

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.05.003

大鲵源弗氏柠檬酸杆菌的 分离鉴定及胞外酶活性研究^①

曹朕娇, 丁诗华, 凌空, 金娟, 吴兴镇

西南大学 动物科技学院水产系/水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715

摘要: 为了确定重庆武隆大鲵养殖场患病大鲵的病原菌, 并进行菌种鉴定及胞外酶活性研究, 从具有典型症状的病鲵肝脏分离出一株菌株 TNL12, 根据形态学特征、生理生化特性及 16S rDNA 分析对菌株进行种类鉴定, 通过人工感染试验确定病原菌株的致病性, 利用平板法检测胞外酶活性。结果显示, 所获菌株为革兰氏阴性短杆菌, 无芽孢, 其生理生化特性与弗氏柠檬酸杆菌一致。16S rDNA 分析表明, TNL12 与弗氏柠檬酸杆菌的同源性为 99%, 在系统发育树上与弗氏柠檬酸杆菌聚为一支。该病原菌可引起健康青蛙、大鲵出现感染症状, 且感染症状与自然发病症状相似。胞外酶活性检测发现该菌可产卵磷脂酶、淀粉酶, 但不产脂酶、蛋白酶、明胶酶、脲酶等胞外酶。这些研究结果表明, 从患病大鲵中分离出的病原菌为弗氏柠檬酸杆菌, 且对大鲵有较强的致病性。

关键词: 大鲵; 弗氏柠檬酸杆菌; 分离鉴定; 胞外酶活性

中图分类号: S947.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0013-06

大鲵 *Andrias davidianus*, 又名娃娃鱼, 属两栖纲 Amphibia、有尾目 Caudata、隐鳃鲵科 Cryptobranchidae, 大鲵属 *Andrias*, 是国家二级保护水生野生动物, 具有较高的营养价值、药用价值及保健功效^[1]。野生大鲵常栖息于山势较高、水源丰富、水质清新的山溪洞穴中, 对水质的要求较高, 水源需符合我国人畜饮水标准^[2]。近 30 年来, 大鲵驯养繁殖技术已取得突破性进展, 大大促进了大鲵人工养殖的发展。然而, 随着养殖规模扩大和养殖管理不当, 大鲵病害频发的趋势日益明显, 严重危及大鲵养殖业的健康发展, 给养殖户造成严重的经济损失。目前, 有关大鲵病害的报道日益增多。已知的大鲵病害种类包括病毒性、细菌性、真菌性疾病及寄生虫病。其中, 细菌性疾病最为常见, 如腹水病、烂脚病、烂尾病、腐皮病、赤皮病等^[3-6]。迄今已对大鲵细菌性疾病的病原菌如嗜水气单胞菌、迟钝爱德华菌、荧光假单胞菌等进行了较详细的研究, 但是有关弗氏柠檬酸杆菌引起大鲵疾病的报道较少。因此, 研究大鲵病原菌如弗氏柠檬酸杆菌的生理特性对于大鲵病害的防治有重要意义。

本实验对重庆武隆大鲵养殖场的 9 只病鲵进行解剖, 在无菌条件下进行病原菌分离, 采用形态学观察、生理生化鉴定、16S rDNA 分析进行病原菌种类鉴定, 通过人工感染实验及胞外酶活性检测研究病原菌的致病性, 为相关大鲵疾病的防治提供一定的实验依据。

① 收稿日期: 2014-06-23

基金项目: 重庆市科委应用开发项目(CSTC2013yykf80006)。

作者简介: 曹朕娇(1989-), 女, 山西阳泉人, 硕士研究生, 主要从事水生生物病害防治研究。

通信作者: 丁诗华, 教授。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

弗氏柠檬酸杆菌标准株由本实验室保存. 病鲩和健康大鲩由重庆市武隆大鲩养殖场提供, 病鲩平均体质量为 250 g, 体表及腿部的皮肤腐烂, 腹部肿大, 食欲不振, 运动迟缓; 健康大鲩平均体质量为 120 g. 青蛙(平均体质量 30 g)购自重庆市北碚花鸟市场.

