

健康草鱼肠道气单胞菌季节变化及胞外酶调查

曾 勇^{1,2} 袁明雄¹

(1 华中理工大学生命科学院, 武汉 430074)

(2 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室, 中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘 要 暴发性鱼病流行季节及非发病季节的健康草鱼肠道气单胞菌的分布调查表明, 两季中气单胞菌占总菌数的比例变化不大, 只是冬季前肠道的气单胞菌比例明显增高, 应视为草鱼肠道的正常寄生菌落。部分胞外酶中发现了较多产木聚糖酶的气单胞菌。

关键词 气单胞菌, 草鱼, 肠道, 溶血毒素, 胞外酶

气单胞菌存在于各种水体之中, 各种淡水鱼均可被运动性气单胞菌致病^[1]。另外, 该属菌具有较丰富的胞外酶, 胞外酶对鱼类的消化起到一定的促进作用。目前虾、蟹、鳖等的多种疾病均与该属的嗜水气单胞菌有关, 且其所引起的暴发性鱼病有一定的季节性。因此, 本文研究调查了气单胞菌在健康草鱼肠道内的季节性变化情况, 并检测了一些气单胞菌的胞外酶。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验鱼分2组, 第1组3尾, 取材时间为1996年7月中旬。第2组8尾, 取材时间为1996年11月底, 当时室外水温7℃, 鱼已停食, 取回后清水饲养, 1星期后用于实验。2组均为健康草鱼。

LB固体培养基: pH 7.2, 每升水含酵母膏5 g、蛋白胨10 g、NaCl 10 g、琼脂粉15 g。

糊精—品红培养基: pH 7.5, 每升水含蛋白胨10 g、牛肉膏3 g、NaCl 5 g、糊精15 g、Na₂SO₃ 1.6 g、碱性品红0.25 g、Na₂HPO₄·12H₂O 19.53 g、琼脂13 g。

RS琼脂: pH 7.2, 每升水含L-盐酸赖氨酸5 g、L-盐酸鸟氨酸6.5 g、L-盐酸半胱氨酸0.3 g、

麦芽糖3.5 g、Na₂S₂O₃·5H₂O 10.67 g、溴百里酚蓝0.03 g、柠檬酸铁铵0.8 g、脱氧胆酸钠1.0 g、新生霉素0.005 g、酵母膏3 g、NaCl 5 g、琼脂13.5 g。

MLB、SLB和LBC分别为LB固体培养基加0.3%脱脂奶粉、0.5%可溶性淀粉和0.3%羧甲基纤维素。

滤纸培养基: pH 7.2, 每升水含新华滤纸5 g、NaNO₃ 1 g、Na₂HPO₄·12H₂O 1.57 g、KH₂PO₄ 0.9 g、MgSO₄·7H₂O 1 g、KCl 0.5 g、酵母膏0.5 g、Tryptone 0.5 g、琼脂粉15 g。

木聚糖酶培养基: pH 7.2, 每升水含NaNO₃ 1 g、Na₂HPO₄·12H₂O 1.6 g、KH₂PO₄ 0.9 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、Oat spelt xylan 5 g、polypop-tone 5 g、琼脂粉15 g。

标准碘液: 取15 ml碘原液(碘11 g和KI 22 g溶于500 ml水)加入KI 8 g, 定溶至500 ml, 储存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种分离 在无菌室中将鱼解剖, 分别取肠道前段2 cm²、中段1 cm²、后段1 cm², 无菌水冲洗。在1.5 ml无菌离心管中加入1 ml无菌水, 放入鱼肠, 用力振荡, 涂布LB平板, 34℃培养, 24 h后观察。

1.2.2 菌种鉴定 菌种鉴定按汤伏生等^[2]方法进行。先将菌种点接在糊精—品红培养基上, 气单胞

收稿日期: 1997-12-11

菌属菌株发酵糊精,因而菌落为红色,将该平板上红色湿润菌落点接于RS琼脂上,气单胞菌属菌株由于发酵麦芽糖,菌落中心为黄色,再测定黄色菌落的氧化酶,阳性者即为气单胞菌属菌株。

