

文章编号: 1000-0615(2003)05-0468-06

蟹源拟态弧菌最佳产毒条件的筛选

李玉英, 李槿年, 余为一

(安徽农业大学畜牧水产学院, 安徽合肥 230036)

摘要:通过体外试验,探讨了培养条件的改变对蟹源拟态弧菌(HX-4)产毒量的影响。结果表明,培养基种类、氯化钠浓度、初始 pH、溶解氧、培养温度和时间不同均可影响细菌产毒量, HX-4 菌株的最佳产毒条件为细菌接种于起始 pH 为 8.0, 含 0.5% NaCl-BHI 培养基, 28℃ 振荡培养 36h 或静置培养 48h。同时,通过动物实验测定了外毒素的致病性,结果显示,外毒素粗提液对小鼠及河蟹均有致病性。粗提液的溶血活性越高,对动物的致死率也越高。具有蛋白酶活性而无溶血素活性的粗提液,对动物只有致病性,而无致死性。

关键词:中华绒螯蟹; 拟态弧菌; 最佳产毒条件; 筛选

中图分类号: S917.1 文献标识码: A

Selection of optimal producing condition of the exotoxin of *Vibrio mimicus* from *Eriocheir sinensis*

LI Yu-ying, LI Jin-nian, YU Wei-yi

(College of Husbandry and Fisheries, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Regulations of cultural conditions on the exotoxin expression of *Vibrio mimicus* HX-4 from *Eriocheir sinensis* have been studied *in vitro*. Through measuring hemolytic and proteolytic activities of crude exotoxin in different cultural conditions. The results demonstrated that different media, NaCl percent, initial pH, soluble oxygen, cultural temperature and time all effected on the exotoxin production. The optimal conditions of the exotoxin expression are that the HX-4 strain is inoculated in 0.5% NaCl-BHI with initial pH 8.0 at 28℃ for 36h in shaking cultivation or 48h in stationary cultivation. The pathogenic experiments of the crude exotoxin to mice and *Eriocheir sinensis* also have been finished. The results showed that the crude exotoxin is pathogenic to both of experimental animals, the higher the hemolytic titer of crude exotoxin is, the higher its lethal rate to experimental animals is. The crude solution of exotoxin with protease and no hemolysin has pathogenicity, but no lethality to experimental animals.

Key words: *Eriocheir sinensis*; *Vibrio mimicus*; optimal condition of producing exotoxin; selection

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是弧菌属 5 种主要病原菌之一, 不仅能引起人类的腹泻、中耳炎和外伤感染, 而且能引起水产动物弧菌病^[1]。1998 年以来安徽省某河蟹养殖场多次暴发弧菌病, 导致巨大经济损失。我们从疫区病蟹体内分离鉴定到 1 株致病性拟态弧菌(HX-4)。经初步研究, 该菌在生长繁殖过程中可产生、分泌外毒素, 并且外毒素具有溶血素和蛋白酶活性^[2]。本试验观察了细菌培养条件对其

收稿日期: 2002-07-16

资助项目: 安徽省自然科学基金资助项目(01041206), 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2001KJ071)

作者简介: 李玉英(1969-), 女, 河南南召人, 硕士, 主从事动物微生物学研究。现在工作单位为河南省南阳师范学院生命科学系。

通讯作者: 李槿年(1962-), 女, 安徽合肥人, 教授, 硕士, 主从事动物微生物学教学及研究。Tel: 0551-5118835

产毒能力的影响,旨在筛选出该菌的最佳产毒条件,以进一步提纯外毒素、研究外毒素的生物学特性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

蟹源拟态弧菌 HX-4 菌株由本实验室分离鉴定;嗜水气单胞菌标准 J-1 株由南京农业大学兽医微生物组惠赠;金黄色葡萄球菌标准株和八叠球菌标准株均购自中科院微生物研究所。普通营养肉汤(NB)、碱性蛋白胨水(APW)、产毒培养基(Syncase)、5%兔鲜血平板、普通营养琼脂、LB培养基和10%脱脂乳琼脂培养基配制参考文献[3]的方法;脑心浸液肉汤(BHI)购自哈尔滨海峡生物制品中心。