1.1.2 主要试剂

微生物生化反应管购自杭州微生物试剂有限公司, DNA 纯化试剂盒(DP214)购自天根生化科技(北京)有限公司, PCR 引物购自华大基因科技有限公司, dNTP Mix 购自 BioMart 公司, 注射器及其余试剂均购自滴水生物化学公司.

1.1.3 实验仪器

6325 型基因扩增仪、BIO-RAD Gel DOC™ 型凝胶成像仪、SmartSpec™ Plus 分光光度计、SANYO MDF-382E (N)型超低温冰箱、SANYO SIM-F140 型制冰机、TOMY SX-500 自动灭菌锅、FA2004A 电子分析天平、GP-01 型光照培养箱、SW-CJ-1CU 洁净工作台、MilliQ IQ5 超纯水系统.

1.2 方法

1.2.1 菌株观察

在无菌条件下, 将患病大鲩用 95% 的医用酒精进行体表消毒后解剖, 取出病鲩的心、肝、脾进行表面消毒, 用解剖刀切去表面并采样, 划线接种于 LB 平板, 37 °C 恒温培养 24 h 后, 取单菌落再次划线接种于 LB 平板, 得到纯培养物 TNL12, 保存于 4 °C 冰箱, 备用. 显微镜下观察该菌的形态特征, 革兰氏染色后镜检, 记录观察结果.

1.2.2 菌株生理生化鉴定

无菌条件下取纯培养菌接种于微生物生理生化反应管, 于 30 °C 光照培养 24~48 h, 按照生化反应管说明, 对该菌进行氧化酶、木糖、麦芽糖、山梨醇、鸟氨酸、木糖醇、蔗糖、葡萄糖产气、葡糖糖、尿素、七叶苷、枸橼酸盐等各项生理生化指标的测定, 并结合《伯杰氏细菌鉴定手册》分析结果.

1.2.3 16S rDNA 基因序列分析及系统发育树构建

DNA 提取按 DNA 纯化试剂盒(DP214)说明书进行, 将细菌 DNA 作为模板进行 PCR 实验. PCR 扩增体系 50 μ L: 模板 4 μ L, 引物 F, R 各 2 μ L, 2 \times Master Mix 25 μ L, ddH₂O 17 μ L; 反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环后, 延伸 10 min, 保持在 4 °C. 反应结束后, 在 1% 的琼脂凝胶中进行电泳, 将阳性 PCR 扩增产物送至北京华大基因有限公司测序. 所测序列在 NCBI 中进行 BLAST, 选取同源性较好的序列进行比对, 采用 MEGA 4.0 软件^[7]进行 N-J 法建树, 并进行 10 000 次的 Boos trap 来检测置信度.

1.2.4 人工感染实验

挑取单菌落接种于 25 mL 液体 LB 培养基中, 于 37 °C 摇瓶振荡(220 r/min)培养 24 h 后取少量培养液进行平板计数, 确定细菌总量. 离心收集菌体, 将细菌浓度稀释到 10⁸ cfu/mL. 将青蛙或大鲩随机分为实验组与对照组, 青蛙每组 10 只, 大鲩每组 5 只. 实验组注射 1 mL 菌液, 对照组注射 1 mL PBS, 每日观察并记录实验动物患病与死亡情况.

1.2.5 胞外酶活性检测

分别配制用于检测脂酶、蛋白酶、脲酶、淀粉酶、明胶酶、卵磷脂酶的鉴别培养基^[8-9]. 实验组在培养基上点种 TNL12, 对照组不接种致病菌, 测量并记录菌落及水解圈大小. 若有水解圈产生, 则为阳性反应, 且水解圈越大, 说明产酶能力越强; 反之, 为阴性反应^[10-12].

2 结 果

2.1 菌株形态特征

从病鲵肝脏分离出一株疑似病原菌株 TNL12, 其菌落为乳白色, 表面光滑呈凸起状, 菌落边缘较整齐. 经革兰氏染色镜检后发现该菌株呈短杆状, 为革兰氏染色阴性菌, 无芽孢及荚膜.

