

研究简报

鱼类细菌群落中的致病嗜水气单胞菌

PATHOGENIC *AEROMONAS HYDROPHILA* IN FISH BACTERIAL FLORA

汤伏生 曾 勇 张兴忠

(中国水产科学院长江水产研究所, 沙市 434000)

Tang Fusheng, Zeng Yong and Zhang Xingzhong

(Changjiang Fisheries Research Institute, CAFS, Shashi 434000)

朱晓燕

(湖北农学院水产系, 荆州 434103)

Zhu Xiaoyan

(Department of Aquaculture, Hubei Agricultural College, Jingzhou 434103)

关键词 鱼类, 细菌群落, 嗜水气单胞菌, 致病性

KEYWORDS fish, bacterial flora, *Aeromonas hydrophila*, pathogenicity

气单胞菌 (*Aeromonas*) 广泛分布于水环境, 是重要的条件致病菌。该属的嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 近年来引起我国养殖鱼类细菌性败血症流行。但气单胞菌在鱼类细菌群落中的地位如何, 有无简便的方法鉴定某一嗜水气单胞菌菌株是否致病, 致病嗜水气单胞菌在什么条件下才导致鱼体得病。这些问题目前尚无定论。鉴于此, 本文首先对家养鲤肠道细菌群落中的气单胞菌分布作了调查, 随后对不同鱼体来源的气单胞菌进行了鉴定, 探讨了致病相关因子与致病嗜水气单胞菌致病的关系, 最后对产毒条件进行了分析。

1 材料和方法

1.1 培养基、菌种分离、致病实验和菌种鉴定

RS 培养基按 Farmer 等[1992], 肠道细菌分离和致病实验按汤伏生等[1994], 糊精—品红培养基及菌种鉴定等均同朱晓燕和汤伏生[1994]。LB—C 培养基: 将考马斯亮蓝 R—250 加入 LB 固体培养基使浓度达 0.1%。

1.2 致病相关因子检测

刚果红吸收参考 Statner 和 George 的[1987]的方法, 用 LB 培养基代替 TSA 培养基。铁载体产生参考

Schwyn 和 Neilands[1987]的方法,用 M70 培养基[Popoff 和 Lallier, 1984] 减去硫酸亚铁代替 M9 培养基,用 HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)代替 PIPES[哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)],调节 pH6.8,用 0.5%葡萄糖作碳源。自凝集反应参考 Bernoth[1990]的方法:滴 50 μ l 无菌水于载玻片上,将幼龄菌苔涂于无菌水中,转动玻片,2 分钟内观察凝集结果。菌落考马斯亮蓝染色:将菌种划线于 LB-C 培养基上,培养 3 天后观察,菌苔被染成蓝色者为阳性。

1.3 溶血毒素活力测定

将细菌培养过夜,离心取上清液作为毒素样品。将鲫血细胞按 3%的比例悬浮于生理盐水,每 ml 血样加毒素样品 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。离心后取上清液用 DU-7 分光光度计测定 O.D.₅₇₅。

2 结果

2.1 鱼类细菌群落中的气单胞菌分布

在 1992 年 4 月至 1994 年 8 月间,对鲤肠道细菌群落中的分布进行了调查。肠道食物和肠壁样品如汤伏生等[1994]所述,以尿殖孔附近的肠内容物作为粪便样品,将样品涂布于 LB 固体培养基上培养,统计细菌总数;同时将细菌样品涂布于糊精一品红培养基,气单胞菌菌株发酵糊精,因而菌落为红色,将糊精一品红培养基上的红色湿润菌落挑出,测定氧化酶,剔除发酵糊精的肠杆菌。再将氧化酶阳性菌落点种于 RS 琼脂,在 RS 琼脂上,气单胞菌菌株发酵麦芽糖,菌落中心为黄色,将黄色菌落挑出即为气单胞菌属菌株。

按此法前后共分析 15 条鲤,结果如下:鲤肠道食物样品的细菌总数为 $(3.2 \pm 0.6) \times 10^6$ 菌落形成单位(cfu)/g 食物,其中含 6.03%气单胞菌;肠壁样品的细菌总数为 $(4.0 \pm 0.4) \times 10^3$ cfu/mm² 肠壁,其中含 3.2%气单胞菌;粪便样品的细菌总数为 $(6.5 \pm 0.7) \times 10^5$ cfu/g 粪便,其中 2.5%为气单胞菌。食物样品中的细菌总量及气单胞菌的百分比均比粪便样品高。

