

1 株与创伤弧菌培养特性相似的哈氏弧菌的鉴定

郑东文, 王桂兰, 钟雷响, 李颖鑫, 陈雨晴, 吴寒光*

(深圳市质量安全检验检测研究院, 深圳 518005)

摘要: 目的 对一株编号为 sznj2009 的菌株进行分析鉴定。**方法** 从水产品中分离到菌株 sznj2009, 并对该菌株的菌落形态、生化特征及生物学特性进行分析鉴定。**结果** 该菌株在弧菌显色平板上呈圆形、光滑、较小的无色菌落; 在纤维二糖粘杆菌素(Cellobiose-Colistin, CC)琼脂平板和 mCPC 平板上为圆形、扁平, 中心不透明但边缘透明的黄色菌落; 在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上为圆形、乳白色菌落。经 16S rDNA 序列分析发现, 该菌株与哈氏弧菌(ATCC33843)的进化距离近、同源性高, 相似度为 100%。**结论** 分离于水产品中的菌株 sznj2009 为哈氏弧菌。在创伤弧菌传统的生化鉴定检测工作中, 通过比较, 发现哈氏弧菌在菌落特征和生化特性上与创伤弧菌相似, 但两菌株在弧菌显色平板和生化反应上可明显区分开来, 可提高创伤弧菌的鉴定准确度, 同时为哈氏弧菌传统分离鉴定检测工作提供参考和借鉴。

关键词: 哈氏弧菌; 创伤弧菌; 菌落特征; 生化特性; 16S rDNA 序列

Identification of a strain of *Vibrio harveyi* with culture characteristics similar to *Vibrio vulnificus*

ZHENG Dong-Wen, WANG Gui-Lan, ZHONG Lei-Xiang,
LI Ying-Xin, CHEN Yu-Qing, WU Han-Guang*

(Shenzhen Institute of Quality & Safety Inspection and Research, Shenzhen 518005, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and identify a strain numbered sznj2009. **Methods** A strain of sznj2009 was isolated from aquatic products, and the colony morphology, biochemical characteristics and biological characteristics of the strain were analyzed and identified. **Results** The strain showed round, smooth, small colorless colonies on the *Vibrio* chromogenic plate; Round, flat yellow colonies with opaque centers but transparent edges on CC and mCPC plates; Round, milky white colony on 3% sodium chloride tryptone soybean agar plate. By 16s rDNA sequence analysis found that the strain and *vibrio harveyi* (ATCC33843) closer, high homology, the evolution of the similarity of 100%. **Conclusion** The strain sznj2009 isolated from aquatic products was *Vibrio harveyi*. In the traditional biochemical identification and detection of *Vibrio vulnificus*, through comparison, it is found that *Vibrio harveyi* is similar to *Vibrio vulnificus* in colony characteristics and biochemical characteristics, however, the two strains can be clearly distinguished in the plate and biochemical reaction of *Vibrio vulnificus*, which can improve the identification accuracy of *Vibrio vulnificus* and provide reference for the traditional isolation and identification of *Vibrio harveyi*.

KEY WORDS: *Vibrio harveyi*; *Vibrio vulnificus*; colony characteristics; biochemical characteristics; 16S rDNA sequence

*通信作者: 王桂兰, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食源性致病菌及寄生虫的检验。E-mail: 332392778@qq.com

*Corresponding author: WANG Gui-lan, Master, Engineer, Shenzhen Institute of Quality & Safety Inspection and Research, Shenzhen 518005, China. E-mail: 332392778@qq.com

0 引言

弧菌科 (Vibrionaceae) 是一群氧化酶阳性、发酵型的革兰阴性杆状或弯曲状细菌^[1]。主要包括弧菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属、发光杆菌属、水生杆菌属^[2]。这些细菌广泛存在于海水、淡水和水生动物中, 其中某些种别对人、鱼、鳗、蛙及其他动物有致病性^[1]。创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 属于弧菌科弧菌属, 是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 自然生存于河口和海洋环境中, 人类食用生或半生的受污染水产品可受感染引起疾病^[3]。2006年8月《Emerging infectious diseases》杂志将创伤弧菌列入最危险的细菌之列^[4]。并与霍乱弧菌、副溶血性弧菌并列为威胁人类健康的三大弧菌^[5]。进食被创伤弧菌污染的食品而引起的食物中毒是最为严重的食源性疾患之一, 免疫力低下的患者致死率高达50%-60%^[6]。