小鼠(每只18~22g)购自安徽医科大学动物中心;中华绒螯蟹(每只45g)购自合肥某农贸市场。

1.2 方 法

1.2.1 培养基对细菌产毒量的影响

HX-4 菌株接种于普通琼脂平板,28℃培养24h,挑单个菌落分别接种5mL pH8.0 NB、APW、LB、BHI和Syncase培养液内,28℃增菌18h。再按1%量转种至对应培养液中,28℃培养48h。细菌培养液 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20min后,经0.22 μm 微孔滤膜过滤获得外毒素粗提液。测定粗提液的溶血活性和蛋白酶活性,通过其溶血价和蛋白水解环直径间接反映细菌产毒量的高低。

1.2.2 培养温度对细菌产毒量的影响

HX-4 菌株接种于普通琼脂平板,28℃培养24h。挑单个菌落于5mL pH8.0 BHI中,分别于4℃、20℃、28℃和36℃培养18h后,再按1%量转种至10mL pH8.0 BHI中,置对应温度下培养48h。其余步骤同1.2.1。

1.2.3 培养时间对细菌产毒量的影响

HX-4 菌株接种于普通琼脂平板,28℃培养24h。挑单个菌落接种5mL pH8.0 BHI中,于28℃增菌18h后,再按1%量转种至10mL pH8.0 BHI中,于28℃分别培养12h、18h、24h、36h、48h和72h。其余步骤同1.2.1。

1.2.4 培养基初始 pH 对细菌产毒量的影响

HX-4 菌株接种于普通琼脂平板,28℃培养24h。挑单个菌落于5mL pH分别为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0的BHI中,28℃增菌18h,再按1%量转种至10mL对应BHI中,28℃培养48h。其余步骤同1.2.1。

1.2.5 溶解氧对细菌产毒量的影响

HX-4 菌株接种于普通琼脂平板,28℃培养24h。挑单个菌落接种5mL pH8.0 BHI中于28℃增菌18h后,再按1%量转种至10mL pH8.0 BHI中,分别进行静置培养、振荡培养($200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)和厌氧培养。其余步骤同1.2.1。同时测定了3种不同振荡时间(24h、36h和48h)对细菌产毒量的影响。

1.2.6 氯化钠浓度对细菌产毒量的影响

HX-4 菌株接种于普通琼脂平板,28℃培养24h。挑单个菌落接种5mL含氯化钠浓度分别为0、0.5%、1%、3%、6%的pH8.0 BHI中,28℃增菌18h后,再按1%量转种至10mL对应盐度的pH8.0 BHI中,28℃培养48h。其余步骤同1.2.1。

1.2.7 外毒素的蛋白酶活性测定

采用琼脂平板扩散法^[4]。10%脱脂乳琼脂平板置37℃培养箱过夜去除表面水份后,打孔(孔径为7mm)并用无菌0.5%琼脂补底。取50 μL 粗提液加入孔内后,平板置湿盒内28℃作用18h。取出平板,滴加10%三氯乙酸溶液以终止反应,观察孔四周有无透明蛋白水解环,并测其直径(diameter of the proteolytic halo, PrD)。同时,设嗜水气单胞菌J-1株阳性对照及八叠球菌阴性对照。

1.2.8 外毒素的溶血性测定

采用琼脂平板扩散法^[4]进行定性测定。5%兔鲜血琼脂平板打孔、补底后,取50μL粗提液加入孔内,平板置湿盒内28℃作用18~24h,观察是否出现溶血环。同时设金黄色葡萄球菌阳性对照及八叠球菌阴性对照。采用微量板法^[5]进行定量测定。用无菌生理盐水将粗提液在96孔微量反应板上倍比稀释,然后每孔加入等体积1%小鼠红细胞悬液,振荡混匀后,置37℃作用1h,再于4℃冰箱内过夜,观察其有无溶血现象及溶血价,以使50%红细胞溶解的粗提液的最高稀释度为其溶血价(hemolytic titer, HT)。

