

# 孟加拉进口黄鳝中致病性嗜水气单胞菌的分离与鉴定

王昱<sup>1,2</sup>, 袁增壮<sup>3</sup>, 聂福平<sup>1</sup>, 肖进文<sup>1</sup>, 杨俊<sup>1</sup>, 李应国<sup>1</sup>, 叶自霞<sup>3</sup>, 李正国<sup>2\*</sup>

(1. 重庆大学, 重庆 400044; 2. 重庆出入境检验检疫局, 重庆 400020; 3. 西南大学, 重庆 400716)

**摘要** [目的]了解致病性嗜水气单胞菌的存在状况和风险水平。[方法]采用分离培养、生化鉴定、序列测定和动物试验等方法,对2批孟加拉进口黄鳝进行致病性嗜水气单胞菌检测。[结果]从孟加拉进口黄鳝体内分离出4株高度致病性的嗜水气单胞菌。嗜水气单胞菌对孟加拉黄鳝本身致病性不明显,但是对小鼠的致病性却高达10 000~100 000 CFU/ml。[结论]孟加拉进口黄鳝存在致病性嗜水气单胞菌的感染,且对我国的食品 and 卫生安全存在一定的风险。

**关键词** 孟加拉黄鳝; 致病性嗜水气单胞菌; 分离; 鉴定

**中图分类号** S965.131 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)24-09997-03

## Isolation and Identification of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* from Bangladesh Imported Eels

WANG Yu et al (Chongqing University, Chongqing 400044)

**Abstract** [Objective] The research aimed to understand the status and risk level of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. [Method] By the methods of isolation and culture, biochemical identification, sequencing and animal testing, pathogenic *A. hydrophila* in two batches of Bangladesh imported eels was detected. [Result] Four highly pathogenic *A. hydrophila* were isolated and identified from two batches of Bangladesh eels. The pathogenicity of *A. hydrophila* to Bangladesh eel itself was not obvious and its pathogenicity to mice reached 10000~100000 CFU/ml. [Conclusion] Bangladesh imported eel was infected with *A. hydrophila* and it had certain risk for China's food and health safety.

**Key words** Bangladesh eel; Pathogenic *Aeromonas hydrophila*; Isolation; Identification

嗜水气单胞菌在自然界中分布广泛,一般被认为是正常共栖菌。1891年, Sanarelli首次描述嗜水气单胞菌。1936年 Kluyver和 Van Niel提出气单胞菌属的概念,将 Sanarelli描述的 *Bacillus hydrophila fuscus* 称为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, AH)。1959年,中国科学院水生生物研究所发现该细菌能引起鱼类烂腮病和赤皮病。1970年嗜水气单胞菌被确认为人类的肠道病原菌。到20世纪80年代中后期,由该菌引起的鱼类疾病在我国大面积流行,给渔业生产造成严重危害,才开始引起人们的重视<sup>[1]</sup>。自1986年起由嗜水气单胞菌引起的食物中毒、介水传染病、感染性腹泻、继发感染、败血症等频繁发生<sup>[2-10]</sup>,其致病作用已成为当今公共卫生关注的问题。

嗜水气单胞菌不仅是水生动物的传染病,而且也是爬行类、两栖类、鸟类等动物的重要病原菌,是我国淡水养殖鱼类爆发性传染病的主要病原<sup>[11]</sup>,在公共卫生方面占有重要地位。大量研究表明嗜水气单胞菌亦可单独与其他致病菌共同感染,引发人类的腹泻或败血症等病症,影响食品安全,并且是免疫抑制病人和肝功能疾病患者的机会致病菌。因此,嗜水气单胞菌已成为人畜鱼共患病原菌<sup>[12]</sup>。研究表明,该菌的致病性与其众多的毒力因子密切相关。该菌的主要毒力因子有气溶素<sup>[13]</sup>、溶血素<sup>[14]</sup>、胞外蛋白酶<sup>[13]</sup>及S层蛋白<sup>[14-15]</sup>等。笔者对来自孟加拉国的进口黄鳝进行了嗜水气单胞菌的分离培养,并采用16SrDNA序列测定和实验动物的方法对致病性嗜水气单胞菌进行检测。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 15~18 g健康小鼠,购自重庆医科大学附属儿童医院实验动物中心,雌雄兼用,部分自己养殖。