当前各检测机构普遍采用的创伤弧菌定性检测方法为 GB4789.44-2020《食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验》^[7], 检测程序包括蛋白胨-氯化钠-纤维二糖-多粘菌素 E(PNCC) 增菌液增菌、选择性平板分离、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板纯培养、生化反应鉴定。在创伤弧菌日常检测工作中, 本研究从水产品样品检测中分离到一菌株并编号 sznj2009, 通过对其菌落形态、生化特性及其 16s rDNA 序列进行分析研究, 最终确定该菌株为哈氏弧菌, 并与已报道的哈氏弧菌(ATCC33843)的 16S rDNA 一致。

在创伤弧菌传统的生化鉴定检测工作中, 发现哈氏弧菌前期培养特性与创伤弧菌相似, 易被混淆带入后期检测阶段, 造成检测工作周期延长。本研究通过总结比较两种菌在不同检测阶段的平板形态差异、生化反应差异等, 以提高创伤弧菌的鉴定准确度, 同时为哈氏弧菌传统分离鉴定检测工作提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验仪器: IPP110 生化培养箱(德国 Memmert 公司); HEV-50 自动高压灭菌器(日本 HIRAYAMA 公司)。

主要试剂: 蛋白胨-氯化钠-纤维二糖-多粘菌素 E(PNCC) 增菌液、纤维二糖-多粘菌素 E(Cellobiose-Colistin, CC) 琼脂培养基、改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E(mCPC) 琼脂培养基、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基、3%氯化钠三糖铁琼脂斜面、弧菌显色平板、创伤弧菌生化鉴定试剂盒均购自北京陆桥公司; 科玛嘉弧菌显色平板购自上海欣中生物工程有限公司。

实验样品: 2020年购于某市场的水产品。

菌株: 创伤弧菌标准菌株 ATCC27562 购自广东环凯微生物科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

根据 GB4789.44-2020 食品微生物学检验创伤弧菌检验中所述方法: 无菌操作取检验样水产品 25 g, 加入 PNCC 增菌液 225 mL, 用拍击式均质器均质 2 min, 充分混匀制备成 1:10 的样品匀液。

1.2.2 增菌

将 1.2.1 制备的样品匀液置于生化培养箱 36℃培养 18 h。同时将创伤弧菌标准菌株 ATCC27562 进行复壮。

1.2.3 分离培养

用 10 μL 接种环在距离 PNCC 增菌液的液面下 1 cm 沾取一环增菌液, 分别划线接种于 CC 和 mCPC 平板、弧菌显色平板, 于 36℃条件下培养 18 h。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

1.2.4 分纯培养

从 CC 平板和 mCPC 平板上各挑取至少 5 个创伤弧菌可疑菌落(少于 5 个时全选), 分别接种于 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板, 36℃培养 18 h 后用于后续鉴定。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

1.2.5 初步鉴定

该步骤用于创伤弧菌的初步鉴定, 进行以下 4 项鉴定实验时, 挑取的菌落来自分纯后的同一个菌落。

A) 革兰氏染色镜检: 从 1.2.4 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落进行革兰氏染色并镜检。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

B) 氧化酶试验: 用接种环从 1.2.4 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落适量, 涂布在滴有氧化酶试剂的无色载玻片上。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

C) 三糖铁试验: 用接种针从 1.2.4 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落适量, 接种于 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层(接种针不触及试管底部), 于生化培养箱 36℃培养 24 h 观察结果。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

D) 嗜盐性实验: 用接种环从 1.2.4 中 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上挑取创伤弧菌疑似菌落, 分别接种于含 0%、3%、6%、8%和 10%氯化钠的胰蛋白胨水中, 于生化培养箱 36℃培养 24 h, 观察液体的浑浊情况。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