1.2.9 外毒素对动物的致病性试验

外毒素对小鼠的致病性试验。HX-4菌株接种于pH8.0,0.5%NaCl-BHI中,分别置4℃和28℃静置培养48h。培养液 $10\ 000r\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20min,微孔滤膜过滤后获得无菌外毒素粗提液。将实验小鼠分为6组,每组5只,分别腹腔注射28℃培养条件获得的外毒素粗提液、1:2、1:4、1:8稀释粗提液、4℃粗提原液和无菌生理盐水,注射量为每只0.4mL,注射后正常饲养7d。死亡小鼠剖检后,无菌采取脏器接于普通琼脂培养基,观察有无HX-4菌株生长。外毒素对中华绒螯蟹的致病性试验。将中华绒螯蟹分为3组,于第三步足基部分别注射28℃外毒素粗提液、4℃外毒素粗提液及无菌生理水,注射量为每只0.3mL,注射后放于水族箱内正常饲养7d。死亡中华绒螯蟹剖检后,无菌采取脏器接种普通琼脂培养基,观察有无HX-4菌株生长。

2 结果

2.1 培养基对细菌产毒量的影响

不同培养基对细菌产毒量的影响见表1。5种培养基的产毒效果依次为: BHI > Syncase > LB > APW、NB。细菌在BHI培养基中产毒量最高,其粗提液的HT较NB-粗提液和APW-粗提液的HT高32倍,蛋白水解环直径也较使用其它4种培养基获得的粗提液大,但差异不显著。

表1 培养基对细菌产毒量的影响

Tab.1 Effect of different media on the exotoxin production of HX-4 strain

培养基 media	溶血价 HT	蛋白水解环直径(mm) PrD
脑心浸液 BHI	1:128	22
产毒培养基 syncase	1:64	19
LB培养基 LB medium	1:32	18
营养肉汤 NB	1:4	16
碱性蛋白胨水 APW	1:4	18

2.2 培养温度对细菌产毒量的影响

不同培养温度对细菌产毒量的影响情况见图1。综合考虑粗提液的HT和PrD指标,细菌在4℃的产毒量最低,其粗提液无溶血活性,蛋白水解环直径也较其它温度组小得多。随着培养温度升高,细菌产毒量逐渐增加,至28℃达到高峰(HT为 2^{-8} ; PrD为28mm)。此后产毒量开始下降。

2.3 培养时间对细菌产毒量的影响

在12h~48h之间随着培养时间延长,产毒量逐渐增加,至48h达到高峰(HT为 2^{-10} ; PrD为28mm),随后开始迅速下降(图2)。

2.4 培养基初始pH对细菌产毒量的影响

培养基的不同初始pH对细菌产毒量的影响见图3。细菌在初始pH6.5培养基中的产毒量最低,其粗提液无溶血活性,蛋白水解环直径(PrD=10mm)也较其它试验组低。随着初始pH值升高,细菌产毒量逐渐增加,至pH8.0达到高峰(HT= 2^{-8} ; PrD=30mm),培养基初始pH超过8.0以后,细菌的产毒量又开始下降。表明酸性环境和过碱环境均不利于HX-4菌株产生外毒素。

2.5 溶解氧对细菌产毒量的影响

振荡培养组的产毒量明显高于静置培养组和厌氧培养组,其粗提液的HT高达 $1:2^{10}$,蛋白水解环直

径(26mm)也较其它两组大,但差异不显著(图4)。静置培养组的产毒量又高于厌氧培养组,后者的粗提液无溶血素活性。表明HX-4株菌生长过程需要氧气,氧气越充足,产毒量越高。另外,在三种不同振荡培养时间中24h的产毒量较低,36h和48h的产毒量无明显差异。