**1.2 主要试剂** 普通营养琼脂、普通营养肉汤、AHM鉴别培养基、脱脂奶蔗糖蛋白胨平板、氧化酶试剂、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>酶试剂,均购自北京陆桥技术有限公司;DNA提取试剂盒,购自美国OMEGA生物技术公司;Taq酶、dNTPmix、胶回收试剂盒、质粒DNA提取试剂盒,购自TaKaRa生物(大连)有限公司。

**1.3 分离和初步鉴定** 选取孟加拉国进口黄鳝10条,体表用75%酒精消毒,处死后将整个内脏、肠道取出,投入均质袋中,拍打均匀。用接种环无菌挑取少量液体接种于营养琼脂平板。28℃下培养18~24 h后,挑取边缘整齐、光滑、微凸、无色或淡黄色的圆形菌落,在营养琼脂平板上连续传代3次,挑取纯菌落进行革兰氏染色。同时,挑取少量纯菌落进行氧化酶、过氧化物酶试验,具体操作方法参照试剂盒说明书。若出现紫色或蓝色,即判定为阳性(根据试剂说明颜色而定);若不变色,表明氧化酶试验结果呈阴性。

**1.4 AHM培养基鉴定** 将分离的纯菌落接种到AHM培养基上,28℃下培养24 h后,观察颜色反应。嗜水气单胞菌在AHM培养基上,顶部仍为紫色,底部为淡黄色;细菌沿穿刺线呈刷状生长,部分菌株顶部呈黑色。

**1.5 脱脂奶蔗糖蛋白胨平板试验** 将分离的纯菌落接种到脱脂奶蔗糖蛋白胨平板8℃下培养24 h后,观察脱脂奶平板上菌落周围是否出现清晰透明的溶蛋白圈,以确定菌体是否产生胞外蛋白酶。阳性菌将会出现特征性乳晕现象。

**1.6 VTEK全自动生物鉴定** 将纯菌落接种于营养琼脂斜面过夜培养。用生理盐水1 ml将斜面上的菌落洗脱。细菌浓度按照VTEK32的操作要求。将菌液接种到GNI+鉴定卡上过夜反应,获得分离株的主要生化反应谱。

**1.7 16SrDNA序列分析** 将纯菌落接种于营养肉汤,28℃

**基金项目** 重庆市食品工程中心项目(2009CB10122);国家质检总局项目(201310093,20121K029)。

**作者简介** 王昱(1982-),男,四川合江人,高级兽医师,从事动物检疫和分子检测新技术, E-mail: Maker2002@sohu.com。\*通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事分子生物学研究, E-mail: zhengguoli@cqu.edu.cn。

**收稿日期** 2013-06-22

下摇床过夜培养,各取 2 ml 使用 TaKaRa 公司的 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0 试剂盒提取 DNA。按照 TaKaRa 公司的 Premix Taq Version 2.0 (Loading dye mix) 试剂盒的体系配制 25  $\mu$ l 体系 PCR 反应液。检测引物(其中, a = G3PDHY G3PDHF, b = 519B reverse 8VA forward, c = RVM m1347)扩增。PCR 程序为:95.0  $^{\circ}$ C 5 min;95.0  $^{\circ}$ C 30 s,50.0  $^{\circ}$ C 1 min,72.0  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;最后,72.0  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物用胶回收试剂盒回收纯化后,连接到 pMD19T 载体上,转化接种培养后提取质粒再次相同 PCR 条件进行鉴定。将提取质粒 PCR 扩增后的产物提取 15  $\mu$ l,送交宝生工(大连)有限公司进行测序。将测序所得细菌序列与已知相关细菌序列数据库对比分析。

