

海产品中溶藻弧菌的筛选及其致病因子的研究

彭喜春, 张宁, 冉艳红, 桂博, 陈龙

(暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘要: 溶藻弧菌能引起人类食物中毒。溶血毒素、耐热性肠毒素 (ST) 和不耐热性肠毒素 (LT) 是致病性微生物中常见的致病因子。本文对从扇贝、牡蛎、贻贝、沙虾、虾蛄等海产品中筛选的溶藻弧菌的种属和致病因子进行了研究, 生化鉴定显示分离到的两株溶藻弧菌来源不同, 基因测定显示它们同属于溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*); 血琼脂平板法、兔小肠结扎法和乳鼠灌胃法显示来源不同的溶藻弧菌其产毒种类也不同, 两株溶藻弧菌都能产生不耐热性肠毒素 (LT) 和耐热性肠毒素 (ST), 但只有 1 株能产生溶血毒素。

关键词: 溶藻弧菌; HSP60 基因; 耐热性肠毒素; 不耐热性肠毒素; 溶血毒素

中图分类号: Q935; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)04-0312-04

Screening of *Vibrio Alginolyticus* in Sea Foods and their Pathogenic Factors

PENG Xi-chun, ZHANG Ning, RAN Yan-hong, GUI Bo, CHEN Long

(Department of Food Science and Engineering, College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Hemolysin, heat-stable enterotoxin (ST) and liable-heat enterotoxin (LT) were common pathogenic factors in pathogenic microbes, such as *Vibrio Alginolyticus*. In this study, two strains of *Vibrio Alginolyticus* were screened from several kinds of sea foods and identified by different methods. Both of the two strains could produce LT and ST, one of which showed hemolysin activity. It was inferred that *Vibrio alginolyticus* from different sources could produce different toxins.

Key words: *Vibrio Alginolyticus*; heat-stable enterotoxin; heat-labile enterotoxin; hemolysin.

溶藻弧菌属专性嗜盐性弧菌是引起牙鲆和鳎等许多名贵经济鱼类发生细菌性鱼病的致病菌之一, 威胁着我国的水产养殖业发展, 它的大面积发病会给发病区渔业和养殖业带来巨大的经济损失^[1]。溶藻弧菌过去一直被认为不致病或仅能引起部分创伤性感染而未受到重视, 近年研究证实该菌与副溶血弧菌一样, 是沿海地区腹泻病和食物中毒的常见病原菌^[2,3]。尽管发现海产品中的溶藻弧菌对人具有致病性, 但是目前还没发现对海产品中溶藻弧菌引起食物中毒的关键致病因子及其毒力基因的详细报道。

本实验从不同海产品中筛选溶藻弧菌, 并对其致病因子进行了研究, 为随后毒力基因的研究作准备。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-12-28

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目 (06300551), 暨南大学博士启动基金 (51205056)

作者简介: 彭喜春, 男, 博士, 讲师, 主要从事食品微生物安全研究

1.1 材料

扇贝、牡蛎、贻贝、沙虾、虾蛄等购于广州市石牌东菜市场。

1.2 主要仪器设备

超净工作台 (SW-CJ-1BU 单人单面净化工作台苏州净化设备优先公司), 自封手提式压力蒸汽灭菌器 (广东医疗设备厂), 恒温摇床 (SHZ-82, 常州国华电器有限公司)。

1.3 主要试剂

Tryptone 胰蛋白胨 (广州市普博仪器有限公司), 氯化钠 (AR, 天津市化学试剂一厂), 琼脂 (100 g, 广东省汕头市水产品综合加工厂), 酵母浸膏 (500 g, 广东环凯微生物科技有限公司), 水合氯醛 (AR, 上海化学试剂采购供应五联化工厂), TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TIANGEN PCR 产物纯化试剂盒 (由鼎国生物科技有限公司提供)。

1.4 实验用菌种

溶藻弧菌, 由福建集美大学鄢庆批教授惠赠, 由

大黄鱼中分离。下文中编号为 PCG01。

1.5 培养基的配制

LB 液体培养基: NaCl 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂粉 2 g, 溶于蒸馏水调 pH 至 7.4 并定容至 100 mL。

