

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0059-04

南海珠江口区域水生病原弧菌 的分离鉴定及血清学分析*

孟繁梅, 朱义福, 艾云灿
(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 从南海珠江口之深圳、珠海海域和广州城区等五个不同区域的 9 个水样中, 利用弧菌属选择性培养基 TCBS 获得 9 类特征菌落表型的分离株。选取高频率出现的 4 类典型菌落的代表菌株 (G, Y1, Y2, T) 鉴定, 革兰氏染色为 G^- , 磷钨酸负染色透射电镜观察菌体细胞成短棒状或弯曲弧状, 可见单极生鞭毛。综合特征生化鉴定结果确定橙黄色菌株 Y2 为霍乱弧菌, 绿色菌株 G 为嗜盐性副溶血弧菌。血清学类群分布研究结果表明来自于不同水域样本的菌株之间存在特征血清型的显著关联性。

关键词: 水生病原弧菌; 霍乱弧菌; 嗜盐性副溶血弧菌; 流行病学

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A

弧菌是淡水和海洋中数量最多的细菌之一, 是近岸海水养殖区域水陆两栖人畜共患的主要病原菌, 还是爆发海产品食物中毒的主要致病菌^[1,2]。中心城市海鲜类贮存和消费行为, 可决定来自不同海域的不同病原菌的富集和横向传播, 关系到城市人群公共防疫安全。“海洋——陆地——城市”传播链上的特定水生环境中烈性病原弧菌的富集与传播, 构成影响监控爆发流行性疫情的不可缺少的重要环节。因此, 检测和监控典型病原菌, 对加强流行病学和防疫医学研究有意义。我们选择南海珠江口区域深圳和珠海典型海域及广州城区有代表性的海鲜馆贮养池海水和其他淡水水体样本, 考察典型水生病原弧菌的种群分布及初步流行病学分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

水样采自中山大学校园东湖湖面 (编号 1~3 号, 当时气温 10~22℃)、广州市某海鲜城贮水池海水样 (编号 4~5 号, 当时气温 19~20℃)、中山大学校园淡水养殖鱼池水样 (编号 6 号, 当时气温 19℃)、珠海市区海滩海水样 (编号 7 号, 当时气温 20℃)、深圳市大亚湾网箱养殖区海水样 (编号 8~9 号, 当时气温 20~22℃)。LB 培养基和 TCBS

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目; 教育部出国留学人员科研启动基金资助项目; 高等学校骨干教师资助计划资助项目; 广东省自然科学基金资助项目

收稿日期: 2000-09-13; 作者简介: 孟繁梅 (1965~), 女, 讲师; 通讯联系人: 艾云灿。

培养基配方同文献^[1]。以海水替代蒸馏水配制,用于分离培养海洋细菌。

1.2 方法

将新采来的水样静置2 h以上,取0.2 mL涂TCBS平板,30℃恒温培养24 h以上。根据菌落表型不同,挑取单菌落,然后在TCBS平板上划线分离单菌落,重复3次,直到获得菌落表型均匀一致的单菌落。挑取单菌落接种LB斜面,30℃恒温培养12 h以上至有菌苔生长后,放置4℃保藏。菌株经适宜培养后,革兰氏染色显微镜镜检和磷钨酸负染色TEM电镜观察按常规操作。经典生化鉴定和血清学分析参见《伯杰氏细菌分类学手册》^[3]。主要试剂购自国内各供应商。

2 结果与分析

2.1 弧菌筛选平板预选试验

比较LB与TCBS培养基平板的筛选分离效果,可以看出LB平板反映细菌总数,布满菌落,颜色多而杂且大,菌落表面光滑,还有霉菌。TCBS平板则反映弧菌属的选择性分离,每平皿上有4~5个绿色菌落,有2~3个黄色菌落,菌落小,边沿参差不齐。说明TCBS培养基对弧菌属的细菌生长有着较好选择性,能抑制大肠杆菌、霉菌等常见菌的生长。结果与文献结论一致^[1]。

2.2 TCBS选择性分离获得弧菌属菌株及其菌落特征

表1 典型弧菌属菌落在不同水样中分布¹⁾

菌落类别	中山大学东湖			广州某海鲜馆贮池		中山大学鱼池	珠海海水	深圳大亚湾海水	
	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号
G类	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K类				+	+		+		
R1类			+	+	+				
R2类			+						
Y1类		+	+	+	+	+	+	+	+
Y2类		+	+	+	+	+	+	+	+
Be类				+	+				
B类				+	+				
T类			+	+			+	+	+

1) +表示可以分离到特征菌落

采用弧菌属专用选择性培养基TCBS,从9个不同水样中,共获得200余株分离物,依其菌落特征可划分为9大类:G(绿色菌落)、K(有荚膜菌落)、R1(扩散型菌落,内外两圈分布)、R2(绿色扩散型菌落)、Y1(淡黄色菌落)、Y2(橙黄色菌落)、Be(蓝色菌落)、B(产黑色素菌落)、T(半透明)等类,它们随水样分布情况见表1。可见Y1类、Y2类、G类和T类等特征菌落出现频率高。当采样气温为10℃(水体温度更低)时,只能检测到G类菌落;当采样气温为19~22℃时,容易检测到多种菌落。从海鲜贮池海水样本中分离的菌落类型较多,且与其他水样的菌落类型都有关联。