**1.8 人工感染试验** 将分离菌株接种到营养肉汤,28  $^{\circ}$ C 摇床过夜培养,收集所有菌液于 4  $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 20 min,弃上清后用无菌生理盐水悬浮至原体积进行小鼠感染试验。同时,设立试验组和对照组。预试验时直接用未稀释的等倍细菌生理盐水悬液(平均浓度约为  $2.2 \times 10^8$  CFU/ml)接种小鼠 2 只,腹腔接种,0.4 ml/只。对照组每只注射等量无菌生理盐水。连续观察 7 d,观察记录试验小鼠 1 周内的患病症状和死亡情况。将 2~7 d 内致死的分离株用无菌生理盐水梯度稀释到  $10^{-8}$ ,每个梯度接种小鼠 6 只,连续观察 7 d,记录每个注射组的死亡情况,计算  $LD_{50}$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 病原菌的分离** 嗜水气单胞菌菌落典型为边缘整齐、光滑、微凸、无色或淡黄色的圆形菌落。显微镜观察发现细胞短杆菌,两端圆形,呈球形,直径 1.0~4.4  $\mu$ m;单个、成对或成链;以极生鞭毛运动,一般单鞭毛;革兰氏阴性,氧化酶阳性。分离株分别命名为 HS2、HS4、HS7、HS9、HS11、1、2、3、6、7、7-1、8、8-1、9、10,进行后续试验。

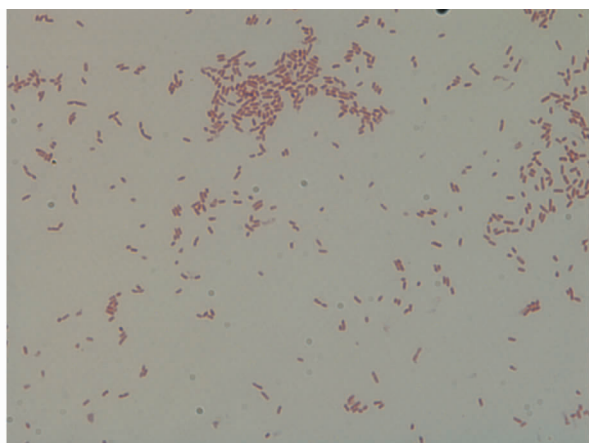


图1 显微镜下菌株的形态特征(1 000  $\times$ )

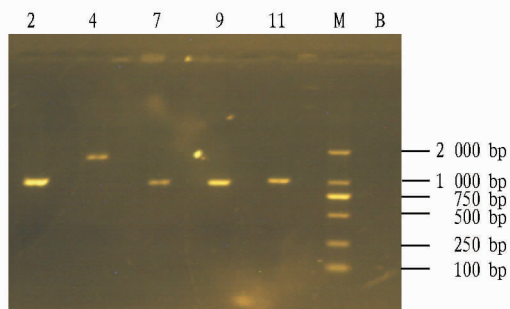
**2.2 病原菌生化鉴定** 对分离培养的 15 株病原菌采用全自动微生物鉴定/检测系统仪(Vitek)测定试剂条进行各种生理生化鉴定。由表 1 可知,通过与其他研究结果比较,HS2、HS7、HS9 和 HS11 被鉴定为嗜水气单胞菌,符合率在 80% 以上,其他菌株则未能做出生理生化结果。各地菌株存在差异,因此生理生化试验结果也存在着差异,需要采用其