1.2.3 溶血毒素检测 将气单胞菌菌株点接在LB+5%鲤鱼血的LB血平板上,34℃培养过夜,有溶血圈者产溶血毒素。

1.2.4 胞外酶调查 将鉴定的气单胞菌属菌株点接于MLB固体平皿培养过夜,有透明圈者为蛋白酶阳性。点接于SLB固体平皿培养过夜,用标准碘液显色,有透明圈者为淀粉酶阳性。点接于LBC固体平皿培养过夜,参照F.G.普里斯特方法观察^[3],有透明圈者为CMC酶阳性。点接于滤纸固体平皿培养过夜,有透明圈者为滤纸酶阳性。点接于木聚糖固体平皿培养过夜,按F.G.普里斯特方法观察^[3],有透明圈者为木聚糖酶阳性。

2 结果和讨论

2.1 菌株的分离及鉴定

表1 健康草鱼肠道细菌及气单胞菌分布

Table 1 Distribution of bacteria and *Aeromonas* in healthy Grass carp intestines

样品 sample	第1组 group 1			第2组 group 2		
	前肠壁 front of intestines	中肠壁 middle of intestines	后肠壁 rear of intestines	前肠壁 front of intestines	中肠壁 middle of intestines	后肠壁 rear of intestines
总菌株 bacteria	40	30	152	143	134	104
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	5	1	20	34	9	7
总菌量/(个·cm ⁻²) bacteria in intestines	1.2×10 ²	1.2×10 ⁴	1.3×10 ⁶	1.0×10 ⁴	6.0×10 ³	1.1×10 ⁴

2.2 溶血毒素调查

在进行的所有76株气单胞菌的溶血毒素调查中,都没有发现溶血圈产生,且实验重复2次,结果相同。说明这批菌都是非致病菌。

2.3 胞外酶调查

2.3.1 蛋白酶 本实验以脱脂奶粉为底物进行了蛋白酶筛选,共62株进行实验,12株来自第1组、50株来自第2组,有透明圈的分别为8株、41株,所占比例分别为66.7%和82.0%。研究表明,大部分病原菌都有较强的胞外蛋白酶活性,使得病原菌能吸附在寄主体上并消化纤维蛋白原等物质,从而导致寄主得病^[5]。同时,胞外蛋白酶在嗜水气单胞菌的致病过程中起着重要的作用,它可将毒素原降解

成活性毒素^[6]。而嗜水气单胞菌9120^[7]不能水解酪蛋白,但它的致病力仍然很强。因此,可以认为这批菌中存在较多的潜藏的致病菌或致病菌的帮助者,具体情况有待进一步研究。

本实验共进行了2组11尾健康草鱼的肠道菌分离,结果见表1。可以看出在两季的调查中,气单胞菌占总菌数的比例变化不大,分别为11.7%和13.12%,冬季略有升高,应视为草鱼肠道的正常寄生菌落。但其在肠道内的分布上有一定变化。在进食高峰期,前肠壁和后肠壁的气单胞菌占总菌数的比例基本相等,为12%左右;冬季停食阶段,前肠壁的气单胞菌占总菌数的比例明显增高,为23.77%。同时,进食高峰期的前、中、后肠壁的总菌量依次相差2个数量级,后肠壁的最高,冬季停食期则基本相等。这与我们以前观察的结果基本相符^[4],寄生于前肠壁的细菌主要是靠吸收寄主的营养而生存,草鱼肠道的正常寄生菌气单胞菌属菌在冬季缺少外源营养的情况下大量分布在前肠。

我们在用同样的指标对鲤鱼的肠道细菌调查时^[2],发现其肠壁的气单胞菌占有率为3.2%,明显低于草鱼肠道中该属菌的占有率,这可能与其食性和肠道内环境有关。

2.3.2 淀粉酶 淀粉是鱼类的主要饵料组成之一,本实验中的50株气单胞菌(来自第2组)均产淀粉酶,可以将其作为鉴别气单胞菌的一个指标。由于细菌的胞外酶可以帮助其寄主消化食物,可见气单胞菌对草鱼的淀粉消化起了一定的促进作用。