2.2 菌株生理生化鉴定

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》, 对 TNL12 菌株进行 22 项生理生化检测, 检测结果见表 1. TNL12 的各项生理生化特征与弗氏柠檬酸杆菌相符, 初步将其鉴定为弗氏柠檬酸杆菌.

表 1 菌株 TNL12 的生理生化鉴定结果

检测项目	弗氏柠檬酸杆菌	TNL12	检测项目	弗氏柠檬酸杆菌	TNL12
氧化酶	—	—	木糖	+	+
麦芽糖	+	+	山梨醇	+	+
鸟氨酸	—	—	木糖醇	—	—
蔗糖	+	+	葡萄糖产气	—	—
葡萄糖	+	+	葡萄糖酸盐	—	—
七叶苷	—	—	硫化氢	+	+
枸橼酸盐	+	+	赖氨酸	—	—
精氨酸脱羧酶	—	—	赖氨酸脱羧酶	—	—
阿拉伯糖	+	+	果糖	+	+
半乳糖	+	+	糊精	—	—
纤维二糖	—	—	氰化钾	+	+

注: “+”表示阳性, “—”表示阴性.

2.3 16S rDNA 序列分析及系统发育树构建

以 TNL12 菌株 DNA 为模板进行 16S rDNA 扩增, 引物采用 16S rDNA 通用引物^[13], 经电泳检测, 扩增产物(图 1)长度在 1 500 bp 左右. DNA 双向测序后, 得到序列长度为 1 426 bp, 与电泳检测结果一致. 将测序结果与 Genbank 中的序列进行比较, 发现 TNL12 菌株 16S rDNA 与弗氏柠檬酸杆菌标准株 (AB548577, DQ444289) 的同源性高达 99%. 选取弗氏柠檬酸杆菌和同源性较高的其他模式菌株 16S rDNA 部分序列构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 菌株 TNL12 与弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii* 属同一分支, 可初步确定 TNL12 为弗氏柠檬酸杆菌.

2.4 人工感染实验结果

用 TNL12 菌液注射青蛙 18 h 后, 出现发病症状, 腹部肿大, 白内障, 食欲不振, 轻微痉挛, 24 h 后开始出现死亡现象, 6 d 后全部死亡; 对照组死亡 1 只(经鉴定为物理损伤), 其余青蛙并未出现死亡现象. 大鲵在注射 12 h 后实验组同样出现腹部肿大、不摄食、不运动的现象, 8 d 后全部死亡; 对照组未出现死亡现象. 解剖患病濒死的青蛙及大鲵, 同样在肝脏分离出与 TNL12 形态特征及生理生化特征一致的菌株, 说明 TNL12 为致病菌.

2.5 菌株胞外酶活性检测结果

卵磷脂酶检测结果显示, 菌落平均直径达 8 mm, 水解圈平均直径为 17 mm, 说明此时卵磷脂已被酶解, 该菌可产生胞外卵磷脂酶. 但将 TNL12 菌株分别点种到脲酶培养基、脂酶培养基、脱脂奶粉培养基上, 未产生水解圈, 说明弗氏柠檬酸杆菌未产生脲酶、脂酶及蛋白酶. 将 TNL12 点种于淀粉培养基, 培养 48 h

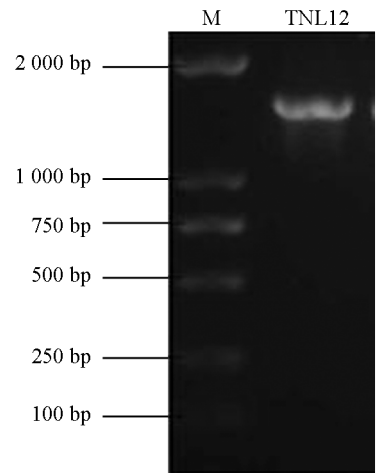


图 1 TNL12 PCR 图谱

后加入卢戈氏碘液^[14],可测得直径为 8 mm 的透明圈,表明该菌株可产淀粉酶.将 TNL12 穿刺接种到明胶培养基中,28 ℃ 培养 24 h 后放入 4 ℃ 冰箱过夜,明胶并未液化,表明该菌不产明胶酶.