1.2.6 确证实验

将初步鉴定为创伤弧菌的疑似菌落接种在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上, 于生化培养箱 36℃培养 24 h 后, 取纯培养物用创伤弧菌生化鉴定试剂盒进行生化鉴定。同时进行创伤弧菌标准菌株对照试验。

1.2.7 16S rDNA 序列测定

纯化的菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rDNA 菌种鉴定。

2 结果与分析

2.1 分离培养结果

如图 1A、B 所示, 菌株在 CC 和 mCPC 平板上为圆形、

扁平的黄色菌落, 命名为 sznj2009。如图 1C、D 所示, 创伤弧菌标准菌株 ATCC27562 在 CC 和 mCPC 平板上为圆形、扁平的黄色菌落。由此可知, 菌株 sznj2009 与创伤弧

菌标准菌株在 CC 和 mCPC 平板上菌落颜色、形态无明显差异, 难以区分。

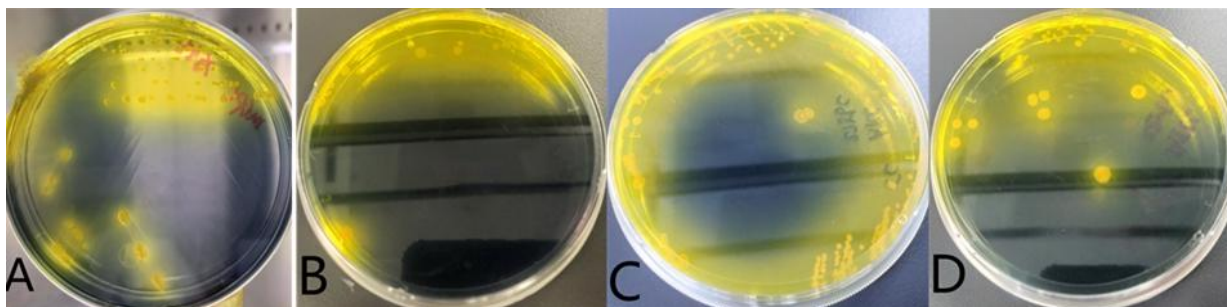


图 1 菌株 sznj2009 和创伤弧菌的菌落形态特征

Fig. 1 Colonial morphology of the bacterium sznj2009 and *Vibrio vulnificus*

如图 2A 所示, 菌株在弧菌显色平板上为圆形的乳白色菌落, 命名为 sznj2009。如图 2B 所示, 创伤弧菌标准菌株 ATCC27562 在弧菌显色平板上为圆形的蓝绿色菌落。由此可知, 菌株 sznj2009 与创伤弧菌标准菌株在弧菌显色平板上菌落颜色存在明显差异, 可以在选择性分离培养阶段将其区分开。

2.2 分纯培养结果

如图 2C 所示, 菌株 sznj2009 在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板为圆形、湿润、乳白色菌落。如图 2D 所示, 创伤弧菌标准菌株 ATCC27562 在 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板为圆形、湿润、乳白色菌落。由此可知, 菌株 sznj2009 与创伤弧菌标准菌株在 CC 和 mCPC 平板上菌落颜色、形态无明显差异, 难以区分。

