

# 九孔鲍消化道及养殖水体中异养细菌胞外产物的分析

蔡俊鹏 程 璐

(华南理工大学轻工与食品学院 广州 510640)

**摘要:** 从汕尾健生鲍鱼场养殖水体及鲍鱼消化道中分离筛选到 26 株异养细菌, 分析了其胞外产物, 并采用 API 条带对其进行了种类鉴定。结果表明, 就整体而言, 成鲍消化道菌株产蛋白酶、淀粉酶、明胶酶和溶血能力均高于养殖水体的菌株, 而产脂肪酶和卵磷脂酶菌株的比例则低于后者。无论是消化道还是养殖水体, 均存在着分泌胞外产物能力极强的菌株, 且大部分为鞘氨醇单胞菌。因此, 在该养殖环境中, 鞘氨醇单胞菌应视为一种主要的条件致病菌, 同时消化道和养殖水体均应视为潜在致病菌的源泉。此外, 在考虑细菌对水产经济动物的致病作用时, 除了优势种类外, 还应从菌群结构的角度出发, 考虑整个细菌群落胞外产物的作用。

**关键词:** 消化道, 养殖水体, 异养细菌, 致病因子

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0070-07

## Studies On Extra-cellular Pathogenic Factors Produced by Heterotrophic Bacteria Isolated from Abalone Digestion Guts and Farming Waters

CAI Jun-Peng CHENG Lu

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

**Abstract:** 26 heterotrophic bacteria strains were isolated from grown abalone digestion guts and their farming waters in Jiansheng Abalone Farm in Shangwei, Guangdong province. Analyses of extra-cellular pathogenic factors were performed and API 20 E strips were employed to identify all the isolates. Results indicated that isolates from digestion guts displayed greater ability of producing protease, amylase, gelatinase and/or hemolysis than those from farming waters, while their ability of producing lipase and phospholipase were lower than the later. Regardless of their source of origins, there were some isolates which had great abilities of producing extra-cellular products and most of them were *Sphingomonas paucimobilis*. Therefore, *Sphingomonas paucimobilis* should be considered as an opportunistic pathogen in the abalone farming environments, while the digestion guts and farming waters should be both regarded as the sources of harboring potential pathogens. In addition, apart from predominant strains, the roles of extra-cellular products of the bacteria community as a whole should be taken into consideration when dealing with fish diseases.

**Key words:** Digestion guts, Farming waters, Heterotrophic bacteria, Pathogenic factor

随着鲍鱼养殖业的发展, 集约化程度的提高, 各种病害愈演愈烈。许多鲍鱼病害如气泡病、脓疱病、溃疡病等<sup>[1]</sup>, 均由细菌感染引起。病原菌在生长繁殖过程中不断向环境释放出代谢产物, 这些代谢产物 (即胞外产物) 对于细菌利用环境中的营养物质、吸附和入侵宿主体体, 在宿主体内扩散、繁殖以及消除宿主免疫因子的免疫作用等具有极为重要的作用<sup>[2]</sup>。有研究揭示, 嗜水性单胞菌引起的细菌性败血症主要是由于病原菌产生的胞外产物引起溶血性贫血及各脏器组织的广泛性病变<sup>[3]</sup>。Ellis 等<sup>[4]</sup>研

通讯作者 Tel: 020-87113024, E-mail: febjpcai@scut.edu.cn

收稿日期: 2005-08-19, 修回日期: 2005-10-21

究表明,杀鲑气单胞菌感染虹鳟后引起的病理学变化主要是由细菌胞外产物中的毒素或其它侵染因子引起,如蛋白酶对胶原蛋白的水解及杀白细胞素对吞噬细胞的破坏作用。Ototake 等<sup>[5]</sup>从患病鲑鱼鳃上分离到黄杆菌,证实其胞外产物具有多种酶活性,并引起鲑鱼鳃病。顾继东等<sup>[6]</sup>研究土著致病菌及其胞外产物在生物防治斑马贝的作用时,发现中间气单胞菌、维罗纳气单胞菌、杀鲑气单胞菌杀鲑亚种和腐败希瓦氏菌四种异养细菌的胞外分泌物对斑马贝表现出不同的致死效果,并推断致死率的不同可能是由于不同细菌具有不同的生理特性而产生不同的代谢产物。