将本实验分离鉴定的弗氏柠檬酸杆菌与其他实验中所报道的弗氏柠檬酸杆菌进行对比,发现不同物种中提取的菌株菌落大小特征不同,且产酶能力也有所不同^[13, 15].

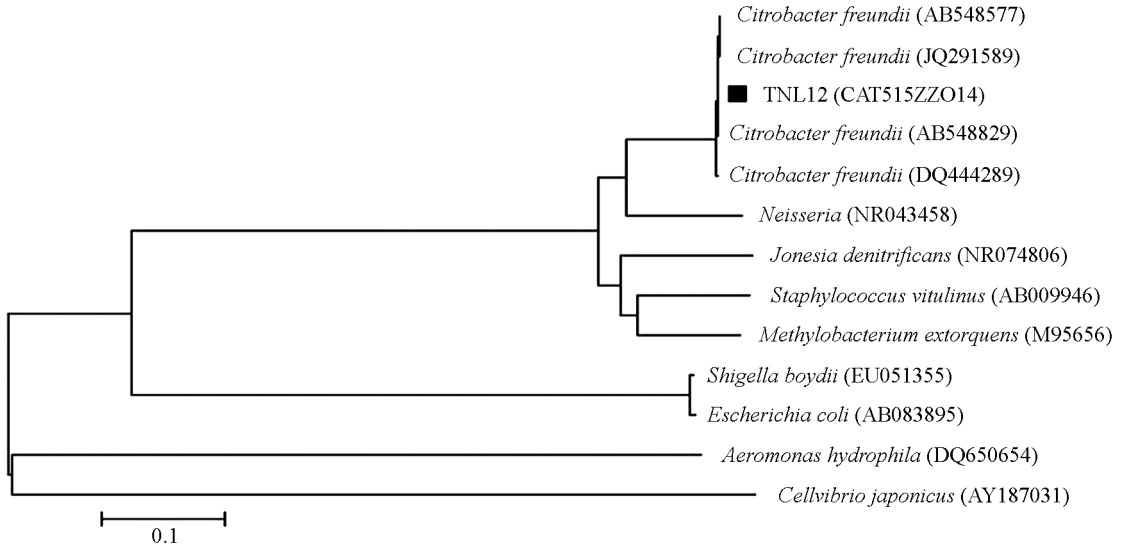


图 2 TNL12 系统发育树

3 讨论

通过细菌分离鉴定及人工感染实验,证实引起重庆武隆大鲵养殖场大鲵疾病的病原菌为弗氏柠檬酸杆菌.弗氏柠檬酸杆菌广泛分布于自然界中,孙洋等^[16]报道弗氏柠檬酸杆菌可致东北虎患出血性腹泻,刘广义^[17]于患者体内分离出 156 株弗氏柠檬酸杆菌等,说明该菌是人兽共患病原菌之一.近年来,关于弗氏柠檬酸杆菌引起水产动物患病的报道逐渐增多^[18-21],该病菌可导致鲫鱼、草鱼、斑马鱼、鲟鱼、中华鳖、红螯螯虾等患病^[22-27].目前有关弗氏柠檬酸杆菌引起大鲵疾病的报道相对较少,且在致病性方面存在一定的差异.高正勇等^[28]从湖北病鲵体内分离出弗氏柠檬酸杆菌并确认其致病性.然而,余波等^[29]从贵州贵定县养殖场病鲵中分离出嗜水气单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、柱状黄杆菌等 3 种细菌,并证实弗氏柠檬酸杆菌并非导致大鲵死亡的主要病因.此外,孟彦等^[4]从浙江一个大鲵养殖场病鲵中分离出弗氏柠檬酸杆菌等 4 种细菌,经研究未发现弗氏柠檬酸杆菌具有致病性.

本实验从病鲵肝脏中分离出弗氏柠檬酸杆菌,通过人工感染实验发现该菌株有较强的致病性.以 10^8 cfu/mL 的细菌注射量在试验期间可导致青蛙和大鲵出现 100% 的致死率,且人工感染症状与自然发病症状一致,即腹部肿大,表皮腐烂,食欲不振,行动迟缓,表明弗氏柠檬酸杆菌是引起大鲵患病的致病菌,其致病性较强,这与高正勇等^[28]的研究结果基本一致.弗氏柠檬酸杆菌在致病性方面存在差异的原因,可能与菌株来源不同有关,同时也可能与各自的研究方法、受试动物及感染方式不同相关.本研究采用腹腔注射方式,以青蛙、大鲵为受试动物而不是用鱼类、龟鳖进行细菌致病性检测,所获研究结果应当准确可靠.