他方法辅助进行确认试验。

**2.3 DNA 扩增序列测定和分析** 从图 2~3 可以看出,对 5 株病原菌进行 DNA 扩增,a、b 体系均扩出阳性条带,空白对照未扩增出条带。其中,a 体系中的 HS4 号菌与其他细菌距离较远。b 体系中,5 株菌间距离均相近。对 PCR 产物纯化连接克隆后送交宝生工(大连)有限公司测序,将测序所得细菌序列与已知相关细菌序列数据库对比分析,HS2、HS7、HS9 和 HS11 被鉴定为嗜水气单胞菌。

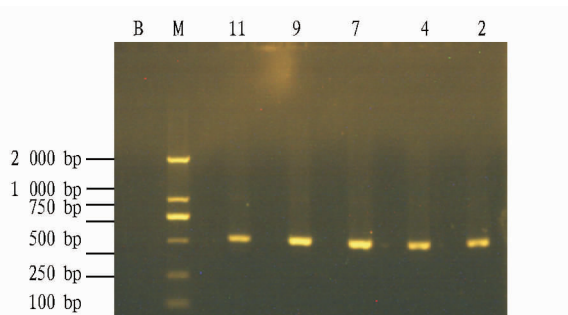
表 1 5 株菌株嗜水气单胞菌的生理生化鉴定结果

生化项目	鉴定结果	生化项目	鉴定结果
DP3 (三氯新)	+	OFG (葡萄糖氧化)	+
GC (阳性生长控制)	+	ACE (乙酰氨)	+
ESC (七叶树苷,七叶灵)	+	PLI (植物尿蓝母)	+
URE (尿素)	+	CIT (枸橼酸盐)	+
MAL (丙二酸盐)	+	TDA (苯丙氨酸)	+
PXB (多粘菌素 B)	+	LAC (乳糖)	+
MLT (麦芽糖)	+	MAN (甘露醇)	+
XYL (木糖)	-	RAF (棉子糖)	+
SOR (山梨醇)	+	SUC (蔗糖)	+
INO (肌醇)	+	ADO (侧金盏花醇)	+
COU (香豆酸)	+	H2S (硫化氢)	+
ONP ( $\beta$ -半乳糖苷酶)	+	RHA (鼠李糖)	+
ARA (阿拉伯糖)	+	GLU (葡萄糖发酵)	+
ARG (精氨酸)	-	LYS (赖氨酸)	-
ORN (鸟氨酸)	-	OXI (氧化酶)	-



注:M. DNA marker (DL2000);2. HS2;4. HS4;7. HS7;9. HS9;11. HS11;B. 空白对照。

图2 a 体系 1% 琼脂糖凝胶电泳的检测结果



注:2. HS2;4. HS4;7. HS7;9. HS9;11. HS11;M. DNA marker (DL-2000);B. 空白对照。

图3 b 体系 1% 琼脂糖凝胶电泳的检测结果

## 2.4 致病性鉴定结果

**2.4.1 氧化酶试验结果。**通过 15 株纯化后的细菌通过营养琼脂 28  $^{\circ}$ C 过夜培养后,其氧化酶试验结果见表 2。

**2.4.2 AHM 鉴别培养基结果。**从图 4 可以看出,试管顶部仍为紫色,底部为淡黄色;细菌沿穿刺线呈刷状生长,即运动力阳性,部分菌株顶部呈黑色,少数产有气泡。

表 2 氧化酶试验结果

批次	编号	结果
1	HS2	+
	HS4	-
	HS7	+
	HS9	+
	HS11	+
2	1	+
	2	+
	3	+
	6	-
	9	+
	10	-
	8	+
	8-1	+
	7	+
	7-1	+