由此可见,作为养殖环境中的重要成员,异养细菌在水生经济动物病害上起着重要的作用。它们能够分泌多种胞外产物,进而使水产动物致病。据此,我们对汕尾健生鲍鱼场水体及鲍鱼消化道中潜在致病异养细菌的胞外产物进行了分析,目的旨在探讨鲍鱼养殖环境中潜在病原菌的毒力大小,为细菌性疾病的预防和诊断提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源:2002 年从广东省汕尾健生鲍鱼场成鲍养殖水体和消化道采集分离获得。

1.1.2 2216E 海洋细菌培养基:详见参考文献 [7]。

1.1.3 产蛋白酶菌株的筛选培养基:详见参考文献 [7]。

1.1.4 产脂肪酶菌株的筛选培养基:详见参考文献 [7]。

1.1.5 产卵磷脂酶菌株的筛选培养基:详见参考文献 [8]。

1.1.6 产淀粉酶细菌的筛选培养基:详见参考文献 [7]。

1.1.7 产明胶酶细菌的筛选培养基:详见参考文献 [8]。

1.1.8 山羊血平板培养基:购于广东环凯微生物科技公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌的分离纯化:直接用灭菌三角瓶从养殖池采集水样,将水样进行适当梯度稀释。自同一水池,采集 6 月龄九孔鲍,取其消化道,无菌处理后继续做同样适度稀释。将原液与各稀释倍数溶液分别均匀地涂布于 2216E 平板。培养出的菌落用划线法分离成单个菌落,直至显微镜观察为单一菌种,从而分离纯化出养殖水体及鲍鱼消化道中的主要细菌。

1.2.2 细菌胞外产物的分析:采用杯碟法<sup>[7]</sup>测定菌株产胞外蛋白酶、卵磷脂酶、淀粉酶和明胶酶能力:将处于对数期的菌株分别点种于含有酪蛋白、蛋黄液、淀粉和明胶的平板中,28℃ 恒温培养箱中培养适当时间后观察。含酪蛋白、蛋黄液的平板可以直接观察水解圈;含淀粉和明胶的平板则在观察之前需要分别加入显色剂卢哥氏典液和 HgCl<sub>2</sub> 溶液,透明的水解圈区域显示有酶活。通过比较水解圈直径/菌落直径 (D/d) 数值的大小来判断菌株的产酶能力,该值越大,菌株产酶能力越强。

根据 Mourney 的方法测定菌株产胞外脂肪酶能力<sup>[9]</sup>:将处于对数期的菌株接种于含有橄榄油和中性红指示剂的平板中,28℃ 恒温培养箱中培养适当时间后取出,观察菌落是否会变成红色。比较红色水解圈直径/菌落直径 (D/d) 数值大小来判断菌株产脂肪酶的能力,比值越大,表明此菌株产脂肪酶能力越强。

1.2.3 溶血能力的分析:将菌株接种至山羊血平板中,置 28℃ 恒温培养箱中培养适当时间后观察菌株周围是否出现溶血圈。若出现溶血圈则为阳性,表明该菌能分泌具有

溶血活性的胞外产物。

**1.2.4 菌株鉴定:** 菌株纯化后, 选择法国梅里埃公司 API 20E 鉴定条, 检测生理生化反应<sup>[10]</sup>, 根据结果应用 API LAB 软件并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行检索鉴定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细菌的分离纯化

从 6 月龄成鲍消化道中分离得到 11 株异养细菌, 依次编号为 Be01, Be02, Be03... Be11; 从养殖水体中分离得到 15 株异养细菌, 依次编号为 Se01, Se02, Se03... Se15。

