

文章编号:1000-0615(2001)05-0428-04

四株产色素温和气单胞菌的鉴定及其特性

李 瑾 年, 余 为 一, 祖 国 掌

(安徽农业大学畜牧水产学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:1996-2000 年从不同来源的病鳖和病鳗体内共分离到四株产生棕色色素的细菌,经细菌常规鉴定法和编码鉴定法确定为温和气单胞菌。进一步对细菌的产生色素特性、毒力因子和致病性进行检测,结果显示:(1)四株细菌均能产生水溶性棕色色素,但在有氧培养条件下细菌产生色素的速度随培养基种类不同而不同,依次为普通琼脂平板>肉汤培养基>琼脂半固体高层管。而在厌氧培养条件下细菌不能产生色素。(2)四株细菌均能产生外毒素及胞外蛋白酶二种毒力因子,毒素溶血价为 1:16 或 1:32。(3)四株细菌肉汤培养液对小白鼠及本种动物均有致死性,为致病性温和气单胞菌。

关键词:鳖;鳗鲡;温和气单胞菌;色素产生特性;毒力因子;致病性

中图分类号:S917;Q3-3 **文献标识码:**A

Identification and characteristics of 4 strains of *Aeromonas Sobria* producing pigment

LI Jin-nian, YU Wei-yi, ZU Guo-zhang

(Department of Animal Husbandry and Aquatic Products, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract:4 strains of *Aeromonas Sobria* producing pigments were isolated from diseased soft-shelled turtle, *Trinix sinensis* and eels, *Anguilla japonica* from 1996 to 2000. The four strains were classified as *Aeromonas Sobria* by normal identification method and numerical identification method. In addition, the bacterial characteristics of producing pigments, virulent factors and pathogenicity were detected. The results showed: (1) The four strains could produce water soluble brown pigment, but in aerobic culture, the productive speed was varied with different medium, agar plate > bouillon > semi-solid agar tube respectively. While in anaerobic condition, they could not produce any pigment. (2) The four strains were all able to produce toxin and protease, and the titers of toxin were 1:16 or 1:32. (3) They were pathogenic, and *Aeromonas Sobria* was lethal to mouse, eels and soft-shelled turtle.

Key words: *Trinix sinensis*; *Anguilla japonica*; *Aeromonas Sobria*; characteristics of producing pigment; virulent factor; pathogenicity

1996 年至 2000 年作者先后从病鳖、病鳗体内分离到四株产生棕色色素的细菌。通过细菌常规鉴定法和编码鉴定法鉴定,确定它们为温和气单胞菌,并对细菌的产生色素特性、致病性和毒力因子进行了进一步研究。

收稿日期:2000-11-13

基金项目:安徽省教委科学基金资助项目(97JL062)

第一作者:李瑾年(1962-),女,硕士,安徽蚌埠人,副教授,主要从事动物微生物学教学和研究。Tel:0551-5118835

1 材料与amp;方法

1.1 材料

普通琼脂培养基、兔血琼脂、10%脱脂乳蔗糖蛋白胨琼脂、刚果红琼脂等培养基均按文献[1]配制。

小白鼠购自安医大动物中心,雏鳖、仔鳗由送检单位提供。

兔抗嗜水气单胞菌抗体由本教研室自制。

细菌微量生化发酵管购自杭州微生物试剂厂。

革兰氏阴性杆菌七位编码鉴定盒购自哈尔滨海峡贸易公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离

无菌采取病鳖或病鳗的肝脏等脏器划线接种普通琼脂平板分离细菌并加以纯化留作以后实验用。

1.2.2 细菌鉴定

对纯化后的细菌分别采用常规鉴定法(形态学检查、培养特性、生化特性和抗原性测定)和细菌编码鉴定法进行系统鉴定。

1.2.3 细菌产生色素特性的测定

四株细菌分别接种普通琼脂平板、普通肉汤和普通琼脂半固体高层培养管,28℃静置需氧培养数天,观察色素产生情况。另外,将四株细菌穿刺接种普通琼脂半固体高层培养管,并塞上胶塞进行厌氧培养,观察色素产生情况。

1.2.4 细菌毒力因子的检测

HEC 毒素检测: 四株细菌接种兔血平板,28℃培养 24h,观察菌落周围有无无色透明溶血环。出现溶血环者判为产毒阳性,进一步采用微量板法^[2]测定细菌培养物离心上清液的溶血价,并以此来表示毒素的相对含量。

细菌蛋白酶的检测: 四株细菌分别接种普通肉汤,28℃培养 24h 后划线接种 10%脱脂乳蔗糖蛋白胨琼脂平板,28℃培养 24~48h,观察菌落周围有无透明蛋白溶解环,有溶解环者判为蛋白酶阳性^[3]。

细菌 S 蛋白的检测: 四株细菌分别接种普通肉汤,28℃培养 24h 后划线接种刚果红琼脂平板,28℃培养 72h,菌落呈黑红色者表示菌株可产生 S 蛋白,判为阳性;菌落呈浅红色或桔红色表示菌株不产生 S 蛋白,判为阴性^[4]。