LB 血琼脂平板培养基^[4]: NaCl 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.5 g, 溶于蒸馏水调 pH 至 7.4 并定容至 100 mL, 分装后 121 °C 灭菌 15 min。待冷却至 60 °C 左右以无菌操作加入脱纤维兔血, 摇匀后立即倾注灭菌平皿内, 待凝固后使用。

TCBS 培养基: 酵母 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 硫代硫酸钠 10.0 g, 柠檬酸钠 10.0 g, 牛胆盐 8.0 g, 蔗糖 20.0 g, 氯化钠 10.0 g, 柠檬酸铁 1.0 g, 溴麝香草酚蓝 0.04 g, 麝香草酚蓝 0.04 g, 琼脂 14.0, pH 8.6±0.2。取 88 g, 加 1 L 蒸馏水, 加热至沸腾, 后冷却至 50 °C 左右分装入灭菌后的培养皿, 凝固备用。

邻硝基酚-β-D-半乳糖苷试验培养基: 邻硝基酚 β-D-半乳糖苷 (ONPG) 60 mg (O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 10 mL, 1% 蛋白胨水 (pH 7.5) 30 mL。将 ONPG 溶于缓冲液内, 加入蛋白胨水, 以过滤法除菌, 分装于 10 mm×75 mm 试管, 每管 0.5 mL, 用橡皮塞塞紧。

2 实验结果

2.1 菌种筛选

选取并剪出几种贝类 (扇贝、牡蛎、贻贝各 2 只) 及虾类 (沙虾、虾蛄各 4 只) 消化腺及腮部分, 分别于研钵中研磨成糊状后分别加入装有 30 mL LB 液体培养基的三角瓶中, 以 8 层纱布封口, 放入恒温培养箱 37 °C 培养 24 h。

培养 24 h 后用接种环分别挑取上述少许培养液到装有 LB 血琼脂平板培养基的培养皿中划线接种, 编号。倒板放置, 36.5 °C 培养 24 h。

从上述培养皿中挑出 3~4 个黄色 3~5 mm (直径) 单个菌落, 每单个菌落作一支斜面接种、编号, 于 35 °C 培养 24 h。革兰氏染色镜检, 呈紫色的为革兰阳性菌, 呈红色的为革兰阴性菌。然后选取革兰氏阴性反应的菌种进一步进行鉴定。

2.2 菌种的生化鉴定

对要鉴定的新鲜菌苔用 0.85% 无菌生理盐水稀释至约 10⁹ cfu/mL, 用移液枪吸取 0.05 mL 的菌液分别加入“070060 弧菌科细菌生化鉴定盒”提供的各微量生化管内。将已接种的生化管套在无菌塑料帽, 直立于三折吸塑短架内, 于 35~37 °C 培养箱中培养。结果

有 3 株菌株与标准样的鉴定相似, 如表 1。

从表 1 知虾类中未筛选到溶藻弧菌, 编号 1 和 3 与标准样的溶藻弧菌的鉴别特征极为相似, 而编号 2 中的少数几项数据有差异 (赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶及 8%, 10% NaCl 胨水), 但是根据文献^[7-9]及 070060 弧菌科细菌生化鉴定盒说明, 溶藻弧菌与霍乱弧菌的生化反应特征相似, 故不能肯定为溶藻弧菌, 需要作进一步鉴定。

表 1 生化鉴定管结果

Table 1 Results of biochemical identification

项目	编号			
	PCG01	1	2	3
1% NaCl 葡萄糖产气	-	-	-	-
1% NaCl 葡萄糖磷酸盐胨水	+	+	+	+
1% NaCl 蛋白胨水	+	+	+	+
1% NaCl 蔗糖	+	+	+	+
1% NaCl 甘露糖	+	+	+	+
1% NaCl 阿拉伯糖	-	-	-	-
1% NaCl 肌醇	-	-	-	-
1% NaCl 赖氨酸脱羧酶	-	-	+	-
1% NaCl 精氨酸双水解酶	+	+	-	+
无盐胨水	+	+	+	+
3% NaCl 胨水	+	+	+	+
6% NaCl 胨水	+	+	+	+
8% NaCl 胨水	-	-	+	-
10% NaCl 胨水	-	-	-	-

