

鲤肠道嗜水气单胞菌产毒条件的初步研究 *

朱晓燕

(湖北农学院水产系, 荆州, 434103)

汤伏生 曾 勇

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

傅宏卓 刘 奇 桂立仿**

摘 要 本文从鲤肠道分离出 418 个溶血毒素产生菌落, 用鉴定培养基鉴定, 其中 27 个菌落属气单胞菌属, 其中产毒较高的 5 个菌落均能致病, 进行形态和生化鉴定, 结果表明其中 CCF3、CCF4 和 CCI42 属嗜水气单胞菌。本文还测定了不同 pH 和糖对毒产生的影响, 表明酸性 pH 和山梨糖能抑制毒素产生。

关键词 鲤, 嗜水气单胞菌, 致病性, 鉴定

嗜水气单胞菌近年来引起养殖鱼类暴发性败血症, 给我国水产养殖业造成了很大的损失。溶血毒素是该菌致病的关键因子, 研究其毒素产生条件, 对控制暴发性败血症的流行和改善养殖环境等都有很大帮助。

从患病鱼体分离嗜水气单胞菌的报道已经很多了。如贺路等^[6]从患病白鲢中分离出嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 9120。孙其焕等^[3]从患腹水的异育银鲫肝脏和肾脏中分离出温和气单胞菌 (*A. sobria*) N-1-2 和嗜水气单胞菌 89-7-14 和 D-II-1, 并且证明这几株菌均为病原菌。

健康鱼体里的嗜水气单胞菌是否能致病, 其生理特性等与病鱼里分离出的病原菌是否相同, 报导还较少。De Figueiredo 和 Plumb^[7]研究不同来源的嗜水气单胞菌对鱼体致病性, 得出的结论却是水环境的嗜水气单胞菌对鱼体毒性较低。我们从鲢体分离出的菌株却比嗜水气单胞菌 9120 的致病力还要强^[2]。为进一步研究健康鱼体气单胞菌的意义, 我们以鲤为材料, 进行了菌株分离、致病和产毒条件等实验研究。

材 料 和 方 法

(一)培养基、菌种分离、致病实验和菌种鉴定

RS 培养基按文献^[8], 肠道细菌分离按文献^[1], 氧化酶测定按文献^[2], 其它培养基、致病实验和菌种鉴定均同文献^[1]。

* 农业部“八五”生物技术计划项目

** 傅宏卓、刘奇和桂立仿三位同学为湖北农学院 1994 届毕业实习生。

(二)溶血毒素活力测定

将菌种培养过夜, 离心取上清作为毒素样品。将鲫红细胞按 3% 的比例悬浮于生理盐水, 每 ml 血样加毒素样品 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 离心, 用 DU-7 分光光度计测定 O.D.575。

结 果 和 分 析

(一)产毒菌株分离

本实验共从健康鲤肠道分离出 418 个溶血毒素产生菌落, 将这批菌落接种于糊精-品红培养基、RS 琼脂培养基, 并检测氧化酶和对氨苄青霉素的敏感性, 其中有 27 个菌落在糊精-品红培养基上为红色, 在 RS 琼脂上为黄色, 氧化酶阳性, 抗氨苄青霉素, 与气单胞菌属的特征比较接近。对其中产毒较高的菌株进行致病实验, 发现 CCF3、CCF4、CCI42、CCI50 和 CCI52 均能致病。5 株溶血毒素产生菌, 2 株来自食物样品 (CCF3 和 CCF4), 3 株来自肠壁样品 (CCI42, CCI 50 及 CCI 52)。致病实验表明这 5 株菌均对鱼体有致病作用, 其中 CCF 3 所产生的症状与暴发性败血症最接近。

(二)菌株的鉴定

对表 1 的 5 株菌进行了形态和生化鉴定。这 5 株菌革兰氏染色均为阴性, CCF 3, CCF 4 和 CCI 42 为极生单鞭毛; CCI 50 和 CCI 52 为周生鞭毛。这批菌株的生化指标鉴定见表 1。其中 CCF 3 与嗜水气单胞菌的特征最相符。

表 1 几株肠道菌株的生化指标鉴定
Table 1 Biochemical identification of bacterial strains

菌株 Strain	CCF 3	CCF 4	CCI 42	CCI 50
指标 Criteria				
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+
脲酶 Urease	-	-	-	-
蛋白水解 Casein hydrolysis	+	+	-	-
还原亚硝酸盐 Nitrite oxidation	+	+	+	+
厌氧硝酸盐产气 Anaerobe gas production from nitrate	+	+	+	+
产吲哚 Indole production	+	+	+	+
糖发酵产酸 Acid production from sugar				
木糖 Xylose	-	-	-	-
七叶灵 Esculin	+	+	+	+
果糖 Fructose	+	+	+	-
L-山梨糖 L-sorbose	-	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	+	-	-

(三)产毒条件初步研究

为研究菌株的产毒条件, 首先进行了产毒最佳时间的摸索。将菌种活化后接种于 LB 培养基, 35 $^{\circ}$ C 振荡培养, 在不同的时间取出 2ml 培养基, 离心, 取上清液测定其溶血滴度。结果见表 2。所测定的 4 株菌均在培养 12 小时后得到最高溶血毒素滴度。

表 2 嗜水气单胞菌的产毒时间

Table 2 Time course of toxin production of *A. hydrophila*

菌株 Strain	时间(小时) Time (hrs)	4	8	12	24	29	36
CCF 3		32	64	128	32	32	32
CCF 4		32	128	128	128	64	32
CCI 42		32	128	128	128	64	64
CCI 50		8	32	128	64	32	8