已有研究表明,细菌的胞外产物与其致病性存在密切的关系.Thune 等^[30]发现嗜水气单胞菌产生的两种胞外酶对鲢鱼有致病性;许兵等^[31]从中国对虾病原菌的胞外产物中发现脂肪酶、卵磷脂酶、几丁质酶、淀粉酶等,并揭示这些酶与病原菌的致病性有关.本实验对弗氏柠檬酸杆菌的胞外酶活性进行分析,发现其具有卵磷脂酶和淀粉酶活性,但这些酶活性与弗氏柠檬酸杆菌的致病机制有何关系仍不清楚,有待进一步研究.本研究证实从患病大鲵中分离出的病原菌为弗氏柠檬酸杆菌,且对大鲵有较强的致病性,这为大鲵相关疾病的防治提供了一定的实验依据,对于有效防治大鲵疾病、降低大鲵养殖损失有重要意义.

参考文献:

- [1] 邹忠义,王海文,欧东升,等.大鲵尿液性激素水平季节变化及其与繁殖的关系[J].水生生态学杂志,2012,33(4):128-131.
- [2] 罗庆华,刘清波,刘英,等.野生大鲵繁殖洞穴生态环境的初步研究[J].动物学杂志,2007,42(3):114-119.
- [3] 许光轩.大鲵疾病防治技术[J].中国水产,2003,329(4):51-52.
- [4] 孟彦,曾令兵,杨焱清,等.大鲵腹水病原菌的分离与鉴定研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2009,37(3):77-81.
- [5] GENG Y, WANG K Y, ZHOU Z Y, et al. First Report of a Ranavirus Associated with Morbidity and Mortality in Farmed Chinese Giant Salamanders (*Andrias davidianus*) [J]. Journal of Comparative Pathology, 2011, 145(1): 95-102.
- [6] 陈云祥,陈新民.大鲵病害研究综述[J].渔业现代化,2006(5):25-27.
- [7] KOICHIRO T, JOEL D, MASATOSHI N, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [8] 黄秀梨,辛明秀.微生物学实验指导[M].2版.北京:高等教育出版社,2008.
- [9] 杨革.微生物学实验教程[M].2版.北京:科学出版社,2010.
- [10] 王宁,周晶,沙未来,等.南四湖河蟹养殖区气单胞菌的分离鉴定及胞外酶分析[J].畜牧与饲料科学,2013,34(3):5-7.
- [11] 欧林坚,黄邦钦,洪华生,等.海水中胞外酶及其与赤潮发生关系研究进展[J].应用生态学报,2003,14(7):1197-1199.
- [12] 魏静,徐耀波,陈怀辉.产纤溶活性酶凝结芽孢杆菌的分离鉴定及其酶活性质初探[J].西南大学学报(自然科学版),2009,31(3):90-93.
- [13] 陈翠珍,张晓君,房海,等.中华绒螯蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的鉴定[J].中国人兽共患病杂志,2006,22(2):136-141.
- [14] CHANG M Y, JUANG R S. Activities, Stabilities, and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan-Clay Composite Immobilized Enzymes [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(1): 75-82.
- [15] 阎斌伦,张晓君,梁利国,等.三疣梭子蟹病原弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及定居因子抗原基因检测[J].水产学报,2012,36(3):391-398.
- [16] 孙洋,郭学军,周博,等.东北虎出血性腹泻病原分离与鉴定[J].中国兽医杂志,2008,44(9):89-90.
- [17] 刘广义.156株弗氏柠檬酸杆菌感染的分布与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(14):3040-3041.
- [18] SATO N, YAMANE N, KAWAMURA T. Systemic *Citrobacter freundii* Infection among Sunfish *Mola Mola* in Matsushima Aquarium [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1982, 48(11): 1551-1557.
- [19] KARUNASAGAR I, PAI R. Systemic *Citrobacter Freundii* Infection in Common Carp, *Cyprinus Carpio* L, Fingerlings [J]. Journal of Fish Diseases, 1992, 15(1): 95-98.
- [20] TORANZO A E, CUTRÍN J M, ROBERSON B S, et al. Comparison of the Taxonomy, Serology, Drug Resistance Transfer, and Virulence of *Citrobacter Freundii* Strains from Mammals and Poikilothermic Hosts [J]. Applied and Environment Microbiology, 1994, 66(6): 1789-1797.
- [21] ASHISH K, NACHATAR S, ARUNA A, et al. The Antibiotic Resistance Pattern in *Citrobacter* Species: An Emerging Nosocomial Pathogen in a Tertiary Care Hospital [J]. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2012, 6(4): 642-644.
- [22] 王利,魏勇.鲫鱼弗氏柠檬酸杆菌的鉴定及系统发育分析[J].水产科学,2012,31(8):481-484.
- [23] 胡秀彩,王艺,吕爱军.弗氏柠檬酸杆菌的分离鉴定与PCR-SSCP分析[J].微生物学杂志,2011,31(4):12-18.
- [24] 吕爱军,胡秀彩,朱静榕,等.弗氏柠檬酸杆菌感染诱导斑马鱼皮肤免疫相关基因的差异表达[J].水产学报,2012,36(3):359-366.
- [25] 杨移斌,夏永涛,赵蕾,等.鲟源弗氏柠檬酸杆菌分离鉴定及药敏特性研究[J].水生生物学报,2013,37(4):