2.3.3 纤维素酶与木聚糖酶 鱼类肝脏和肠壁分泌的淀粉酶和蛋白酶活力很高,但利用纤维素的能力却很低。草鱼一生中要进食大量的鲜草,饲料系数非常高,其原因就是植物细胞壁的纤维素和半

纤维素无法被分解,因此,设法从鱼类肠道正常菌落中寻找纤维素和半纤维素的分解菌,并扩大其在鱼类肠道中的比例,以提高草鱼对草饲料的利用率,应是一条可行之路。

纤维素酶是一种多组分的酶,一般认为有 C_L 酶、 G_X 酶和 β -葡萄糖苷酶。 G_L 酶系指分解天然纤维素为短链纤维素或直链纤维素的纤维素酶, G_X 酶系指分解短纤维素成纤维寡糖、纤维二糖等较小单位的纤维素酶。

羧基纤维素酶(G_X 酶)和滤纸酶($G_L + G_X$)的检测。结果表明,18 株气单胞菌(来自第 2 组)全部产羧甲基纤维素酶,但没有检测到滤纸酶产生菌,可见,这批菌缺乏对天然纤维素的消化能力。

木聚糖是半纤维素的主要组成成分,对 18 株(来自第 2 组)气单胞菌的检测中,木聚糖分解菌有 11 株,占 61.1%,比例相当大。目前已有从嗜水气单胞菌中分离到木聚糖酶产生菌的报道^[8],其最适 pH 6.8,最适温度 30~37℃。这与鱼体内环境一致,鱼类肠道的 pH 范围为 6.0~9.2^[9]。本实验中的木聚糖酶还没有进行最适 pH 和温度的研究,但结合他人的结果可以看出,气单胞菌的木聚糖酶在

提高草鱼的草饲料利用率上有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Roberts R J. Motile *Aeromonas* septicaemia. In: Bacterial Diseases of Fish. eds. Inglis V, RJ Roberts, NR Bromage. London, 1993. 143~155
- 2 汤伏生,等. 鱼类细菌群落中的致病嗜水气单胞菌. 水产学报, 1995, 19(4): 369~373
- 3 F G 普里斯特. 细胞外酶. 北京: 科学出版社, 1988
- 4 汤伏生,等. 家鱼肠道细菌的消化酶分布. 华中师范大学学报(自然科学版), 1993, 2: 47~51
- 5 Ascencio F, Wadstrom T. Effect of *Aeromonas* protease on the binding of *Aeromonas hydrophila* stains to connective tissue proteins. Microbios, 1991(66): 27~37
- 6 Howard S P, J T Buckley. Activation of the Hole-forming toxin-haemolysin by extracellular processing. J Bacterial, 1985, 163: 336~340
- 7 贺 路. 沙市地区暴发性传染病病原研究. 淡水渔业, 1992, 3: 13~16
- 8 Kubata B K, et al. Purification and characterization of *Aeromonas caviae* ME-1 xylanase V, which produces exclusively xylobios from xylan. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(2): 531~535
- 9 尾崎久雄. 鱼类消化生理. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 388~417

Investigation on seasonal variations of *Aeromonas* in intestines of healthy grass carp

Zeng Yong

(Key Laboratory of Freshwater Germplasm Resources and Biotechnology,
Changjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Yuan Mingxiong

(College of Biological Science, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074)

Abstract The distributions of *Aeromonas* in intestines of healthy grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in epidemic and non-epidemic seasons of outbreaking fish diseases are discussed in this paper. The results show that no difference was found in *Aeromonas*-bacteria ratio in the samples between the 2 seasons. The *Aeromonas*-bacteria ratio of the samples from the epidemic season increased in winter. It can be inferred that the intestinal *Aeromonas* is a normal part of the intestinal microflora in grass carp. And in the exoenzyme some more *Aeromonas* were found, which can produce xylanase.

Key words *Aeromonas*, *Ctenopharyngodon idella*, intestine, hemolysin, exoenzyme