注: (1) “+”阳性, “-”阴性; (2) 注 1 号来自于扇贝, 2 号和 3 号来自于牡蛎。

霍乱弧菌可快速水解邻硝基酚-β-D-半乳糖苷 (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, ONPG) 而生成黄色的邻硝基酚, 并且在短时间内呈现阳性, 而溶藻弧菌呈现阴性, 用此种方法进一步分离确定菌种。

对表 1 的 3 种细菌用邻硝基酚-β-D-半乳糖苷试验培养基进一步鉴定。以接种环挑取新鲜菌体接种于培养基, 35 °C 培养 18h。培养后编号 3 呈黄色的阳性反应, 可鉴定为霍乱弧菌, 1 号和 2 号不变黄色, 故可断定为溶藻弧菌。

2.3 菌种的基因鉴定

HSP60 基因序列是溶藻弧菌 *V. alginolyticus* 的特征基因, 其已在 GenBank 中的登记, 存取号为 AY332570。若鉴定出有此基因序列, 则可认定菌种为溶藻弧菌 *V. alginolyticus*。

根据文献^[9]HSP60 基因保守序列设计上下游引物分别为 P1: 5'ACAACA GCAACG GTA CTA GC 3',

P2: 5'CAA CTT TCA CGA TGC CAC 3'。PCR 反应体系如下: 8 μ L dNTP mix (1.25 mmol/L), HSP60 引物 1 和 2 (5 pM) 各 10 μ L, 1.25 μ L Taq 酶 (2 U/ μ L), 3 μ L DNA 模板 (50 ng/ μ L~1 μ g/ μ L), 加 12.75 μ L ddH₂O 至总体积 50 μ L。HSP60 基因 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。1%的琼脂糖凝胶分析鉴定。对以上鉴定出的细菌进行 PCR。将 PCR 产物按 PCR 产物纯化试剂盒说明书操作纯化 PCR 产物, 测序。其总 DNA 的电泳结果见图 1, HSP60PCR 产物见图 2。

从图 2 的 HSP60 基因序列分析知, 所测 2 株菌的序列用 DNASTar 软件分析后, 其结果相同序列总长 560 bp, 将所得序列 Blast 分析显示, 2 株菌的 HSP60 基因序列均与溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 的 HSP60 基因序列的同源性最高, 为 99.8%。因此, 该 2 株菌均为溶藻弧菌 *V. alginolyticus*。

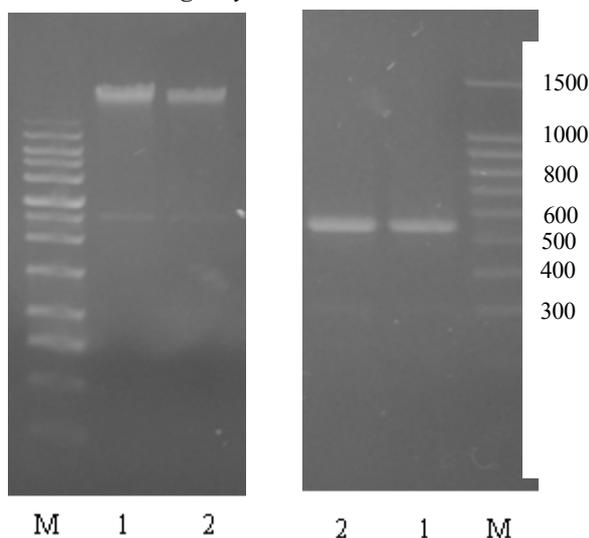


图 1 细菌总 DNA

图 2 HSP60PCR 产物

注: 图 1 中, M 代表 Marker; 1 和 2 代表 1 号和 2 号菌株; 图 2 中, M 代表 Marker; 1 和 2 代表 1 号和 2 号菌株 HSP60 基因 PCR 产物。

