

研究报告

青岛市牡蛎养殖场副溶血性弧菌污染水平及时间分布

刘晓琳,王慧,王丽娟,曲剑英,郭凯,于维森

(青岛市疾病预防控制中心 青岛市预防医学研究院,山东 青岛 266033)

摘要:目的 了解青岛市牡蛎养殖场副溶血性弧菌污染水平及在不同的季节随时间和温度变化的趋势,为食品安全风险评估提供参考。方法 在2013年6月—2014年5月采用最大可能实时荧光定量聚合酶链式反应(the most probable number real-time polymerase chain reaction,MPN real-time PCR)方法检测牡蛎养殖场环境及牡蛎中副溶血性弧菌的污染水平,并分析与时间和温度的相关性。结果 牡蛎和海水中不耐热溶血毒素(thermolabile hemolysin, *tlh*)基因MPN最低值出现在1~3月份,6月份之前呈缓慢上升趋势,之后快速上升,至8月份达到最高峰,之后快速下降,1月份降至最低,海水在1~3月份未检出*tlh*基因。海泥中*tlh*基因MPN均值自5~12月份一直维持在高峰水平(18 067.5~24 000.0 MPN/g),1月份下降明显,至3月份降至最低(88.0 MPN/g)。结论 与传统方法比较,MPN real-time PCR法敏感性好,能灵敏地反映副溶血性弧菌随时间温度变化的生长趋势,准确评估牡蛎和环境中的带菌水平,进而发挥预警作用。青岛市牡蛎养殖场海水和牡蛎中副溶血性弧菌的污染水平在6~8月份较高,在加工食用过程中应该注意,避免引起食源性疾病。

关键词:牡蛎养殖场;副溶血性弧菌;最大可能实时荧光定量聚合酶链式反应;时间分布

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)01-0019-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.01.004

**Contamination level and temporal variation of *Vibrio parahaemolyticus*
in oyster farm in Qingdao**

LIU Xiaolin, WANG Hui, WANG Lijuan, QU Jianying, GUO Kai, YU Weisen

(Qingdao Center for Disease Control and Prevention, Qingdao Institute of Preventive
Medicine, Shandong Qingdao 266033, China)

Abstract: Objective To investigate temporal variation in the abundance of total *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish farm in Qingdao. **Methods** The abundance of total *V. parahaemolyticus* in shellfish and farm environment was detected using the most probable number real-time polymerase chain reaction (MPN real-time PCR) method during June 2013 and May 2014, and the correlation between *V. parahaemolyticus* abundance and the season was analyzed. **Results** The lowest level of MPN in shellfish and seawater presented from January to March, increased slowly before June, then rapidly rised up and reached the highest level until August. After that, it deceased rapidly to the lowest level in January. The lowest level of MPN in sediment was in March and the highest level kept from May to December (18 067.5-24 000.0 MPN/g), then dropped rapidly in January, and reached the lowest level in March (88.0 MPN/g). **Conclusion** Compared with the traditional methods, MPN-PCR has better sensitivity in reflecting *V. parahaemolyticus* growing trend with the the season and tempreture change. The level of bactiera abundance in oyster and seawater can be accurately assessed, which might play a role of early warning. The rapid growth time of *V. parahaemolyticus* in seawater and oyster is from June to August, which should be taken notice in the process of handling and eating to avoid foodborn disease.

Key words: Oyster farm; *Vibrio parahaemolyticus*; the most probable number real-time polymerase chain reaction; temporal variation

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种

革兰阴性弧菌,具有嗜盐性,广泛存在于海水、海底沉积物和海产品中,是世界范围内公认的食源性致病菌。贝壳类软体动物,如牡蛎、扇贝等,由于采取滤食方式易造成微生物在体内的蓄积。由于生食贝类或加工不当感染副溶血性弧菌引起肠炎暴发的情况在世界范围内多有报道^[1-5]。副溶血性弧菌

收稿日期:2020-11-23

基金项目:青岛市民生科技计划项目(18-6-1-67-nsh)

作者简介:刘晓琳 女 副主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail:chxlxl@sina.com