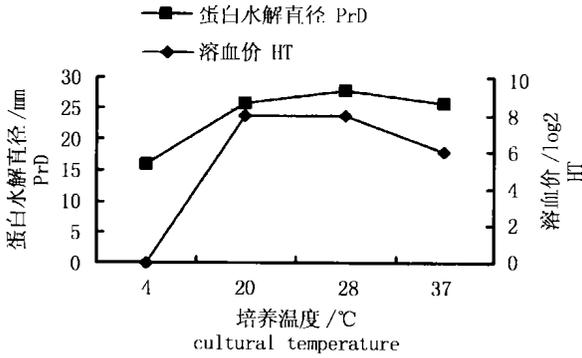


图1 培养温度对细菌产毒量的影响

Fig.1 Effect of different cultural temperatures on the exotoxin production of HX-4 strain

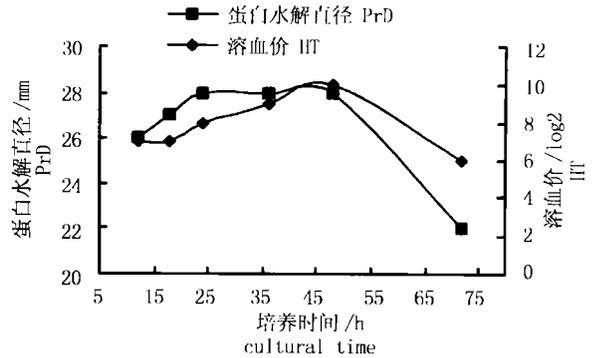


图2 培养时间对细菌产毒量的影响

Fig.2 Effect of different cultural times on the exotoxin production of HX-4 strain

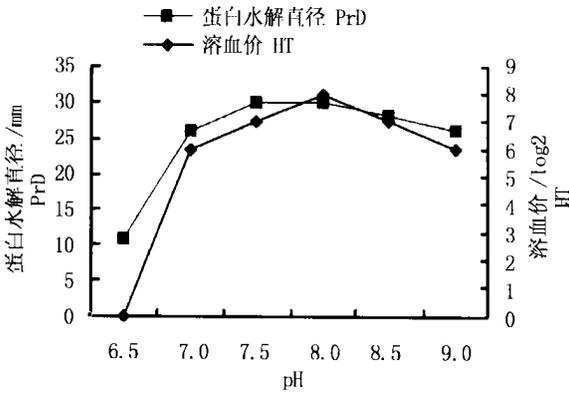


图3 培养基初始 pH 对细菌产毒量的影响

Fig.3 Effect of different initial pH of media on the exotoxin production of HX-4 strain

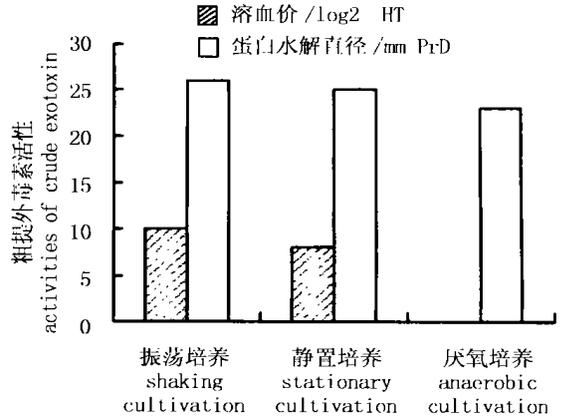


图4 溶解氧对细菌产毒量的影响

Fig.4 Effect of soluble oxygen on the exotoxin production of HX-4 strain

2.6 氯化钠浓度对细菌产毒量的影响

细菌培养在 0.5% NaCl- BHI 中产毒量最高(图5),粗提液的 HT 为 2^{-10} ,蛋白水解环直径为 29mm;细菌在含 0%、1%和 3% NaCl- BHI 中产毒量次之,且三者间无明显差异。细菌在 6% NaCl- BHI 中的产毒量最低,粗提液无溶血活性,蛋白水解环直径为 25mm。