2.4 产毒因子的检测

目前人们对溶藻弧菌的研究大多集中在溶藻弧菌对海产生物的致病因子上, 如蛋白酶、外膜蛋白以及内毒素脂多糖等^[11~15]; 而对弧菌中可能存在的一些使人致病的因子如 ST 和 LT 的研究并不多见, 也不深入。

权太淑等^[4]报道从溶藻弧菌中检出与副溶血弧菌相同的耐热溶血素 (ST), 并发现有 86.0%的菌株呈神奈川试验阳性, 证实它的致病性与副溶血弧菌相似。林业杰等人^[9]对海产品中的部分致病溶藻弧菌的致病因子进行了检测, 发现有 3.3%和 14.3%的菌株能够分

别产生耐热性肠毒素 (ST) 和非耐热性肠毒素 (LT); 有 82.9%的菌株能产生溶血素, 但没有发现同时产生 ST 和 LT 毒素的菌株。

因此有必要对溶藻弧菌的食物中毒因子进行深入的研究, 探索不同溶藻使人致病的差异性的原因及机理。

2.4.1 溶血毒素的检测^[4]

以接种环挑取 4 株 LB 液体培养基内的新鲜菌液于血琼脂平板上划线接种, 于恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后观察结果。

血琼脂平板培养结果显示, 2 株不同来源的溶藻弧菌中, 只有 1 号溶藻弧菌具有溶血活性, 而溶藻弧菌 3 号不具有溶血活性。

2.4.2 不耐热性肠毒素 (LT) 的检测——兔小肠结扎法^[4]

LT 是蛋白质, 在 65 $^{\circ}$ C 30 min 即被破坏。LT 在肠道可刺激小肠上皮细胞的腺苷环化酶, 使 ATP 转变为 cAMP, 促进粘膜细胞的分泌亢进, 产生大量肠液, 引起腹泻^[4]。

取从海产品中鉴定出的溶藻弧菌的新鲜培养液以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 Φ 0.22 μ m 微孔滤膜无菌过滤。

将禁食 1 d 后的大白兔仰位固定于兔台上, 耳静脉缓慢注入 7%水合氯醛 (按 2~3 mL/kg BW) 4 mL, 麻醉后剖腹取出小肠, 自回肠末端开始, 结扎 4~5 节肠段, 注射段 4~5 cm, 间隔段 2~3 cm。向注射肠段注入细菌培养滤液 1 mL, 关腹。18 h 后, 再取出小肠, 检查注射细菌滤液段肠内液体是否明显增多。

2 株溶藻弧菌产 LT 的检测结果显示, 注射溶藻弧菌 1 和 2 号的肠段积液都远远大于 1 mL, 显然它们都具有很强的 LT 产生能力。

2.4.3 耐热性肠毒素 (ST) 的检测——乳鼠灌胃法^[4]

ST 分子量较小, 无免疫原性, 经 100 $^{\circ}$ C 20 min 处理不被破坏, 可以激活肠粘膜细胞上的鸟苷环化酶使胞内 cGMP 量增高, 引起体液平衡紊乱而致腹泻。对家兔小肠作用较弱, 维持时间仅 6 h 左右。乳鼠是 ST 唯一敏感动物, 故常用乳鼠灌胃法^[4]。

取乳鼠编号, 对照组 2 只经胃灌注入无菌营养肉汤培养基, 其它分别灌入 3 种细菌滤液各 0.1 mL, 禁食 3~4 h。

解剖乳鼠, 取出全部肠子, 称量乳鼠肠子重量与摘除肠道后其余部分重量, 求其重量比。实验结果如表 2 所示。

表2 溶藻弧菌产耐热性肠毒素的检测结果

Table 2 Results of *Vibrio alginolyticus* produced heat-stable

	enterotoxin		
	1	2	对照
肠重/g	0.17	0.15	0.11
去肠体重/g	1.80	1.67	1.76
比率	0.094	0.090	0.063