(四)不同 pH 对 CCF 3 毒素产生的影响

将菌种用 LB 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, 取上清测定其溶血活性。结果见表 3。由表中可以看出, 起始 pH 为 5.0 时溶血毒素产生受抑制。

表 3 pH 对嗜水气单胞菌毒素产生的影响

Table 3 The influence of pH on toxin production of *A. hydrophila*

起始 pH Initial pH	终点 pH Final pH	O.D. ₆₀₀	O.D. ₅₇₅
5.0	7.92	3.199	0.0845
6.0	8.24	3.827	0.3433
6.5	8.30	3.701	0.4233
7.0	8.41	3.659	0.4575
7.5	8.32	3.747	0.3377
8.0	8.45	3.726	0.3087
8.5	8.49	3.769	0.4193
9.0	8.56	3.407	0.4048

(五)不同糖对毒素产生的影响

将活化菌种接种于含 0.5% 不同糖的 LB 培养基中, 按上面的方法进行实验。结果见表 4。由表中看出, CCF3 不能发酵山梨糖和阿拉伯糖, 所以培养基终点 pH 与上面一样, 朝碱性方向变化, 但 CCF3 在这两种糖的存在下不能产生溶血毒素。其它 5 种糖均能被 CCF3 发酵, 终点 pH 均低于起始 pH, 但葡萄糖对生长及毒素产生均有部分抑制作用。

表 4 糖对嗜水气单胞菌毒素产生的影响

Table 4 The influence of sugar on toxin production of *A. hydrophila*

糖 Sugar	终点 pH Final pH	O.D. ₆₀₀	O.D. ₅₇₅
山梨糖 Sorbose	8.33	4.294	0.0291
半乳糖 Galactose	5.84	6.129	0.355
蔗糖 Sucrose	4.55	3.401	0.2905
阿拉伯糖 Arabinose	8.38	4.283	0.0247
甘露糖 Mannose	4.58	3.757	0.2903
果糖 Fructose	4.57	3.473	0.3001
葡萄糖 Glucose	4.42	2.293	0.2856

讨 论

1. 嗜水气单胞菌的产毒时间及产毒温度

我们所测定的4株菌的产毒高峰期均在培养12小时时。Nomura和Saito^[10]研究杀鲑气单胞菌时,发现其产毒高峰期是20℃培养24-30小时,而Majeed和MacRae^[9]研究低温时的产毒情况时,发现嗜水气单胞菌AH29在5℃培养5天时,检测不到溶血毒素,培养8天时溶血毒素滴度达64,培养11天时仍是64。可见培养温度对毒素产生有较大的影响,这应是暴发性败血症在夏季流行的原因之一。

2. 糖及pH对毒素产生的影响

本文结果证明pH5.0对毒素产生有抑制作用,Majeed和MacRae^[9]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^[11]也发现猪排上的嗜水气单胞菌对6.0以下的pH敏感。

我们曾研究过鱼类肠道细菌溶血毒素的葡萄糖抑制现象,发现有的菌株其溶血毒素产生受培养基中的葡萄糖抑制,属诱导型合成毒素;而有的菌株其毒素产生却与培养基中的葡萄糖浓度无关,属组成型合成毒素^[4]。本文分离的CCF3的生长和毒素产生均受葡萄糖抑制,这是否说明CCF3毒素合成为诱导型,还有待于进一步实验证实。

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): 38-42.
- [2] 朱晓燕, 汤伏生, 1994. 健康白鲢鱼体的病原菌. 湖北农学院学报, 14(4): 30-35.
- [3] 孙其焕等, 1991. 异育银鲫溶血性腹水病病原研究. 水产学报, 15(2): 130-139.
- [4] 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.
- [5] 汤伏生等, 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.
- [6] 贺路等, 1992. 沙市地区暴发性传染病病原研究. 淡水渔业, (3): 13-16.
- [7] De Figueiredo, J. and J. A. Plumb, 1977. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Aquaculture, 11: 349-354.
- [8] Farmer, J. T. et al., 1992. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. in *The Prokaryotes* (Ed. by Albert Balows et al). New York: Springer-Verlag, 1992. 30112-3045.
- [9] Majeed, K. N. & I. C. MacRae, 1993. Effect of pH level on the growth and exotoxin production by *Aeromonas* at refrigeration temperature. Microbios, 73: 281-288.
- [10] Nomura, S. & H. Saito, 1982. Production of the extracellular hemolytic toxin by and isolated strain of *Aeromonas salmonicida*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48(11): 1589-1597.
- [11] Palumbo, S. A. 1988. The growth of *Aeromonas hydrophila* k114 in ground pork at 5℃. Int. J. Food. Microbiol. 7: 41-48.

PRELIMINARY STUDY ON THE TOXIN PRODUCTION OF *Aeromonas hydrophila* FROM COMMON CARP INTESTINES

Zhu Xiaoyan Fu Hongzhuol Gui Lifang Liu Qi

(Dept. Fisheries, Hubei Agricultural College, Jinzhou, Hubei 434103)

Tang Fusheng Zeng Yong

(Changjiang Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shashi, 434000)

ABSTRACT 418 bacteria colonies that produce hemolysin have been isolated from the intestines of common carp (*Cyprinus carpio*), of which 27 colonies have been identified as *Aeromonas* spp. by differentiating media. 5 *Aeromonas* colonies whose toxin production are higher than that of other colonies can induce haemorrhagic disease to gold fish. Morphological and biochemical identification convinced that CCF3, CCF4 and CCI42 are belong to *A. hydrophila*. The production of toxin have also been investigated in this paper. Glucose and acidic environments can repress the production of hemolysin by *A. hydrophila* CCF3.

KEYWORDS Common carp, *A. hydrophila*, Identification, Toxin production