive rate of haemolysin was 68%; the infection rate and death rate of the cultural meretrix was 20%~30%; the result of drug resistance showed that they were more sensitive to GN、SXT、TE、CAZ、CTX、CRO、CI、DO and NOR. The drug resistance rate is below 10%. While the rate of FR and AMP is above 60%. Conclusions: the salt water and marine products in different sea area in the city of lian yun gang are both polluted with *Vibrio parahaemolyticus*. The toxin of TRH type exists on wider scale. They were potentially dangerous to both aquiculture in the sea and the human health.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; para - haemolytics; drug resistance