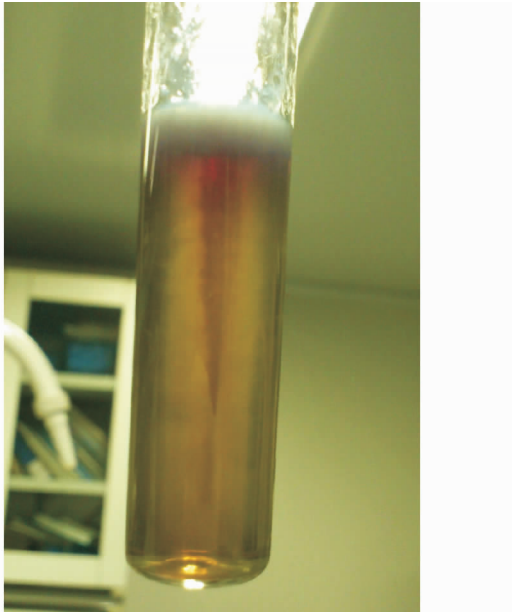


图 4 鉴别培养基结果

**2.4.3 主要毒力因子检测结果。**从图 5 可以看出,1% 脱脂奶蔗糖胰蛋白胨平板上菌落周围出现清晰透明的溶蛋白圈。

**2.4.4 人工感染试验结果。**取分离菌悬液分别腹腔注射 SPF 小鼠后,均在 24 h 左右发病,表现为弓背、耸毛、运动迟缓、食欲不振,双眼半闭、呼吸急促等症状,其中有 4 只小鼠在 72 h 内相继死亡。解剖死亡的小白鼠,发现肠水肿,肠腔积液等,取肠内容物培养,仍获原感染菌。注射灭菌盐水的对照组 7 d 无不良反应。分离株的致病性差异较大,4 株致病性嗜水气单胞菌的  $LD_{50}$  为 10 000 ~ 100 000 CFU/ml。

### 3 结论与讨论

从黄鳝中分离的病原菌观察到其在营养琼脂培养基上生长菌落形态及其在 1% 脱脂奶蔗糖胰蛋白胨平板上培养菌落周围出现清晰的透明溶蛋白圈,AHM 鉴别培养基上阳性

表现顶部仍为紫色,底部为淡黄色;细菌沿穿刺线呈刷状生长部分菌株顶部黑色都与嗜水气单胞菌相符合。经 M64 + VTEK3 全自动微生物鉴定/检测系统仪(Vitek)菌株生理生化鉴定 80% 以上为嗜水气单胞菌,再对其进行 PCR 扩增测序比对结果表明分离菌与嗜水气单胞菌同属一个类群。胞外蛋白酶是嗜水气单胞菌与其毒素的分泌有密切的关系,因此对胞外蛋白酶的检测也作为嗜水气单胞菌鉴定的重要方面。对分离的菌株进行人工感染试验,结果致使小鼠死亡,表明分离菌株具有致病性。



图 5 1%脱脂奶蔗糖胰蛋白胨平板

嗜水气单胞菌是一类属于广泛存在的人、兽、鱼共患病原<sup>[6]</sup>,可引起多种水产动物败血症和人类腹泻,从而给淡水养殖业造成惨重的经济损失。嗜水气单胞菌为条件致病菌,当外界环境条件适宜其生长繁殖时,常引起条件性致病<sup>[17]</sup>,可分为致病菌株和非致病菌株,致病性与其胞外产物(如肠毒素、溶血素、细胞毒素、蛋白酶等)有密切的关系。笔者使用先进的全自动微生物鉴定/检测系统仪对其菌株进行鉴定,具有快速、省事、省力且结果准确等优点。从黄鳝中分离菌株 25 株,其中有致病性嗜水气单胞菌菌株 4 株,检出率为 12%。

### 参考文献

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报,1992,16(3):282-288.
- [2] 吴龙章,周辉林,潘美玉,等. 嗜水气单胞菌致腹泻分析[J]. 中华医院感染学杂志,2000,10(4):256.
- [3] 陈东科,胡云建,张秀珍. 1998 ~ 1999 年致病性弧菌感染菌群的分布[J]. 中华医学检验杂志,2000,23(5):290.
- [4] 仇庆文,高婷,冯晓媛. 嗜水气单胞菌污染饮用水的急性腹泻暴发[J]. 环境与健康杂志,1993,10(3):99-101.
- [5] 郭振坤,秦淑娟,韩明琳,等. 一起饮用水污染引起腹泻的病原菌检验[J]. 微生物学杂志,2001,21(1):61-62.
- [6] 陈晓蔚,石利民,黄杰,等. 二次供水被嗜水气单胞菌污染致腹泻病暴发的调查[J]. 预防医学文献信息,2001,7(3):256-57.
- [7] 叶方友,江夏明,王琳娜. 一起嗜水气单胞菌感染导致群体性腹泻的调查[J]. 中华流行病学杂志,2004,25(5):406.