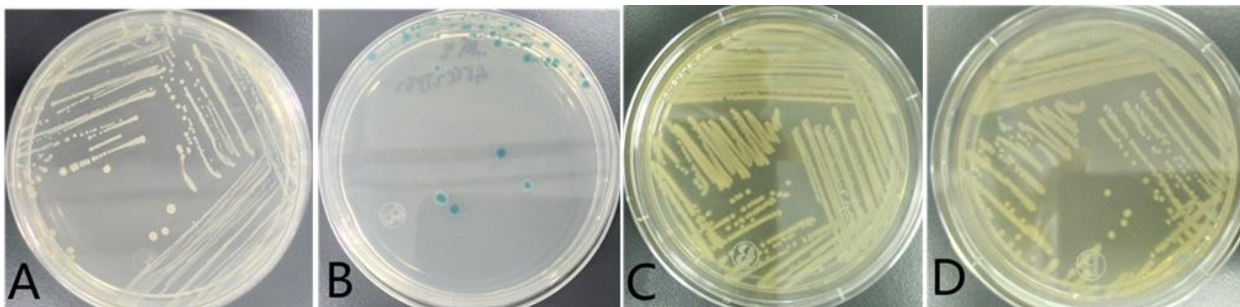


图 2 菌株 sznj2009 和创伤弧菌的菌落形态特征

Fig. 2 Colonial morphology of the bacterium sznj2009 and *Vibrio vulnificus*

综合上述结果可以看出, 在创伤弧菌传统的生化鉴定检测工作中, 在前期分离培养和分纯培养阶段, 菌株 sznj2009 与创伤弧菌标准菌株在 CC、mCPC 和 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板上菌落颜色、形态无明显差异, 难以区分。

但在弧菌显色平板上两种菌株的菌落颜色有所差异, 可以区分开来。在创伤弧菌的日常检测中, 应以 CC 和 mCPC 平板分离培养为主, 同时结合弧菌显色平板菌落形态颜色以快速排除非目标菌。

2.3 初步鉴定结果

菌株 sznj2009 与创伤弧菌标准菌株经氧化酶试验、涂片镜检、3%氯化钠三糖铁 (Triple Sugar Iron, TSI) 试验、

嗜盐性试验, 结果如表 1 所示。两种菌株生化结果基本相同, 通过初步鉴定无法将其区分。

表 1 初步生化鉴定结果

Table 1 Results of preliminary biochemical identification

实验项目	结果	
	ATCC27562	sznj2009
氧化酶试验	+	+
涂片镜检	G-	G-
三糖铁试验	斜面 红色 底层 变黄	变黄 变黄
嗜盐性试验	0% -	-
	3% +	+

6%	+	+
8%	-	-
10%	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性; G⁻: 革兰氏阴性菌。

2.4 创伤弧菌干制生化试剂盒鉴定结果

将菌株 sznj2009、创伤弧菌标准菌株 ATCC27562 分别接种创伤弧菌干制生化试剂盒, 培养 24 h 后, 三糖铁试验与嗜盐性试验结果同表 1, 其它生化结果如表 2 所示。从表 2 可以看出, 两种菌株在创伤弧菌干制生化试剂盒上的生化反应孔结果基本相同, 但蔗糖、ONPG 2 个生化反应孔结果不一致, 创伤弧菌在蔗糖反应上呈阴性, 而菌株 sznj2009 在蔗糖反应上呈阳性; 创伤弧菌在 ONPG 反应上呈阳性, 而菌株 sznj2009 在 ONPG 反应上呈阴性。从表 2 可以看出, 在前期分离培养和分纯培养阶段, 虽然菌株 sznj2009 与创伤弧菌标准菌株在平板上菌落颜色、形态无明显差异, 难以区分, 但其生化反应中存在明显可鉴别点, 典型的生化反应可以区别创伤弧菌和非创伤弧菌。

表 2 分离菌株 sznj2009 和标准菌株 ATCC27562 生化结果
Table 2 Biochemical characteristics of sznj2009 and ATCC27562

生化试验	结果	
	ATCC27562	sznj2009

动力	+	+
葡萄糖	+	+
蔗糖	-	+
乳糖	+	+
纤维二糖	+	+
氨基酸对照	+	+
赖氨酸	+	+
VP	-	-
ONPG	+	-

注: +表示阳性; -表示阴性。

2.5 16S rDNA 序列测定结果

登录美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 网站, 经 BLAST 比对分析后, 用 MEGA6 软件进行生物学分析, 将测序得到的菌株 sznj2009 的 16S rDNA 序列与其他典型菌株进行遗传信息学分析, 通过邻位相连法(neighbor-joining)构建系统发育树(图 3), 结果表明菌株 sznj2009 的 16S rDNA 序列与哈氏弧菌(ATCC33843)的进化距离近、同源性高, 相似度为 100%。测序结果在 GENBANK 数据库中比对分析, 相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌^[8-9], 所以可确定该菌株为哈氏弧菌。