1.2.5 细菌致病性测定

四株细菌的 28℃培养 18h 的肉汤培养液(浓度为 3×10^8 个 \cdot mL⁻¹)分别腹腔注射小白鼠,每只 0.2mL,每组 3 只,观察小白鼠发病死亡情况。另外细菌人工回归雏鳖和仔鳗,观察其发病死亡情况。动物死亡后剖检取肝再次分离细菌。

2 结果

2.1 产生棕色色素的细菌分离结果

1996 年 - 2000 年从不同来源的病鳖和病鳗体内分离到四株产生棕色色素细菌(表 1)。

2.2 产生棕色色素细菌的鉴定结果

四株分离细菌均为革兰氏阴性小杆菌,无荚膜、无芽胞、有动力。在普通琼脂平板上形成圆形,表面凸起、湿润、中等大小菌落并产生水溶性淡褐色—棕色色素,随培养时间延长,培养基颜色逐渐加深。采用微量生化发酵管法测定的细菌生化特性结果(表 2)显示四株细菌均发酵葡萄糖产酸产气,氧化酶及触酶阳性,能在无盐胨水中生长,肌醇阴性,尿素阴性,液化明胶,还原硝酸盐。并且分离菌能与兔抗气

表 1 菌株来源

Tab.1 Sources of the bacterial strains

菌株编号	分离时间(年-月)	地点	分离脏器
Z1	1996-12	A 鳖场	肝脏,腹水
Z2	1998-08	B 鳖场	肝脏,肾脏
Z3	1998-09	B 鳖场	肝脏,肾脏
Z4	2000-03	鳗鱼场	肝脏,肾脏

单胞菌抗体发生凝集反应,即完全符合文献[5]中对气单胞菌属的描述。由于分离菌在 37℃ 生长良好,有动力,因而可排除气单胞菌属中的嗜冷菌群,应归为嗜温菌群。又根据马子行^[6]报道的嗜温气单胞菌“种”鉴定八项指标:精氨酸脱羧酶阳性、赖氨酸脱羧酶阳性、鸟氨酸脱羧酶阴性、VP 阳性、七叶苷阳性、甘露醇阳性、蔗糖阳性、阿拉伯糖阴性,将四株细菌确定为温和气单胞菌。从表 3 可见细菌编码鉴定法的结果是这四株细菌的鉴定编码均为 3247124,查国际科学数据委员会(CODATA)认定的《革兰氏阴性杆菌新编码鉴定手册》^[7],检索菌名为温和气单胞菌,即与细菌常规鉴定方法的结果一致。

表 2 分离菌的生化特性

Tab.2 Biochemical characteristics of isolated bacterial strains

生化项目	Z1	Z2	Z3	Z4	生化项目	Z1	Z2	Z3	Z4
氧化酶	+	+	+	+	山梨醇	-	-	-	-
触酶	+	+	+	+	肌醇	-	-	-	-
尿酶	-	-	-	-	七叶苷	-	-	-	-
精氨酸脱羧酶	+	+	+	+	水杨素	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	弱+	+	苦杏仁甙	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-	甲基红试验	+	+	+	+
葡萄糖	⊕	⊕	⊕	⊕	维-培试验	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	-	吲哚试验	+	+	+	+
麦芽糖	+	⊕	+	+	硫化氢试验	-	-	-	-
甘露醇	+	+	⊕	⊕	柠檬酸盐利用试验	-	-	-	-
蔗糖	⊕	⊕	⊕	+	硝酸盐还原试验	+	+	+	+
阿拉伯糖	-	-	-	-	明胶液化试验	+	+	+	+
鼠李糖	-	-	-	-	37℃ 生长试验	+	+	+	+
木糖	-	-	-	-	无盐胨水生长试验	+	+	+	+
蜜二糖	-	-	-	-	半乳糖苷酶	+	+	+	+

注:+:阳性;-:阴性;⊕:产酸产气。

表 3 细菌编码鉴定法结果

Tab.3 The numeral identification for isolated bacterial strains

β 半乳糖苷酶	精氨酸双水解酶	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	柠檬酸盐利用	硫化氢试验	尿酶试验	吲哚丙酮酸试验	吲哚试验	维培试验	明胶液化试验	葡萄糖发酵	甘露醇发酵	肌醇发酵	山梨醇发酵	鼠李糖发酵	蔗糖发酵	蜜二糖发酵	苦杏仁甙发酵	阿拉伯糖发酵	氧化酶试验
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	3			2			4			7			1			2			4	

温和气单胞菌(很好鉴定, %id = 95.1, T = 0.82)