通信作者:于维森 男 主任技师 研究方向为卫生检验

E-mail:yuweisen@126.com

的生长与分布主要受温度和盐度影响^[6]。不耐热溶血毒素(thermolabile hemolysin, *tlh*)基因是副溶血性弧菌的种属特异性基因,无致病性,到目前为止,在所有的副溶血性弧菌中均发现该基因(无论临床分离株还是环境分离株),因此 *tlh* 基因可作为鉴定副溶血性弧菌的目标基因^[7-9]。由于基因的检测受生长环境及生长状态的影响较小,即使细菌处于不可培养(viable but non-culturable cell, VNC)的状态下,同样可快速准确对目标菌进行定性或定量检测,因此 *tlh* 基因被广泛应用于对海产品及外环境中副溶血性弧菌污染情况的调查研究^[10-12]。本研究采用最大可能实时荧光定量聚合酶链式反应(the most probable number real-time polymerase chain reaction, MPN real-time PCR)方法对牡蛎养殖场环境及牡蛎中副溶血性弧菌的 *tlh* 基因进行相对定量监测,分析在不同的季节随着温度的改变 *tlh* 基因污染水平的变化趋势。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

自2013年6月—2014年5月跨年隔月采样,共采集7次。每次采集牡蛎15份,采集同一地点表层海水(水平面下0.5 m)4份,海泥4份。同时测量表层水的水温并记录气温。样品采集后放置在采样箱内(温度保持在7~10℃),4 h内送达实验室处理。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃),QuantStudio5 实时定量PCR仪(美国赛默飞)。

3%氯化钠碱性蛋白胨水、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂、弧菌显色试剂均购自青岛海博生物技术有限公司,VITEK 鉴定GN卡(法国生物梅里埃),所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 副溶血性弧菌的MPN计数法培养

参照GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[13],对样品进行MPN法培养,获得样品中副溶血性弧菌的MPN数值。

1.2.2 MPN real-time PCR

选择同批次连续3个浓度的37℃过夜培养的3%氯化钠碱性蛋白胨水增菌液进行核酸提取,每个浓度3管。每管吸取1 mL增菌液,13 000 r/min离心3 min(离心半径13.5 cm),弃上清,沉淀物用

0.85%生理盐水重悬再离心,重复2次,再加200 μL TE缓冲液100℃加热10 min,冷却后13 000 r/min离心10 min(离心半径13.5 cm)取上清作为核酸检测的模板。对 *tlh* 基因进行 real-time PCR 扩增,扩增体系及方法参照文献^[13]进行。引物及探针序列为:F:5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3', R:5'-GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC-3', P:5'-FAM-AAGAACTTCATGTTGATGACACT-BHQ1-3'。反应条件为:95℃预变性2 min;95℃变性20 s,56℃退火20 s,72℃延伸30 s,40个循环。

1.3 统计学分析

当MPN值<3.0或30 MPN/g,分别估算为1.5或15 MPN/g;当MPN值>1 100或11 000 MPN/g,分别估算为2 400或24 000 MPN/g^[14]。采用Spearman相关性分析对不同介质中 *tlh* 基因MPN均值之间的相关性,以及与海水温度及气温的相关性进行统计学分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海水、海泥及牡蛎中 *tlh* 基因MPN均值的时间分布

牡蛎中 *tlh* 基因MPN均值最高值出现在8月份(24 000.0 MPN/g),最低值出现在1月份(18.8 MPN/g)。1~3月 *tlh* 基因MPN均值呈缓慢上升趋势,5月后快速上升,至8月份达到最高峰,之后快速下降,至1月份降至最低。5~10月,牡蛎中 *tlh* 基因的检出率均为100%,1月份检出率降至20%(3/15)。海水中 *tlh* 基因MPN均值时间分布趋势与牡蛎相似,高峰也出现在8月份(20 750.0 MPN/mL),之后随着气温下降菌量快速下降,至12月份MPN均值仅为18.8 MPN/mL,检出率为25%(1/4),1~3月未检出,5~6月MPN均值缓慢增长。海泥中 *tlh* 基因MPN均值在5~12月一直维持在高峰水平(18 067.5~24 000.0 MPN/g),1月份下降明显,至3月份降至最低(88.0 MPN/g)。海泥中 *tlh* 基因在全年12个月的检出率均为100%。同时期海泥中 *tlh* 基因的检出率及MPN值均高于海水(见表1)。

2.2 海水、海泥及牡蛎中传统方法MPN均值的时间分布

海水、海泥及牡蛎中所分离副溶血性弧菌的MPN均值高峰同样出现在8月份,但低于 *tlh* 基因MPN均值。8月份之后MPN均值大幅下降,维持在较低水平(<50.0 MPN/g),12月份至次年5~6月份牡蛎和海水中含量较低(见表1)。