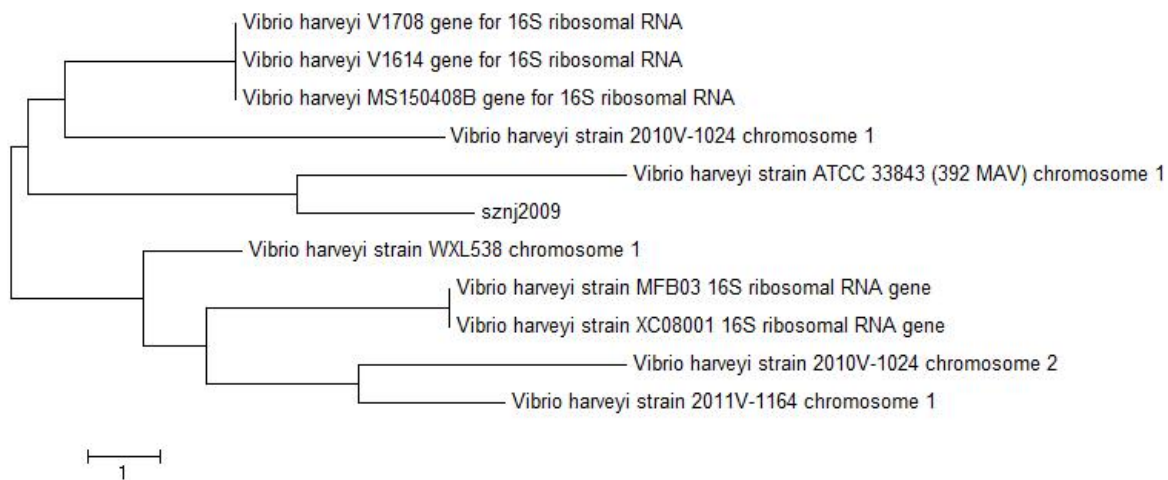


图 3 菌株 sznj2009 的 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the bacterium sznj2009 based on 16S rDNA sequence

3 讨论与结论

2020 年, 国家首次制订创伤弧菌的国家新标准《食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验》(GB 4789.44—2020), 该标准结合传统的生化鉴定和聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 检测对水产品中

的创伤弧菌进行检测, 规定了对水产品中创伤弧菌的检验方法, 适用于鱼、虾、蟹、贝类等水产品中创伤弧菌的检验。创伤弧菌传统的生化鉴定需要 3~7 天完成, 耗时较长。在前期分离培养和初步鉴定过程中哈氏弧菌与创伤弧菌的菌落特征和生化特性相似, 无法区分, 易被混淆带入后期检测阶段, 进而造成检测工作周期的延长。但哈氏弧菌在

弧菌显色平板上为圆形的乳白色菌落, 创伤弧菌在弧菌显色平板上为圆形的蓝绿色菌落。由此可见, 在创伤弧菌前期检测阶段加入弧菌显色平板进行分离鉴定, 可将哈氏弧菌和创伤弧菌区分开来, 进而缩短检测周期, 提高创伤弧菌的鉴定准确度。如果检测人员在传统方法的检测中, 能够掌握足够经验和信息, 可以在选择性平板上做到直接判断, 再结合全自动微生物生化鉴定系统或者 PCR 进行确证, 可以将检测时限缩短, 对日常检测工作意义重大。

哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 属于弧菌科(Vibrionaceae), 弧菌属(Vibrio), 是一种氯化钠依赖型, 弯杆状, 革兰氏阴性, 发光的海洋细菌^[10]。哈氏弧菌是重要的人畜共患病病原体^[11], 作为感染水产品的常见致病菌^[12-14], 其所引起的暴发性弧菌病是危害水产养殖动物最严重的疾病之一^[15], 可感染多种野生及养殖海洋动物^[16], 包括鱼类和甲壳类^[17]等, 对全世界水产养殖业造成了重大的经济损失^[18]。此外, 哈氏弧菌还可作为机会病原体感染人类, 导致腹泻、败血症、中耳炎等^[19]。目前对哈氏弧菌的治疗尚无有效手段, 主要依赖于抗生素, 因此病原体的早期检测对于预防和控制显得尤为重要^[20]。目前, 哈氏弧菌应用较多且较灵敏的有免疫学方法和分子生物学方法^[21], 还未有其标准检测方法, 本研究在创伤弧菌传统的生化鉴定检测工作中发现哈氏弧菌在菌落特征和生化特性与创伤弧菌相似, 为哈氏弧菌传统分离鉴定检测工作提供了参考和借鉴。