### 2.2 细菌胞外致病毒力因子分析

**2.2.1 产蛋白酶菌株的分析:** 若菌株具有分泌蛋白酶能力, 产生的蛋白酶就会分解蛋白质, 从而在菌株的四周形成透明的水解圈, 培养 10h 后的实验结果如图 1 所示。

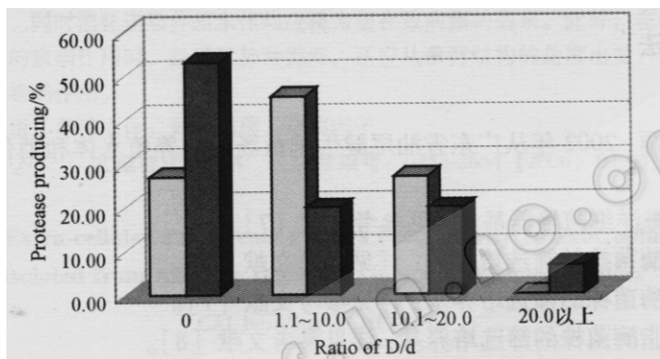


图 1 消化道及水体中异养细菌分泌蛋白酶能力的比较

■ Heterotrophic bacteria from digestion guts,  
■ Heterotrophic bacteria from farming waters

从图 1 可知, 成鲍消化道产蛋白酶菌株的比例 (72.7%) 高于养殖水体菌株的比例 (46.7%), D/d 值小于 20 的任何一段区间内均如此, 由此揭示了消化道中异养细菌分泌蛋白酶能力强于水体的。但也有例外, 当 D/d 值超过 20 时, 仅水体的 Se09 菌株有如此强的产蛋白酶能力。

**2.2.2 产脂肪酶菌株的分析:** 若菌株具有分泌脂肪酶能力, 就会水解橄榄油成脂肪酸, 形成红色的菌落圈, 培养 62h 后的实验结果如图 2 所示。

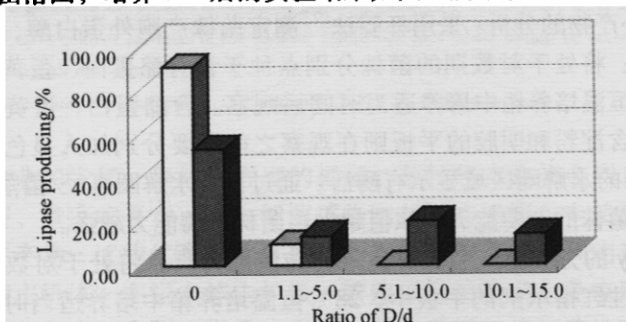


图 2 消化道及水体中异养细菌分泌脂肪酶能力的比较

■ Heterotrophic bacteria from digestion guts,  
■ Heterotrophic bacteria from farming waters

从图 2 可以看出, 养殖水体产脂肪酶菌株的比例 (46.7%) 明显高于消化道菌株的比例 (9.1%), D/d 值在任何一段区间内均如此。而且鲍鱼消化道菌株水解脂肪的能力都很弱, D/d 值均低于 5; 而养殖水体中有 3 株异养细菌的 D/d 值  $\geq 10$ , 其中以 Se06 的能力最强。