2.3 弧菌属典型分离株的鉴定

从高频率出现的四类典型菌落中分别选取G、Y1、Y2、T四个代表菌株进行种的鉴定。结果表明均为革兰氏阴性细菌,电镜观察为短棒状或弯曲弧状,可见单极生鞭毛(图

未显示)。依据文献标准^[3,4]对 Y2 和 G 菌株进行典型生化鉴定(表 2), 综合确定橙黄色菌株 Y2 为霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*), 绿色菌株 G 为嗜盐性副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)。淡黄色 Y1、透明状 T 两菌株为弧菌属, 种名暂未确定。

表 2 Y2 和 G 菌株主要生化鉴定反应

	氧化酶 阳性	硝酸盐 还原	VP	葡萄糖 产气	葡萄糖 发酵	精氨酸 二氢酶	赖氨酸 二氢酶	鸟氨酸 脱羧酶	蔗糖 分解	NaCl 生长试验			溶血 试验	霍乱红 反应
										1%	6%	10%		
Y2	+	+	-/+	-	+	-	+	+	+	+	-/+	-	-/+	+
G	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-

2.4 来自不同水域样本的弧菌分离株的血清学分析

表 3 来自于不同水域样本的弧菌分离株的血清学类群分布

水样编号	<i>V. cholerae</i>						<i>V. parahaemolyticus</i>	
	O1-Group	Non-O1 Group	CTXA	CTXB	Classic Biotype	El-Tor Type	K-antigen Type	O-antigen Type
1	N	N	N	N	N	N	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+

1) + 表示存在特征血清型的分离株; N: 未测定血清型

针对 2 种病原弧菌的典型血清学特征进行类群鉴定分析(表 3), 结果显示这些来自于不同水域样本的分离株之间都有显著关联性, 即来自于不同水域样本的分离株群体都存在特征血清型相同的菌株。例如, 与霍乱 O1 群多价血清作凝集反应试验定群, 发现都有 O1 群和非 O1 群菌株; 与霍乱毒素因子 CTXA 和 CTXB 血清凝集试验, 发现均有两类菌株分布; 进一步经过 VP 试验、溶血性试验、多粘菌素抗性试验等生物分型, 发现都有古典生物型和 El-Tor 型菌株, 前者无溶血性而后者为溶血性阳性。以副溶血弧菌 K 多价血清及 O 群血清凝集反应试验, 发现都有 K 抗原型和 O 抗原型菌株。这种分布规律突出了城市水生环境及海鲜消费行为的流行病学意义。

3 讨论

我们发现实验室采用 30 ℃ 比 37 ℃ 更有利于培养海洋弧菌。文献认为弧菌科有多个属, 大多数属在选择性分离培养时情况差异较大^[1-4]。本研究表明影响弧菌属选择性分离和培养的因素为 TCBS 选择性培养基和较低温度。陆承平等对淡水水生弧菌科分离研究结果认为 TCBS 对弧菌属有专一性选择分离^[1], 我们发现 TCBS 选择性培养基对淡水和海水水样中弧菌属的筛选分离效果都很好, 但 TCBS 上是否生长菌落及数量多少还受采样时水体温度的影响较大。例如, 在初春 2 月气温较低(10 ℃)时采得的水样, 培养 2 周时间以上, 仍未见有菌落生长, 直到 3 周以后才出现菌落, 且菌落变异类型也较少; 而当 3~4 月气温较高(19 ℃)后采得的水样即可分离获得较多弧菌菌株。该现象提示南方初春气

温较低时淡水和海水中都存在非可培养状态的弧菌^[5], 且可能随着气温升高而自然复苏. 霍乱弧菌越冬及流行间歇期的检测问题一直都为防疫医学和流行病学所关注^[5], 本研究结果提示温暖的南方水域及海鲜馆贮水池可能都是重要越冬场所. 血清学类群分布分析表明来自于不同水域样本的分离株之间存在特征血清型的显著关联性, 提示城市水生环境及海鲜消费行为可能构成海洋病原性弧菌的富集和传播链上的重要环节.

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16 (3): 282 ~ 288.
- [2] COWELL R R. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. Intern J System Bacteriol, 1986, 136 (2): 473 ~ 477.
- [3] STALEY J T, BERANT M P, PFENNING N, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1989.
- [4] 宋元是, 何晓青. 弧菌科气单胞菌科和邻单胞菌属分类的进展. 国外医学微生物学分册, 1990, 13: 262 ~ 264.
- [5] 许兵, 徐怀恕, 纪伟尚, 等. 活的非可培养状态霍乱弧菌的复苏. 青岛海洋大学学报, 1994, 24 (2): 187 ~ 194.

Isolation, Identification and Serology of Aquatic Pathogenic *Vibrios* from Zhujiang Entrance Rims of the South China Sea

MENG Fan-mei^{*}, ZHU Yi-fu, AI Yun-can

Abstract: By using selective TCBS plates, nine types of strains of aquatic *Vibrios* were isolated from nine water samples at five different regions around Zhujiang entrance rims of the South China Sea, including Shenzhen and Zhuhai coastal areas and typical aquatic environments in Guangzhou City. Four strains G, Y1, Y2, T with high frequency appeared on TCBS plates were selected out for characterizing with Gram staining and acid negative staining under transmission electronic microscopy showing single end-flagella and bending shape. Combined with classic biochemical tests, yellowish Y2 and greenish G strains were identified as *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. The distribution analysis of serological group of two typical pathogens confirmed further there were significant relationships among these isolates from such different water samples of those different regions. The results suggested that the city's aquatic environments with human behaviors should be epidemiologically concerned as one of the key steps in the chain of preserving, collecting and spreading aquatic pathogenic *Vibrios*.

Keywords: aquatic pathogenic vibrios; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*; epidemiology

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China