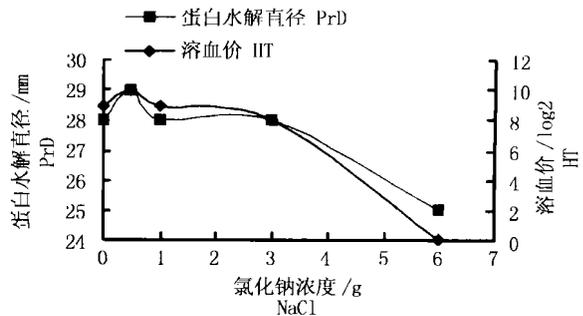


图5 氯化钠浓度对细菌产毒量的影响

Fig.5 Effect of NaCl percent of media on the exotoxin production of HX-4 strain

2.7 外毒素的蛋白酶活性

滴加三氯乙酸后,在嗜水气单胞菌阳性对照孔及HX-4菌株粗提液孔四周均出现了无色透明水解环(图6),而八叠球菌阴性对照孔四周无水解环。

2.8 外毒素的溶血素活性

在金黄色葡萄球菌阳性对照孔及HX-4菌株粗提液孔四周均出现了无色透明溶血环(图7),而八叠球菌阴性对照四周无溶血环。

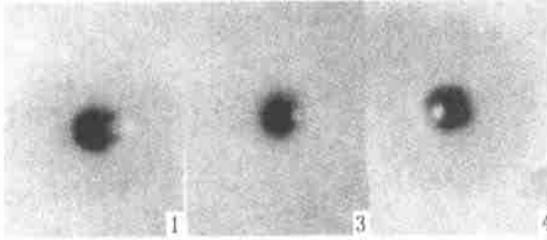


图6 HX-4菌株外毒素粗提液的蛋白酶活性

Fig. 6 Proteolytic activity of the crude exotoxin of HX-4 strain

1. 嗜水气单胞菌; 2. 八叠球菌; 3. 拟态弧菌 HX-4
1. *Ah J-1*; 2. *Sarcina*; 3. *Vm HX-4*

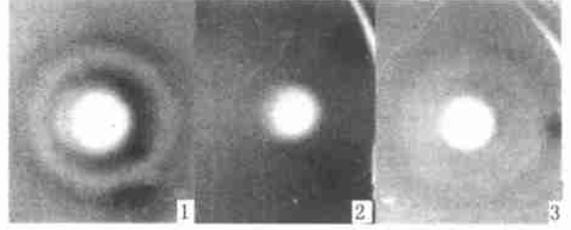


图7 HX-4菌株外毒素粗提液的溶血活性

Fig. 7 Hemolytic activity of the crude exotoxin of HX-4 strain

1. 金黄色葡萄球菌; 2. 八叠球菌; 3. 拟态弧菌 HX-4
1. *Staphylococcus aureus*; 2. *Sarcina*; 3. *Vm HX-4*

2.9 外毒素对实验动物的致病性

由表2可见28℃外毒素粗提原液及1:2稀释液在6~8h内引起100%实验小鼠及中华绒螯蟹死亡;1:4稀释粗提液在20h内引起40%实验小鼠死亡;28℃1:8稀释粗提液和4℃粗提原液注射组动物虽表现出精神不佳、不吃等症状,但未发生死亡;对照组动物于7d内全部健活。剖检死亡小鼠可见肠管积液,管壁变薄,有出血点;肝脏上也有出血点。剖检死亡中华绒螯蟹可见腹腔内大量腹水,心脏肿大,临死前反应迟钝等病症。从死亡的小鼠和中华绒螯蟹体内均未分离到HX-4菌株。