根据文献^[5,6],如果肠重/体重的比率大于0.09则为产ST阳性;如果比率在0.07~0.09之间,则产ST可疑;如果在0.07以下,则为ST阴性。从表2知,1和2号菌株的过滤液在注射后的乳鼠肠重/去肠体重比率均大于0.09,可以判断这两株菌为产ST阳性菌株。

3 结论

(1) 贝类存在溶藻弧菌,但种类不同。

(2) 生化鉴定显示分离到的两株溶藻弧菌有一定的区别,基因测定表明同属于溶藻弧菌 *V. alginolyticus*;

(3) 血琼脂平板法、兔小肠结扎法和乳鼠灌胃法结果证明溶藻弧菌的来源不同其产毒的种类也不尽相同,两株溶藻弧菌都能产生不耐热性肠毒素(LT)和耐热性肠毒素(ST),但只有1株能产生溶血毒素。

参考文献

- [1] 麦雪芬.一起副溶血弧菌和溶藻弧菌引起的食物中毒报告[J].中国实用药学杂志.2005,5(13):1404-1405.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 西安交通大学医学院微生物系研究室.医学微生物学实

验指导.北京:人民卫生出版社,2005

- [5] 权太淑,李薇,杨喜玲.自腹泻患者中分离溶藻弧菌及其病原性的探讨.中国公共卫生,1985,4(5):15-18.
- [6] 何坚,葛索君.溶藻性弧菌引起食物中毒的流行病学调查.中国卫生检验杂志,1997,7(6):361-362.
- [7] 纪舒萍,纪奎滨,杨暑伏,等.溶藻弧菌引起食物中毒的病原学研究[J].中华预防医学杂志.1989,23(2):71-73.
- [8] 李文科,吕玉林,吴顺娥,等.一起由溶藻弧菌引起的食物中毒[J].中华流行病学杂志.1990,11(特刊8号):99-102.
- [9] 林业杰,林勇,林金财,等.海产品携带溶藻弧菌调查[J].海峡预防医学杂志.2000,6(2):45-46.
- [10] 李宁求,白俊杰,吴淑勤,等.斜带石斑鱼3种致病性弧菌的分子生物学鉴定.水产学报.2005,29(3):356-361
- [11] Lee K K, Yu S R, Liu P C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Current microbio. 1997, 34: 110-117.
- [12] Nottage A S, Birkbeck T H. Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 [J]. J Fish Dis. 1987a, 10: 211-220.
- [13] Nottage A S, Birkbeck T H. Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the antigenic relationship between proteinase produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish [J]. J Fish Dis. 1987b,10:265-273
- [14] 董传甫,林天龙,许斌福,等.电泳和免疫印迹分析副溶血弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(7):619-623.
- [15] 叶剑敏,简纪常,吴后波,等.溶藻弧菌脂多糖的化学成分分析及其对石斑鱼的毒性[J].水生生物学报.2004,28(5):574-576

参考文献

- [1] Marrack p,Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives[J].Science 1990,248:1066
- [2] 王小红,谢笔钧,史贤明,孙科,李伟.金黄色葡萄球菌B型肠毒素的培养产毒与柱层析纯化[J].食品科学,2005,26(5):88-91
- [3] 刘如林,杨春.小核菌多糖分子形貌的电镜研究[J].南开大学学报(自然科学版),1995,28(1):68-71
- [4] 吴人杰.现代分析技术在高聚物中的应用[M].上海:上海科技出版社,1987

- [5] 王志刚,万立骏,周纯青. β -淀粉样蛋白在石墨表面吸附及凝聚结构的 STM 和 AFM 研究[J].科学通报,2002,47(12):908-911
- [6] Ricardo G,Ruben P.Dynamic atomic force microscopy methods[J].Surface science reports,2002,47(6):297-301
- [7] 柯维中,余乡慰.胰蛋白酶溶液的激光拉曼谱[J].光散射学报,1996,8(3):142-146
- [8] 邱红霞,陈惟昌.大鼠大脑皮层与纹状球体显微拉曼光谱的研究[J].生物物理学报,2001,17(3):457-461
- [9] 阎隆飞,孙之荣.蛋白质分子结构[M].北京:清华大学出版社,1999