2.2 致病气单胞菌菌株分离与鉴定

为更全面地了解鱼类细菌群落中气单胞菌的作用,除前述从鲤肠道得到的一批气单胞菌菌株外,作者从健康和患败血症白鲢及患病鲫的体表、肝胰脏、腹水和鳃等部位又分离出一批气单胞菌菌株。将其中产溶血毒素的菌株挑出进行致病实验,有一部分菌株对测试鲫有致死作用,其来源和致死时间见表 1。死亡鱼的尿殖孔红肿,头部及鳍基部充血,解剖显示肠粘膜糜烂,腹水严重。将 CCF3 按半致死剂量注射鲫,水族箱养 2 天后取血,用同济医科大学(武汉)研制的 pH-LS-1 型酸度计测量,血液 pH 为 7.21 ± 0.03 ,而对照鱼的血液 pH 为 7.43 ± 0.06 。对受试鱼血液进行分析,还发现感染 CCF3 的鱼血液中组织胺含量比对照高(结果另文报道)。

表 1 致病气单胞菌菌株分离

Table 1 Isolation of pathogenic *Aeromonas* strains

菌株	鱼体	分离部位	致死鲫*	急性致死时间
IL 5	垂死鲫	腹水	4/4	10-12 小时
IL 6	垂死鲫	腹水	4/4	10-12 小时
CRI 14	垂死鲫	肠壁	4/4	10-12 小时
GIL 16	垂死鲫	鳃	4/4	30-36 小时
CCF 3	鲤	肠道食物	4/4	20-24 小时
CCF 4	鲤	肠道食物	1/3	62-72 小时
CCI 42	鲤	肠壁	4/4	24-48 小时
CCI 50	鲤	肠壁	4/4	48-72 小时
BL 3	白鲢	体表	6/6	20-24 小时
H20	垂死白鲢	肝胰脏	6/6	20-24 小时

注: * 分号左边的数值表示死亡的鱼数,分号右边的数值表示受试鱼总数。

上述菌株均为革兰氏阴性菌,极生单鞭毛。进行氧化酶、尿酶、氨基酸脱羧酶、胞外酶产生、糖发酵、唯一碳源利用和耐盐性试验等 38 项生理指标鉴定,表明其中 IL5, IL6, CRI14, GIL16, CCF3 和 H20 均为嗜水气单胞菌。

2.3 致病相关因子

虽然致病嗜水气单胞菌均产溶血毒素,但产毒

素的菌株并不一定致病。为找出致病性与什么生理指标有关,进行了本实验。用含 5% 血细胞的 LB 培养基检测溶血毒素;将菌种接种于刚果红平板,培养 2 天后观察,菌落颜色比周围培养基颜色深,菌落带橙色光泽者为吸收刚果红阳性;用无菌蒸馏水检测自凝集;将菌种接种于 LB-C 培养基,培养 2 天后观察,菌落被染成蓝色者为阳性;因 HEPES 的 pKa 为 7.48,铁载体检测培养基灭菌后变成浅绿色,接种细菌培养过夜后,由于细菌发酵葡萄糖产酸,培养基颜色又变回到蓝色,培养 4 天后即可看到,产铁载体的菌株其菌落周围的培养基无颜色;用牛奶琼脂培养基检测菌株的水解酪蛋白能力;将菌种接种在明胶琼脂平板培养过夜后,用酸性汞显色检测明胶液化能力。检测结果见表 2。

表 2 气单胞菌菌株的致病性相关因子

Table 2 Pathogenicity related factors of *Aeromonas* strains

菌株	产溶血毒素	吸收刚果红	自凝集	LB-C	产生铁载体	水解酪蛋白	液化明胶	致死性
ECF 3	+	+	+	+	+	+	+	+
IL 5	+	+	+	-	+	+	+	+
IL 6	+	+	+	-	+	+	+	+
CRI 14	+	+	+	+	+	+	+	+
GIL 16	+	+	+	-	+	+	+	+
H 20	+	+	+	+	+	-	+	+

注: * 阳性用+表示, 阴性用-表示。

2.4 致病嗜水气单胞菌的产毒条件

将 CCF3 菌种用 LB(pH7.5)培养基活化后,0.5%转接于不同 pH 的 LB 培养基中,振荡培养 12 小时后测定其终点 pH 和 O. D. ₆₀₀,取部分培养液离心,取上清液测定其溶血活性。结果见图 1。除起始 pH 为 5.0 时,CCF3 溶血毒素的产生受抑制外,其它起始 pH 时 CCF3 溶血毒素的产生及生长均无显著差异。CCF3 在所测试的起始 pH 条件下培养 12 小时后,终点 pH 均达 7.9-8.5。