**2.2.3 产卵磷脂酶菌株的分析:** 若菌株具有分泌卵磷脂酶能力, 产生的卵磷脂酶就会分解蛋黄, 从而在菌株的四周形成乳白色的水解圈, 培养 10h 后的实验结果如图 3 所示。

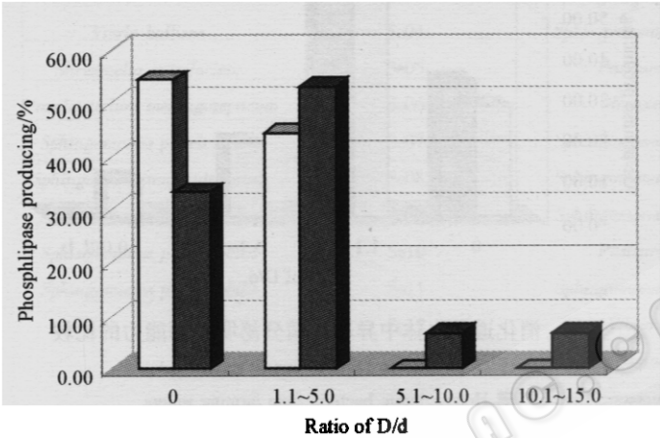


图 3 消化道及水体中异养细菌分泌卵磷脂酶能力的比较

■ Heterotrophic bacteria from digestion guts,  
■ Heterotrophic bacteria from farming waters

从图 3 可比较得出, 水体产卵磷脂酶菌株的比例 (66.7%) 高于消化道菌株的比例 (45.5%)。与产脂肪酶的情况相似, 鲍鱼消化道菌株产卵磷脂酶的能力均弱; 而水体菌株中, 有 7.7% 的 D/d 值超过 10, 其中以 Se06 的产酶能力最强。

**2.2.4 产淀粉酶菌株的分析:** 若菌株具有分泌淀粉酶能力, 加入卢哥氏典液后就会形成透明的水解圈, 培养 13h 后的实验结果如图 4 所示。

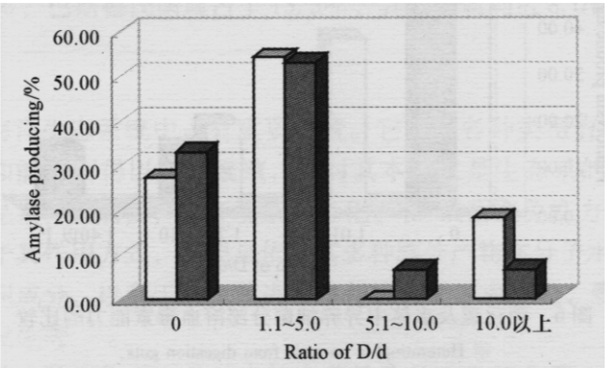


图 4 消化道及水体中异养细菌分泌淀粉酶能力的比较

■ Heterotrophic bacteria from digestion guts,  
■ Heterotrophic bacteria from farming waters

从图 4 可以看出, 成鲍消化道产淀粉酶菌株的比例 (72.7%) 稍高于养殖水体菌株的比例 (66.7%)。研究发现, 与水体中菌株的能力相对平稳相反, 消化道中异养细

菌产淀粉酶的能力或很弱,或极强,如 Be10 和 Be11 的 D/d 值低至 2 以下,而 Be02 和 Be06 的 D/d 值却高达 15 以上。

**2.2.5 产明胶酶菌株的分析:**若菌株具有分泌明胶酶能力,加入  $\text{HgCl}_2$  溶液后就会形成透明的水解圈,培养 13h 后的实验结果如图 5 所示。

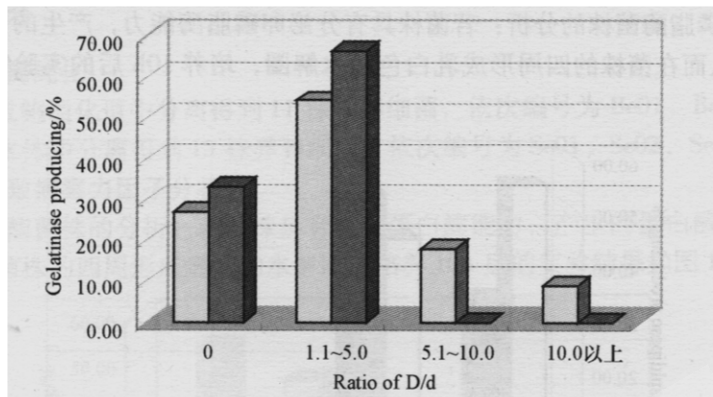


图 5 消化道及水体中异养细菌分泌明胶酶能力的比较

■ Heterotrophic bacteria from digestion guts,

■ Heterotrophic bacteria from farming waters

从图 5 可以看出,虽然成鲍消化道产明胶酶菌株的比例 (72.7%) 稍高于养殖水体菌株的比例 (66.7%),但水体异养细菌分泌明胶酶的能力均弱于消化道菌株。值得一提的是,从鲍鱼消化道中分离得到一株产明胶酶能力极强者 (Be09), D/d 值高达 30.7。