本研究还存在不足之处, 对哈氏弧菌和创伤弧菌的比对还只是停留在常规的生化反应阶段, 还可以通过血清学鉴定、PCR 反应、基因测序等方法深入研究两种菌株之间的不同, 进一步对两种菌株在检测工作中易混淆的原因进行分析。

参考文献

- [1] 张保强, 董力群, 王逊, 等. 致病性弧菌的研究概况[J]. 职业与健康, 2006, (24): 2170-2172.
- [2] Bergey D H, Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- [3] 曹琥靓, 蒋曙光. 水产品中创伤弧菌的检测[J]. 食品工业, 2017, 38(07): 282-285.
- [4] Chung P H, Chuang S K, Tsang T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(8): 1302.
- [5] 姜红. 原发性创伤弧菌败血症一例[J]. 中华内科杂志, 1991 (30): 645-646, 127.
- [6] 刘红宏. 实验室间比对样品中乳糖阴性创伤弧菌的检测[J]. 中国农村卫生, 2017, (08): 56-60.
- [7] GB 4789.44-2020 食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验[S]
- [8] 沈亚娟, 夏云. 16S rRNA 基因序列分析鉴定非典型细菌的实验研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(01): 46-48.
- [9] Bosshard P P, Zbinden R, Abels S, et al. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. [J]. Journal of clinical microbiology, 2006, 44(4): 1359-1366.
- [10] Farmer III J J, Janda J M, Brenner F W, et al. Bergey's

Manual of Systematic Bacteriology. [M]. New York: Springer, 2005, 494-546.

- [11] Deng Y, Xu L, Chen H, et al. Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China. [J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 14329-14329.
- [12] Xiao-Hua Z, Xinxin H, Brian A. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. [J]. Marine life science technology, 2020, 2(3): 1-15.
- [13] Montánchez I, Kaberdin R V. *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change [J]. Marine Environmental Research, 2020, 154104850.
- [14] Amin Y, Weiye L, Zhen T, et al. *Vibrio harveyi* isolated from marine aquaculture species in eastern China and virulence to the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). [J]. Journal of applied microbiology, 2021, 131(4): 1710-1721.
- [15] 郭斯崖, 郑慧芳, 张淼, 等. 苦参抗水产病原哈氏弧菌活性物质的提取、鉴定及作用机制[J]. 水产学杂志, 2023, 36(04): 29-37.
- [16] Xiao-Hua Z, Xinxin H, Brian A. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. [J]. Marine life science technology, 2020, 2(3): 1-15.
- [17] Chen T, Wong N, Jiang X, et al. Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2015, 42(1): 114-120.
- [18] 徐赫. 基于比较基因组学的哈维氏弧菌毒力(相关)基因鉴定及其对带菌石斑鱼的致病性研究[D]. 海南大学, 2021. DOI: 10.27073/d.cnki.ghadu.2021.000990
- [19] 张宏伟, 付建荣, 苏东, 等. 弧菌科细菌致急性腹泻的流行病学调查[J]. 中华医学检验杂志, 1996, (01): 45.
- [20] 仲瑶, 贾惠齐, 苏鹏, 等. 水产品中哈维氏弧菌等温快速检测方法优化及比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 143-151.
- [21] 李洋, 李强, 张显显. 哈维氏弧菌及其主要致病因子的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(04): 159-166.

(责任编辑: 吴华)

作者简介



郑东文, 本科, 助理兽医师, 主要研究方向为食源性致病菌及寄生虫的检验。

E-mail: dogzdddw@163.com



王桂兰, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食源性致病菌及寄生虫的检验。

E-mail: 332392778@qq.com