将活化菌种接种于含 0.5% 不同糖的 LB(pH7.5)培养基中,按上面的方法进行实验。除山梨糖为 L-型外,其余糖均为 D-型。结果见图 2。山梨糖和阿拉伯糖与对照的终点 pH 相似,均在 8.2-8.4 之间变化;半乳糖的终点 pH 为 5.8;葡萄糖等其它糖的终点 pH 在 4.4-4.6 之间变化。对照的溶血毒素产量与细菌生长量之比(P/G, O. D. ₅₇₅/O. D. ₆₀₀)约为 0.1,当培养基中含阿拉伯糖或山梨糖时,细菌生长不受影响,但毒素产量却大为降低,这两者的 P/G 值分别为 0.006 和 0.007;当培养基中含半乳糖时,细菌生长旺盛,但毒素产量却与对照相似,其 P/G 值为 0.06;当培养基中含葡萄糖等其它 3 种糖时,细菌生长及毒素产生均受一定抑制,但 P/G 值却与对照相似,分别为葡萄糖 0.12,甘露糖 0.077,果糖 0.086。

3 讨论

3.1 家鱼细菌群落中的气单胞菌分布

我们曾用糊精一品红培养基加氧化酶测试方法,对家鱼肠道细菌中的气单胞菌分布作过初步调查[朱晓燕和汤伏生,1994],气单胞菌占那批样品中细菌总数的 10%。本文在此基础上增加了 RS 琼脂检测,得出肠道食物样品中有 6% 的气单胞菌、肠壁样品中有 3.2%,粪便样品中有 2.5% 气单胞菌的结果。上述结果说明本文采用的糊精一品红培养基、氧化酶和

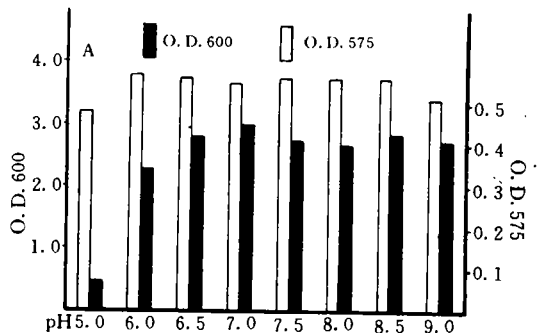


图 1 pH 对 CCF3 生长及毒素产生的影响

Fig. 1 The influences of pH upon the growth and toxin production of CCF3

RS 琼脂三项测试方法,足以对鱼类细菌群落中的气单胞菌分布进行调查。

本文所测试的每份样品中均有气单胞菌。Hajji 等 [1991] 在 1989 年 6—12 月间检查了东京多摩川 13 条鲤的体表和肠道细菌群落,同时也研究了环境(水和沉积物)中的细菌群落。水和沉积物细菌组成相似,弧菌 (*Vibrio*)—气单胞菌占主导地位。这与本文结果一起证明了气单胞菌在鱼类细菌群落中的地位和重要性。

3.2 致病相关因子

嗜水气单胞菌分布如此广泛,对寄主又是一个严重威胁。如何甄别致病嗜水气单胞菌是各实验室及生产单位所关心的问题。本文所分离的致病嗜水气单胞菌的刚果红吸收、自凝集、铁载体产生和明胶液化均为阳性,但同时测试非致病菌株,发现部分菌株也能吸收刚果红和产生铁载体(结果未给出)。此外,IL5、IL6 和 GIL16 的菌落考马斯亮蓝着色为阴性,按 Bernoth [1990] 的推论,这三株菌应为 A—蛋白阴性;H₂O 酪蛋白水解阴性。上述结果与 Statner 和 George [1987] 的结果一致,说明嗜水气单胞菌的致病相关因子比杀鲑气单胞菌复杂。

3.3 致病嗜水气单胞菌的产毒条件

研究其毒素产生条件,对进一步认识该菌和防治由该菌引起的各类鱼病不无帮助。本文结果证明酸性条件对毒素产生有抑制作用。Majeed 和 MacRae [1993] 发现在 5℃ 培养时,起始 pH 为 5.0 和 5.5 时,即使将嗜水气单胞菌 AH29 培养 11 天仍无毒素产生,生长同时也受到抑制。Palumbo [1988] 也发现猪排上的嗜水气单胞菌对 6.0 以下的 pH 敏感。这一结果可用于商品鱼的保存。

D—阿拉伯糖和 L—山梨糖不能被嗜水气单胞菌 CCF3 发酵,但抑制 CCF3 溶血毒素产生,而葡萄糖只是对 CCF3 的生长有部分抑制作用。而 Nomura 和 Saito [1982] 证明培养基中的葡萄糖对杀鲑气单胞菌毒素产生有部分抑制作用。汤伏生等 [1993] 也曾发现葡萄糖能抑制部分菌株的溶血毒素产生。这说明不同菌种和菌株的产毒条件也不相同,这一现象在防治由嗜水气单胞菌引起的各类鱼病时应予以重视。