**2.2.6 菌株溶血能力的分析:**试验中,将 26 株菌点种于血平板中,置  $28^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 102h,观察溶血圈大小,实验结果如图 6 所示。

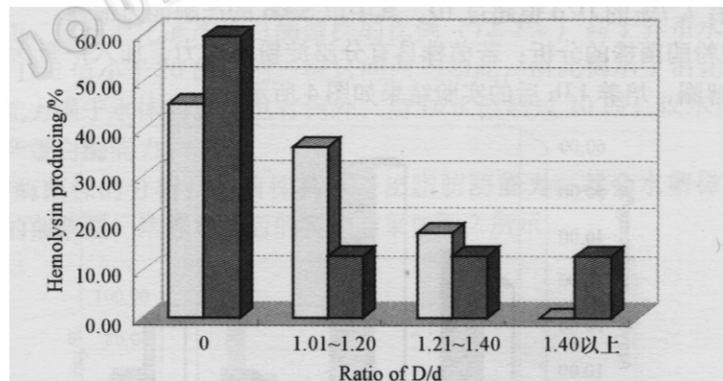


图 6 消化道及水体中异养细菌分泌溶血毒素能力的比较

■ Heterotrophic bacteria from digestion guts,

■ Heterotrophic bacteria from farming waters

如图 6 所示,成鲍消化道有溶血能力菌株的比例 (92.9%) 远高于养殖水体的菌株 (54.5%),但两种来源的异养细菌其溶血能力均较很小, D/d 值在 1.0 ~ 2.0 之间范围之内。

### 2.3 细菌的种类鉴定

为了进一步了解这 26 株异养细菌的种类组成,我们应用 API 鉴定条对它们进行了

鉴定, 见表 1。

表 1 细菌的种类鉴定

| 消化道  |                                       | 养殖水体 |                                       |
|------|---------------------------------------|------|---------------------------------------|
| 菌株号  | 种类名                                   | 菌株号  | 种类名                                   |
| Be01 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | Se01 | <i>Aeromonas hydrophila</i>           |
| Be02 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | Se02 | <i>Flavobacterium meningosepticum</i> |
| Be03 | <i>Aeromonas salmonicida</i>          | Se03 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
| Be04 | <i>Vibrio hollisae</i>                | Se04 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
| Be05 | <i>Shewanella putrefaciens</i>        | Se05 | <i>Pasteurella</i> spp.               |
| Be06 | <i>Flavobacterium meningosepticum</i> | Se06 | <i>Moraxella</i> spp.                 |
| Be07 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | Se07 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
| Be08 | <i>Sphingobacterium multivorum</i>    | Se08 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
| Be09 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | Se09 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
| Be10 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | Se10 | <i>Pasteurella</i> spp.               |
| Be11 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      | Se11 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
|      |                                       | Se12 | <i>Vibrio minicus</i>                 |
|      |                                       | Se13 | <i>Pseudomonas cepacia</i>            |
|      |                                       | Se14 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |
|      |                                       | Se15 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>      |

2.3.1 鲍鱼消化道中异养细菌种群组成: 鲍鱼消化道中异养细菌类群主要由鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*, 弧菌属 *Vibrio*, 气单胞菌属 *Aeromonas*, 黄杆菌属 *Flavobacterium*, 希瓦氏菌属 *Shewanella*, 鞘氨醇杆菌属 *Sphingobacterium*, 组成。其中鞘氨醇单胞菌属占了 54.5%, 其它属均占 9.1%。