表2 外毒素对小鼠、中华绒螯蟹的致病性试验结果

Tab. 2 Results of the pathogenic experiments of exotoxin of HX-4 strain to mice and *Eriocheir sinensis*

组别 groups	溶血价 HT	蛋白水解直径(mm) PrD	小鼠(5 ind) mice		河蟹(5 ind) <i>E. sinensis</i>	
			发病率(%) pathogenic rate	致死率(%) lethal rate	发病率(%) pathogenic rate	致死率(%) lethal rate
粗提原液 crude exotoxin at 28℃	1: 256	25	100	100	100	100
1: 2 粗提液 1: 2 crude exotoxin	1: 128	25	100	100	N	N
1: 4 粗提液 1: 4 crude exotoxin	1: 64	23	100	40	N	N
1: 8 粗提液 1: 8 crude exotoxin	1: 32	23	100	0	N	N
4℃粗提原液 crude exotoxin at 4℃	0	19	100	0	100	0
对照组 control	0	0	0	0	0	0

注: N 表示该稀释度未做中华绒螯蟹致病性试验

Note: N indicates that the pathogenic experiment to *E. sinensis* is not done with this dilution

3 讨论

目前,已知致病性拟态弧菌在生长繁殖过程中产生、分泌的外毒素是其主要毒力因子。我们从发病中华绒螯蟹体内分离鉴定到 1 株拟态弧菌(HX-4 菌株),经检测该菌产生的外毒素具有溶血素和蛋白酶活性。小鼠和中华绒螯蟹动物实验显示外毒素粗提液的溶血活性越高(HT 1: 64~ 1: 256),其对动物的致死率也越高(40%~ 100%)。具有蛋白酶活性而无溶血素活性的 4℃外毒素粗提液,对动物具有致病性,但无致死性。由此初步认为外毒素主要通过溶血素致病,至于该菌外毒素中是只含有 1 种致病因子,并且该因子同时具有溶血活性及蛋白酶活性,还是同时含有 2 种或更多致病因子,尚需进一步研究。

在不同培养条件下培养 HX-4 菌株,通过测定该菌外毒素的溶血素和蛋白酶活性,探讨不同培养基种类、氯化钠浓度、初始 pH、溶解氧、培养温度和时间对细菌产毒量的影响。结果表明,培养条件的改变对细菌产毒量的影响很大,HX-4 菌株的最佳产毒条件为:细菌接种于起始 pH 为 8.0,含 0.5% NaCl - BHI 培养基,28℃振荡培养 36h 或静置培养 48h。

虽然,体外试验不能完全反映自然条件下的真实情况,但本试验筛选出了 HX-4 菌株的最佳产毒条件,为进一步提纯外毒素、研究外毒素生物学特性奠定了基础,也为开展合理的防治研究提供了新思路。

参考文献

- [1] Shandl W X, Johnston J M, Davis B R, et al. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized vibrio species-clinical characteristics and epilemiology[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1983, 99: 167- 171.
- [2] Li J J, Yu W Y, Jiang D F, et al. Numerial identification and characterization of pathogenic *Vibrio mimicus* isolated from *Eriocheir sinensis* [J]. *Chin J Vet Sci*, 2002, 22(3): 231- 233. [李權年, 余为一, 江定丰, 等. 蟹源致病性拟态弧菌的编码鉴定及其特性分析[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(3): 231- 233.]
- [3] Chen T S. Make and application of microbic media[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1995. 179- 413. [陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 179- 413.]
- [4] Li H R, Chen H Q, Lu C P. Purification and properties of extracellular protease produced by *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 1996, 19(3): 88- 94. [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.]
- [5] Liao Y X. Diagnostic manual of veterinary microbe in laboratory[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1991. 106. [廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1991. 106.]