2.3 细菌在不同培养基上产生色素情况

细菌在不同培养基上 28℃ 静置需氧培养产生色素的时间、培养基颜色变化过程见表 4。但细菌在普通琼脂半固体高层培养管中进行厌氧培养时,它们不产生色素。

2.4 细菌毒力因子的检测结果

四株细菌均能产生毒素及蛋白酶二种毒力因子,毒素溶血价达 1:16 或 1:32。但未检测到 S 蛋白(表 5)。

2.5 细菌的致病性

小白鼠和雏鳖,仔鳗在接种细菌培养液后 24h 内,全部发病死亡并从肝脏中分离到相应的细菌。

表 4 细菌在不同培养基上产生色素的情况

Tab.4 The pigment produced by bacterial strains inoculated in different medium

培养时间	普通琼脂平板	普通肉汤	普通琼脂半固体高层管
24h	1/2 平板着浅褐色, 菌落无色。	菌液混浊, 无色。	细菌扩散生长, 培养基无色。
48h	3/4 平板着浅褐色, 菌落无色。	菌液上层略着色。	培养基上部略呈浅褐色。
72h	整个平板及菌落均呈棕色。	同 48h。	培养基着色部位增多, 颜色加深。
5d	整个平板及菌落均呈黑色。	菌液上层呈褐色, 菌液下层无色。	培养基着色部位增多, 颜色呈棕色。
9d		菌液全部变成棕色。	培养基着色部位进一步增多颜色呈棕色。
12d			培养基全部呈棕色。

表 5 分离菌的毒力因子

Tab.5 The virulent factors of isolated bacterial strains

菌株	毒素及其溶血价	蛋白酶	S 蛋白
Z1	+, 1:16	+	—
Z2	+, 1:16	+	—
Z3	+, 1:32	+	—
Z4	+, 1:16	+	—

3 讨论

1996 年至 2000 年从不同来源的病鳖及病鳗体内共分离到四株产生棕色色素的细菌。经鉴定它们均为革兰氏阴性小杆菌, 发酵葡萄糖产酸产气, 氧化酶及触酶阳性, 能在无盐胨水中生长, 肌醇阴性, 尿素阴性, 液化明胶, 还原硝酸盐, 能与兔抗气单胞菌

抗体发生凝集反应。即完全符合《伯杰氏细菌鉴定手册》中对气单胞菌属的描述^[5]。气单胞菌属细菌根据其生长温度范围等不同分二群: 一是嗜温菌群, 生长温度范围为 0~40℃, 有动力, 对多种动物具有致病性, 目前有嗜水气单胞菌、温和气单胞菌等 9 个种; 另一群为嗜冷菌群, 5~35℃ 生长, 37℃ 不生长, 无动力, 仅对鱼类致病, 其中某些亚种可产生棕色色素。本试验中分离的四株细菌虽然可产生棕色色素, 但由于它们在 37℃ 生长良好, 有动力, 因此仍应归于嗜温菌群。进一步采用细菌常规鉴定法和编码鉴定法将分离菌鉴定为温和气单胞菌。1998 年, 王广和等^[8]也从病鳗体内分离到能产生棕色色素的嗜温气单胞菌, 表明嗜温菌群中某些菌种也具有产生色素能力, 在临床上做细菌鉴定中应注意与产棕色色素的嗜冷气单胞菌加以区别。

试验中分离鉴定的四株细菌均具有产生水溶性棕色色素的特性, 但在有氧培养条件下细菌产生色素的速度随培养基种类不同而不同, 依次为普通琼脂平板 > 肉汤培养基 > 琼脂半固体高层管, 并且随培养时间延长, 培养基颜色逐渐加深。若将琼脂半固体高层管的棉塞换为胶塞, 细菌进行厌氧培养, 则它们不产生色素。说明该四株细菌需在有氧条件下才能产生色素, 氧气量越多, 色素产生速度越快。

目前, 已研究清楚嗜水气单胞菌在生长繁殖过程中产生的外毒素、胞外蛋白酶和 S 蛋白是构成该菌的重要毒力因子。温和气单胞菌是否也产生这些毒力因子? 国内尚未见报道。本实验采用了嗜水气单胞菌毒力因子的检测方法对所分离到的四株产色素温和气单胞菌进行检测, 结果显示它们均能产生外毒素和胞外蛋白酶二种毒力因子, 动物试验也显示出它们对小白鼠和本种动物均具有较强致死性, 说明这四株温和气单胞菌与嗜水气单胞菌一样具有毒力, 是引起水产动物细菌性疫病的重要病原体。

参考文献:

- [1] 郝土海. 现代细菌学培养基和生化实验手册[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 217-220.
- [2] 涂小林, 陆承平. 嗜水气单胞菌毒素的提取及其特性分析[J]. 微生物学报, 1992, 32(6): 432-438.
- [3] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的纯化与特性分析[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 88-94.
- [4] 严亚贤, 陈怀青, 陆承平. 嗜水气单胞菌 S 蛋白的提纯及特性分析[J]. 微生物学报, 1995, 36(2): 144-150.
- [5] Krieg N R. Bergey's manual of systematics bacteriology 8th[M]. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1984. 545-550.
- [6] 马子行. 气单胞菌分类和鉴定[J]. 国外医学: 微生物学分册, 1992, 15(1): 25-28.
- [7] 徐迪诚, 蔡妙英. 革兰氏阴性杆菌新编码鉴定手册[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994. 419.
- [8] 王广和, 王 坚, 钱晓明, 等. 鳗鲡气单胞菌病一新种[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 85-88.