(下转第 10026 页)

期差异不显著。

**2.4 成年银桂和幼年银桂花芽分化期叶片可溶性糖及 C/N 的动态变化** 由图 4a 可以看出,4 月 15 日成年树和幼年树可溶性糖含量值差异不显著,4 月 15 日至 6 月 15 日幼年树比成年树高,后期成年桂花比幼年桂花高。可溶性糖含量的

变化趋势相同,前期突然下降,中期上升较缓慢,后期又突然下降,中后期差异较显著,成年银桂可溶性糖含量在 7 月 8 日达到最大值,而幼年银桂是 4 月 15 日。C/N 含量在成年树和幼年树中变化趋势相同,4 月 15 日为最大值,前期下降较快,后期变化不明显(图 4b)。

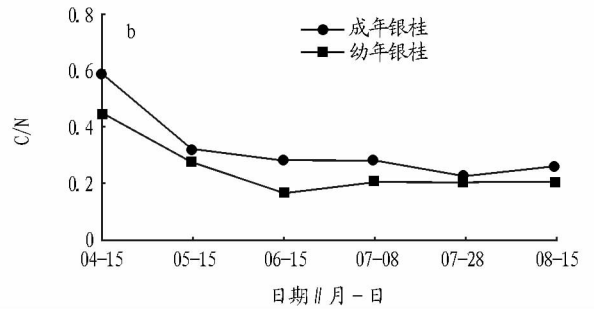
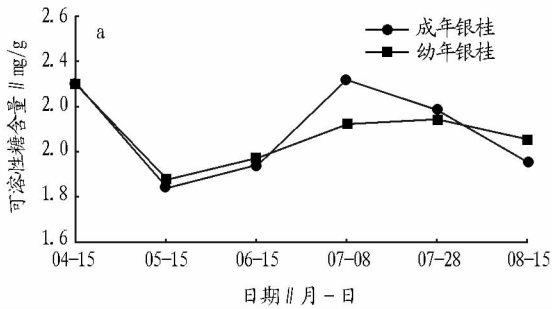


图 4 花芽分化期间叶片中可溶性糖含量及 C/N 的变化

### 3 讨论

适度的 N 元素促进花芽分化,高含量的 N 有利于促进蛋白质的合成、促进营养生长<sup>[5]</sup>;P 能使各种代谢正常进行,促进植株生长发育良好,缺 P 使蛋白质合成受阻,新的细胞质和细胞核形成较少,影响细胞分裂和生长<sup>[6]</sup>。Zn 主要参与生长素的合成,氮素同化,蛋白质、核酸代谢及细胞分裂<sup>[7]</sup>。研究表明,银桂幼树比成年树 N、P 和 Zn 含量高,这可能与 N、P 和 Zn 促进幼树营养生长有关。K 能促进糖分转运和运输,K 供应充分,糖类合成加强<sup>[5]</sup>;Mg、Fe 参与植物的光合作用,生成更多的糖类物质,提高可溶性糖含量和 C/N,较高的可溶性糖与 C/N 有利于促进植物花芽分化<sup>[7-11]</sup>,该研究中成年树 K、Mg、Fe 含量高,有利于促进成年树的花芽分化。