本文是农业部“八五”生物技术计划项目(85 农 11—02—06)的部分内容。

参 考 文 献

- [1] 朱晓燕、汤伏生, 1994. 健康家鱼肠道细菌中的嗜水气单胞菌及其胞外酶分布. 湖北农学院学报, 14(1): 35—39.
- [2] 汤伏生等, 1993. 几株鱼类肠道细菌溶血毒素的葡萄糖抑制效应. 淡水渔业, 23(6): 4—7.
- [3] ——, 1994. 鲤鱼肠道细菌及其淀粉酶对宿主消化的影响. 水产学报, 18(3): 177—182.
- [4] Bernoth, E. M., 1990. Autoagglutination, growth on tryptone-soy-Commassie-agar, outer membrane protein patterns and virulence of *Aeromonas salmonicida* strains. *J. Fish Dis.*, 13: 145—155.
- [5] Farmer, J. J. et al., 1992. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: *The Prokaryotes* (Ed. by Albert Balows et al.). New York: Springer-Verlag, 3012—3045.
- [6] Hajji, N. et al., 1991. Bacterial flora associated with natural carp of the Tama River (Tokyo, Japan). *Bull. Coll. Agric. Vet. Med. Nihon Univ.*, (48): 38—45.
- [7] Majeed, K. N. and I. C. MacRae, 1993. Effect of pH level on the growth and exotoxin production by *Aeromonas* at refrigeration temperature. *Microbios.*, 73: 281—288.

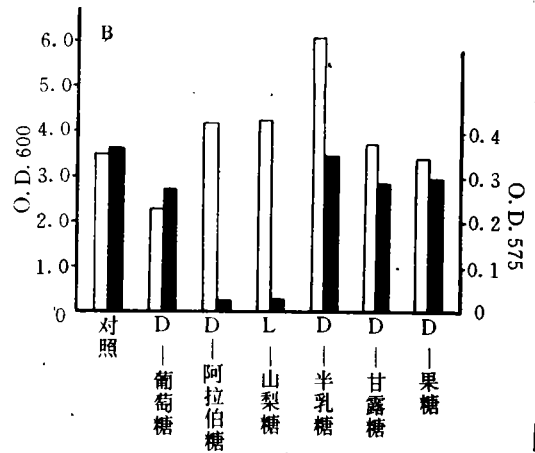


图 2 糖对 CCF3 生长及毒素产生的影响

Fig. 2 The influences of sugar upon the growth and toxin production of CCF3

[8] Nomura, S. and H. Saito, 1982. Production of the extracellular hemolytic toxin by an isolated strain of *Aeromonas salmonicida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48** (11) : 1589-1597.

[9] Palumbo, S. A. 1988. The growth of *Aeromonas hydrophila* K114 in ground pork at 5 C. *Int. J. Food. Microbiol.*, **7** : 41-48.

[10] Popoff, M. and R. Lallier, 1984. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. *Methods in Microbiol.*, **16** : 127-145.

[11] Schwyn, B. and J. B. Neilands, 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*, **160** : 47-56.

[12] Statner, B. and W. L. George, 1987. Congo red uptake by motile *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, **25**(5) : 876-878.

欢迎订阅《水产养殖》

《水产养殖》是中级水产科技刊物,国内外公开发行。内容包括鱼虾贝藻等海淡水水产品 & 名贵水产品、特种水产品的养殖技术、人工繁殖技术、苗种培育技术、病害敌害防治技术等,内容丰富,技术实用。适合于水产科技人员、水产院校师生、水产养殖者、水产生产管理人员阅读和参考。《水产养殖》是水产渔业类的核心期刊、全国优秀期刊,也是江苏省及华东地区的优秀期刊。1996年《水产养殖》将以更丰富的内容为广大读者服务。欢迎新老读者踊跃订阅。

《水产养殖》是双月刊,每期定价 1.80 元,全年 6 期,共 10.80 元,全国各地邮局都可订阅,邮发代号为 28-67。如错过当地邮局订阅时间,也可直接汇款到编辑部订阅。编辑部地址:南京市新模范马路 90 号 电话:(025)3421419 邮政编码:210003。

欢迎订阅《海洋渔业》

《海洋渔业》杂志是中国水产学会的中级科技刊物,由中国水产科学研究院东海水产研究所主办,国内外公开发行,16 开 48 页。1996 年将改为季刊,逢 2、5、8、11 月 25 日出版,定价每期 2.50 元,全年 10.00 元,由《海洋渔业》杂志编辑部自行发行。欢迎广大读者订阅。

《海洋渔业》杂志主要刊登:海洋渔业资源开发与利用、繁殖保护、捕捞技术、鱼虾贝藻类的增殖、海洋环境保护、水产品加工利用、保鲜技术、渔船渔港、渔业机械仪器等各类文章。欢迎广大读者和作者投稿。

《海洋渔业》杂志承接广告业务,收费合理,设计精良,欢迎国内外客户前来洽谈。

《海洋渔业》杂志编辑部地址:上海市军工路 300 号,邮政编码:200090,电话:65434690×28,联系人:赵青。