2.3 相关性分析

Spearman相关性分析显示,海泥和海水中 *tlh*

表 1 海水、海泥及牡蛎中 *tlh* 基因 MPN 均值及传统菌量 MPN 均值

Table 1 MPN mean densities of *tlh* gene and traditional bacteria population in seawater, sediments and oysters

时间	海水温度/℃	气温均值/℃		MPN real-time PCR 法			传统方法		
		高温	低温	牡蛎 /(MPN/g)	海泥 /(MPN/g)	海水 /(MPN/mL)	牡蛎 /(MPN/g)	海泥 /(MPN/g)	海水 /(MPN/mL)
		2013年6月	21	28.2	18.8	14 920.0±10 073.2	18 375.0±11 250.0	715.0±567.1	8.4±14.5
2013年8月	22	29.7	22.0	24 000.0±0.0	24 000.0±0.0	20 750.0±6 500.0	749.0±387.9	1 320.0±726.8	995.0±512.3
2013年10月	14	21.7	11.1	1 236.7±1 263.8	24 000.0±0.0	6 700.0±11 562.8	11.8±15.2	42.9±46.7	35.4±29.8
2013年12月	5	4.7	-3.7	110.3±135.7	11 567.5±9 709.9	18.8±7.5	3.8±8.9	59.3±36.4	1.5±0.0
2014年1月	4	5.6	-3.5	18.8±8.0	619.5±993.0	15.0±0.0	1.5±0.0	23.5±28.4	1.5±0.0
2014年3月	9	13.9	2.3	33.7±25.7	88.0±47.6	15.0±0.0	1.5±0.0	15.8±16.5	1.5±0.0
2014年5月	17	23.5	14.3	5 447.6±9 640.7	18 067.5±11 865.0	215.0±99.5	7.2±11.8	16.4±29.8	1.5±0.0

基因 MPN 均值均与牡蛎中 *tlh* 基因 MPN 均值呈正相关 ($r = 0.87, P < 0.05; r = 0.96, P < 0.01$)；海泥与海水中 *tlh* 基因 MPN 均值同样呈正相关 ($r = 0.80, P < 0.05$)。而传统方法的 MPN 均值只在海水与牡蛎中呈正相关 ($r = 0.92, P < 0.01$)。海水中 *tlh* 基因 MPN 均值与海水温度及气温的变化呈正相关 ($r = 0.78 \sim 0.83, P < 0.05$)。

3 讨论

MPN real-time PCR 方法是在 MPN 计数检测方法的基础上,对过夜培养的增菌液进行目标基因的 MPN 计数。研究^[14]表明采用 MPN 结合 real-time PCR 方法检测牡蛎中的副溶血性弧菌灵敏度可达 1 CFU/g。MPN real-time PCR 的灵敏度超出传统 MPN 法和直接 PCR 法(增菌液未经过夜培养) 100 倍以上^[12,15-18]。虽然 PCR 方法对于细菌核酸的扩增不能分辨出是否为活菌,但本研究认为调查副溶血性弧菌的污染情况,无论是否为活菌,只要有核酸存在,就代表样品被该菌污染过。目前国内对副溶血性弧菌的污染监测多集中在水产品^[19-21],而对生长环境的调查报道较有限^[22],且多是采用传统的分离培养方法。本研究结果显示牡蛎与海水中的副溶血性弧菌有着相似的时间变化趋势,而且两者变化与温度变化曲线高度吻合。高峰均出现在 8 月份,此时气温最高(月平均气温 22.0~29.7℃,海水温度 22℃);12 月份至次年 3 月份是全年气温的最低点(气温 -3.7~13.9℃,海水温度 4~9℃),这期间副溶血性弧菌含量较低(有时未检出)。8 月份之后随着气温下降,副溶血性弧菌含量明显下降,12 月至次年 3 月一直维持在较低水平,5 月份气温开始回升,含量缓慢升高,至 6 月份海水温度达到 20℃左右,此时含量明显增加,至 8 月快速上升达到高峰。6~8 月是副溶血性弧菌快速增殖的时间,通过实时监测海水中副溶血性弧菌的含量,可以评估牡蛎的带菌水平和风险水平,进而发挥预警作用。