2.3.2 养殖水体中异养菌种群组成: 养殖水体中异养细菌类群主要由鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas*, 弧菌属 *Vibrio*, 巴斯德氏菌属 *Pasteurella*, 莫拉氏菌属 *Moraxella*, 假单胞菌属 *Pseudomonas*, 气单胞菌属 *Aeromonas*, 黄杆菌属 *Flavobacterium* 组成, 其中鞘氨醇单胞菌占了 46.7%, 巴斯德氏菌属占了 13.3%, 其它各属均占 8.0%。

3 讨论与总结

异养细菌在海洋生态系统中占有重要位置。它能够将各种类型有机物分解成无机物并从中获得养分和能量而得以生长繁殖, 同时其本身又是生态系的营养源<sup>[11]</sup>。但是, 许多异养细菌也是条件致病菌, 在环境条件恶化、和/或宿主免疫力低下时可使水产动物感染发病。至于其作用方式, 主要是依靠其多种胞外产物在分子水平上协同作用<sup>[12]</sup>, 分解破坏宿主组织成分, 以利于病原菌进一步侵染; 破坏血细胞, 影响其功能的发挥, 并导致溶血现象发生等<sup>[13]</sup>。

本文通过九孔成鲍消化道和养殖水体中菌株胞外产物的分析, 揭示了九孔成鲍养殖环境中异养细菌的潜在致病能力, 发现: 就整体而言, 成鲍消化道菌株产大部分胞外物能力高于养殖水体的菌株。无论是消化道还是养殖水体, 均存在着分泌胞外产物能力极强的菌株, 而且大部分为鞘氨醇单胞菌。因此, 在该养殖环境中, 鞘氨醇单胞菌应视为一种主要的条件致病菌, 同时消化道和养殖水体均应视为潜在致病菌的源泉。

当然, 在我们的研究也表明了其它异养细菌也具有一定的致病潜能。已往研究表

明, 胞外毒力因子或致病因子对九孔鲍致病起着决定性作用<sup>[14,15]</sup>; 而环境条件变化导致的正常菌群比例失调也是发病的一个重要原因。因此, 我们在考虑细菌对水产养殖的致病作用时, 或许除了考虑某一优势细菌的致病力外, 也应从菌群结构的角度出发, 考虑整个细菌群落的胞外毒力因子的作用。

### 参 考 文 献

- [1] 王广军, 王 冠. 渔业现代化, 2005, 2: 23 ~ 25.
- [2] 牟海津, 刘志鸿. 中国水产科学, 2000, 7 (2): 93 ~ 95.
- [3] 储卫华, 陆承平. 南京农业大学学报, 2000, 23 (2): 80 ~ 84.
- [4] Ellis A E, Hastings T S, Munro A L S. Journal of Fish Diseases, 1981, 4: 41 ~ 51.
- [5] Ototake M, Wakabayashi H. Fish Pathology, 1985, 20: 167 ~ 171.
- [6] 顾继东, 范延臻. 应用与环境生物学报, 2001, 7 (6): 572 ~ 576.
- [7] 王 志, 蔡俊鹏, 徐 丽. 粮食与饲料工业, 2004, 5: 34 ~ 36.
- [8] 金 珊, 郑天伦, 王国良, 等. 中国兽医学报, 2004, 24 (5): 439 ~ 444.
- [9] Mourney A, Kilbertus G J. Appl Bacteriol, 1976, 40: 47 ~ 51.
- [10] Elston R. J Fish Dis, 1983, 6 (2): 111 ~ 128.
- [11] 于占国, 林凤翱, 贺 杰. 海洋学报, 1995, 17 (3): 85 ~ 91.
- [12] 李玉英, 李懂年, 余为一. 水利渔业, 2003, 23 (2): 67 ~ 69.
- [13] 江定丰, 李懂年, 余为一. 水利渔业, 2003, 23 (6): 51 ~ 54.
- [14] Baffone W, Citterio B, Vittoria E, et al. Food Microbiology, 2001, 18: 479 ~ 488.
- [15] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. The Lancet, 2003, 361: 743 ~ 749.