影响桂花花芽分化因素很多,矿质元素只是影响桂花花芽分化因素之一,其他因素如环境条件的影响、内源激素调节、核酸含量特别是基因调控等还需进一步研究。

### 参考文献

- [1] GOLDSCHMIDT E E, TAMIM M, GOREN R. Gibberellins and flowering in citrus and other fruit trees: A critical analysis [J]. Acta Horticulturae, 1997, 463: 201 - 208.
- [2] 陈洪国,周开兵,张红艳.三个桂花品种生长量、花量及叶片矿质营养含量变化研究[J].武汉植物学研究,2008,26(1):108 - 112.
- [3] 徐广平,何成新,李先琨,等.园林植物桂花叶片矿质元素及生理特征对冬季异常低温的响应[J].核农学报,2013,27(3):365 - 372.
- [4] 王彩云,高莉萍,鲁涤非,等.‘厚瓣金桂’桂花花芽形态分化的研究[J].园艺学报,2002,29(1):52 - 56.
- [5] 吴邦良,夏春森,赵宗方,等.果树开花结果生理和调控技术[M].上海:上海科学技术出版社,1995:41 - 44.
- [6] 潘瑞炽,王小菁,李娘辉.植物生理学[M].7版.北京:高等教育出版社,2012.
- [7] 赵同科.植物锌营养研究综述与展望[J].河北农业大学学报,1996,19(1):102 - 107.
- [8] 陆修润,郑少泉,蒋际谋,等.“早钟6号”枇杷主要营养元素含量的年周期变化[J].园艺学报,2000,27(4):240 - 244.
- [9] 钟晓红,罗先实,陈爱华.奈李花芽分化与体内主要代谢产物含量的关系[J].湖南农业大学学报,1999,25(1):31 - 35.
- [10] GREENBERG J, GOLDSCHMIDT E E, GOREN R. Potential and limitations of the use of paclobutrazol in citrus orchards in Israel [J]. Acta Hort, 1993, 463: 201 - 208.
- [11] BUBN T, FAUSUT M. Flower bud in duction in apple trees: Internal Control and Differentiation [J]. Hort Rev, 1982, 4: 174.
- [12] WANG F, XU T, GUO Q, et al. Characteristics of Uptake and Accumulation of Pb and Cd in Osmanthus fragrans (Thunb.) Lour. under Single and Combined Stresses of Pb and Cd [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(10): 2219 - 2225.
- [13] 蔡盛春,吴人选,杨芝厦.嗜水气单胞菌引起的食物中毒[J].上海预防医学杂志,1995,7(5):210.
- [14] 高玲玲,柳光斌,张伟忠.一起由嗜水气单胞菌引起食物中毒的调查报告[J].职业与健康,2002,18(9):56257.
- [15] 俞志祥.一起嗜水气单胞菌引起食物中毒调查分析[J].中华医学实践杂志,2003,2(8):749.
- [16] HOWARD S P, GARLAND W J, GREEN M J, et al. Nucleotide sequence of the gene for the hole forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila* [J]. J Bacteriol, 1987, 169: 2869 - 2871.
- [17] HIRONO I, AOKI T. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. Microb Pathog, 1991, 11(3): 189 - 197.
- [18] CASCON A, FREGENEDA J, ALLER M, et al. Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene

- with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila* [J]. J Fish Diseases, 2000, 23(1): 49 - 59.
- [14] CASCON A, YUGUEROS J, TEMPRANO A, et al. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3233 - 3241.
- [15] 陈怀青,陆承平.嗜水气单胞菌 S 层的结构和功能[J].水生生物学报,1998(22):6 - 10.
- [16] 陆承平,致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J].水产学报,1992,16(3):282 - 288.
- [17] 储卫华,陆承平. PCR 扩增特异性 16S rDNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌[J].水产学报,2005(1):79 - 82.
- [18] 吕大成,单晓枫.框镜鲤嗜水气单胞菌的分离鉴定[J].畜牧与饲料科学,2011,32(8):15 - 16.

(上接第 9999 页)