本研究显示,与海水比较,海泥带菌高峰持续时间长(6~12月),菌量的下降较气温下降滞后,但随着温度的上升,菌量增长较迅速。这可能与海泥的保温和富营养等因素有关。本研究中的牡蛎养殖场采用浅滩浮筏方式进行养殖,这种养殖方式是将牡蛎放在悬浮(浸于浅表海水)的筏笼中生长,牡蛎通过滤食海水中的有机物进行生长,因此受海水的影响可能较大,牡蛎与海水中副溶血性弧菌生长曲线也更为相似。海泥中副溶血性弧菌的生长特点提示,滩涂养殖方式(牡蛎在海泥中生长)的牡蛎受副溶血性弧菌污染的程度可能性更大,有待于进一步研究。

本研究显示,MPN real-time PCR 法较传统 MPN 法有更高的灵敏度和检出率。前者能更灵敏地捕获到副溶血性弧菌随时间和温度的生长变化趋势,反映出其在牡蛎、海水和海泥之间的相关性,以及与温度间的相关性。因此可以考虑在水产养殖监测中多采用 MPN real-time PCR 法,以更好地了解副溶血性弧菌及其他微生物在水产品及外环境中的生长规律,为水产养殖和水产品的安全食用提供更科学的依据。

参考文献

[1] DEPAOLA A, KAYSNER C A, BOWERS J, et al. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (11): 4649-4654.

[2] LOZANO-LEÓN A, TORRES J, OSORIO C R, et al. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 226 (2): 281-284.

[3] SMOLIKOVA L M, LOMOV I M, KHOMENKO T V, et al. Studies on halophilic vibrios causing a food poisoning outbreak in the city of Vladivostok [J]. Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii, 1900, 6 (6): 3-7.

[4] OKUDA J, ISHIBASHI M, HAYAKAWA E, et al. Emergence of a

- unique O3 : K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(12): 3150-3155.
- [5] CHIOU C S, HSU S Y, CHIU S I, et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3 : K6 as cause of unusually high incidence of foodborne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999 [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(12): 4621-4625.
- [6] DEPAOLA A, NORDSTROM J L, BOWERS J C, et al. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1521-1526.
- [7] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh, and trh [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 215-225.
- [8] TANIGUCHI H, HIRANO H, KUBOMURA S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 1986, 1 (5): 425-432.
- [9] TANIGUCHI H, OHTA H, OGAWA M, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes [J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162(2): 510-515.
- [10] MUHAMMAD J A, KEN-ICHI T, SHIN-ICHI M, et al. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2002, 208(1): 83-87.
- [11] MIWA N, KASHIWAGI M, KAWAMORI F, et al. Levels of *Vibrio parahaemolyticus* and thermostable direct hemolysin gene-positive organisms in retail seafood determined by the most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) method [J]. *Shokuhinshgaku Zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2006, 47(2): 41-45.
- [12] LUAN X Y, CHEN J X, LIU Y, et al. Rapid quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by MPN-PCR [J]. *Current Microbiology*, 2008, 57: 218-221.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验: GB 4789. 7—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [14] WARD L N, BEJ A K. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with *TaqMan* fluorescent probes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2031-2042.
- [15] HAN H H, LI F Q, YAN W X, et al. Temporal and spatial variation in the abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish in China [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (6): 1-13.
- [16] CAI T X, JIANG L Y, YANG C B, et al. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China [J]. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, 2006, 46(2): 180-186.
- [17] RANDA M A, POLZ M F, LIM E. Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5469-5476.
- [18] MIWA N, KASHIWAGI M, KAWAMORI F, et al. Levels of *Vibrio parahaemolyticus* and thermostable direct hemolysin gene-positive organisms in retail seafood determined by the most probable number-polymerase chain reaction (MPN-PCR) method [J]. *Shokuhinshgaku Zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2006, 47(2): 41-45.
- [19] 海英, 任强, 高常, 等. 2012—2015年重庆市渝北区水产品中副溶血性弧菌监测分析 [J]. *实用预防医学*, 2016, 23(11): 1378-1380.
- [20] 李海麟, 何洁仪, 梁伯衡, 等. 广州市2009年—2014年生食水产品副溶血性弧菌监测结果分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(19): 2830-2833.
- [21] 邵祥龙, 何洁仪, 梁伯衡, 等. 2015年上海浦东新区市售水产品中食源性致病菌污染情况 [J]. *卫生研究*, 2017, 46(1): 162-164.
- [22] 赖晓华, 肖新才, 刘文祥, 等. 广州珠江河口地区水体中副溶血弧菌定量研究 [J]. *华南预防医学*, 2010, 36(3): 5-8.