766—771.

- [26] 林启存, 朱丽敏, 李忠全, 等. 中华鳖弗氏柠檬酸杆菌败血症病原分离鉴定与药敏试验 [J]. 水产科学, 2008, 27(1): 42—43.
- [27] 沈锦玉, 顾志敏, 潘晓艺, 等. 红螯螯虾弗氏柠檬酸杆菌病原的分离与鉴定 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 197—200.
- [28] 高正勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 患病大鲵中弗氏柠檬酸杆菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 169—176.
- [29] 余波, 徐景娥, 谭诗文, 等. 大鲵细菌性败血症病原的分离鉴定与药敏特性 [J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(1): 30—31.
- [30] THUNE R L, GRAHAM T E. Extracellular Proteases from *Aeromonas Hydrophila*: Partial Purification and Effects on Age-0 Channel Catfish [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1982, 111(6): 749—754.
- [31] 许兵, 纪伟尚, 徐怀恕, 等. 中国对虾病原菌及其致病机理的研究 [J]. 海洋学报, 1993, 15(1): 98—106.

The Isolation, Identification and Extracellular Enzyme Analysis of a Pathogen from Diseased Giant Salamander

CAO Zhen-jiao, DING Shi-hua, LING Kong,
JIN Juan, WU Xing-zhen

Department of Fishery Science, School of Animal Science and Technology/

Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To isolate the pathogen of diseased giant salamander *Andrias davidianus*, identify the bacteria species, and determined its several extracellular enzymatic activities, a bacteria stain (TNL12) was separated from the liver of diseased individuals. The morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence were analyzed for species identification. Its pathogenicity was tested by artificial infection. The extracellular enzymatic activities were detected by plate method. The results showed that the bacteria strain was Gram-negative short bacillus without spores, and the physiological and biochemical characteristics were consistent with *Citrobacter freundii*. Its 16S rDNA sequence shared high homology of 99% with *Citrobacter freundii*, and was in the same cluster as *Citrobacter freundii* on the phylogenetic tree. Artificial infection with the bacteria to healthy frog and giant salamander induced the same diseased symptoms as occurred naturally. The pathogen produced lecithinase and amylase, but no activity of lipases, proteases, gelatinase, and urease were detected. In conclusion, the bacteria stain isolated from diseased giant salamander was *Citrobacter freundii*, which showed strong pathogenicity to giant salamander.

Key words: *Andrias davidianus*; *Citrobacter freundii*; separation and identification; extracellular enzyme analysis

