doi: 10.7541/2019.069

养殖中华鳖蜡样芽孢杆菌的分离、鉴定和致病性研究

孟庆珍¹ 尹 飞¹ 傅超英¹ 陈 凡² 刘长军³ 袁 m^1 王 D^2 张鸿鹄¹ 钱 冬¹

(1. 宁波大学海洋学院, 宁波 315000; 2. 浙江省杭州市水产技术推广总站, 杭州 310000;3. 浙江省象山县海洋与渔业局, 象山 315711)

摘要:2016年夏杭州某中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)养殖场出现大量发病,病鳖呈厌食、反应迟钝、四肢无力、 池边独游、濒死前不停摇头等病症,死亡率20%以上。用营养琼脂从典型症状濒死中华鳖分离到革兰阳性短 杆状,芽孢近中生或中生的分菌株; API 50 CHB对分离菌株T91-1鉴定结果显示与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)参考菌株ATCC 14579 97.4%相似; T91-116S rDNA和gyrB基因序列与ATCC 14579相似度为99%,确认 T91-1为蜡样芽孢杆菌。T91-1在羊血平板呈典型β溶血,牛奶平板上出现明显透明圈,表明存在溶血性和胞外 蛋白酶类毒素。用T91-1肌肉注射感染健康中华鳖*LD*50为4.91×10⁵CFU/ind.,死亡鳖出现与自然发病鳖类似症 状;感染发病中华鳖血和肝印/涂片瑞氏-姬姆萨染色可见组织间隙有大量芽孢杆菌。自然发病鳖肾、肝、 肺、心病理切片可见大量芽孢杆菌,病鳖血管扩张充血,嗜酸性粒细胞浸润。T91-1灌胃ICR乳鼠3d后可全部 死亡,死亡鼠呈皮下出血等症状; T91-1腹腔注射和灌胃ICR 4周龄小鼠12—24h可出现迟钝、厌食等症状,1周 内未出现死亡。上述结果表明蜡样芽孢杆菌对中华鳖有很强毒力,对小鼠有较强肠毒性,是引起本次杭州中 华鳖暴发性疾病的病原。

关键词:中华鳖;蜡样芽孢杆菌;鉴定;致病性 中图分类号: S947.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2019)03-0570-09

中华鳖(Pelodiscus sinensis), 俗称甲鱼等, 属爬 行纲(Reptilia)、龟鳖目(Testudinata)、鳖科(Tironychidae)、鳖属(Pelodiscus), 我国除西藏、青海、 新疆外其他各省均有分布^[1]。目前我国中华鳖主要 养殖区域为长江中下游地区及南方省份。中华鳖 营养丰富、风味独特, 民间认为具有滋补功效, 经 济价值较高, 特别是各类龟鳖免疫制品受到广大消 费者喜爱。新型优良品种和配套养殖模式极大促 进了中华鳖养殖业的迅速发展^[2]。我国2015年中华 鳖总产量3.413×10⁸ kg, 主要分布在浙江、广东、 湖北、江苏、江西、广西、安徽等地, 浙江省中华 鳖养殖产量占全国总产量50%左右, 是全国最大的 中华鳖养殖省。随着人工养殖中华鳖规模和养殖 密度不断提高, 养殖病害发生逐渐频繁^[3]。迄今为 止己报道30多种中华鳖疾病^[4], 先后分离报道了嗜 水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[5]、迟缓爱德华 氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[6]、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)^[7]、摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)^[8]等细菌病原。近年来, 还报道了由芽孢杆 菌引起的养殖中华鳖疾病^[3,9]。

2016年6—7月,杭州富阳某养殖场中华鳖大量 死亡,体重500g以上成鳖日死亡率20%以上,严重 时日死亡100只以上,造成极大的经济损失。典型 症状是患病中华鳖游至岸边,不断上下摇头而亡; 解剖后发现腮腺严重充血、肝脾肿大、肠系膜充 血。为尽快明确发病原因,本研究从濒死中华鳖中 分离到芽孢杆菌,经菌体形态、生化性状和16S rDNA和gyrB基因序列分析和系统发育树对菌株进

收稿日期: 2018-05-11;修订日期: 2018-10-21

基金项目: 浙江省基础公益项目(2013C32057); 浙江省水生动物疫病团队项目(SY201805和SY201905)资助 [Supported by the Zhejiang Provincial Basic Public Interest Project (2013C32057); Zhejiang Provincial Aquatic Animal Disease Team Project (SY201805, SY201905)]

作者简介: 孟庆珍(1992—), 女, 安徽安庆人; 在读硕士研究生; 主要从事水产动物病害防控。E-mail: 1291538849@qq.com

通信作者: 钱冬(1963—), 男, 浙江嵊州人; 研究员; 主要从事水产动物病害防控。E-mail: qiandong@nbu.edu.cn

行了鉴定,研究了分离菌株的致病性。

1 材料与方法

1.1 材料

发病中华鳖来自杭州市某养殖场,该场单养中华 鳖,养殖总面积0.03 km²,养殖池平均面积666.67 m², 放养中华鳖约1只/m²(规格250 g)。健康中华鳖 (200±2) g购自浙江宁波张斌桥市场,室温 (27±0.5)℃暂养7d无异常后用于感染实验。4周龄 小鼠(18±2) g和乳鼠(3.3±0.1) g由宁波大学实验动 物中心提供。

细菌鉴定采用生物梅里埃API 50 CHB快速生 化鉴定条,购自杭州怡丹生物技术有限公司、实验 用营养琼脂、LB、10%脱纤维羊血琼脂平板购自 北京陆桥技术股份有限公司,牛奶琼脂平板为实验 室自配^[10],芽孢染色液购自杭州滨和微生物试剂有 限公司,瑞氏-姬姆萨染液购自珠海贝索生物技术 有限公司、基因组DNA提取试剂盒和p-EASY-T1 Cloning试剂盒购自全式金生物科技有限公司、 *Taq*DNA聚合酶和2×mix购自康为世纪生物科技有 公司。

1.2 方法

病样采集 调查养殖场中华鳖发病时养殖 模式和疾病情况,了解发病率及死亡率。查看濒死 中华鳖发病症状,解剖观察,取发病中华鳖血、肝 涂片,用瑞氏-姬姆萨染色,具体方法见参考文献[11]。

分离菌株回归感染 取典型症状的濒死中 华鳖,75%酒精体表消毒,从血、肝、脾、肺、肾 分离细菌,分别接种于营养琼脂28℃,培养18h,挑 取纯化优势菌株无菌生理盐水重悬至溶度为4 Mc-Farland。用无菌生理盐水稀释至1.2×10⁸、1.2×10⁷、 1.2×10⁶ CFU/mL,肌肉注射感染暂养1周的健康中 华鳖,每只注射0.1 mL,对照注射相同量的无菌生 理盐水,注射后饲养于140 L水族箱中,每箱养殖 13只,养殖水深为10—15 cm,水温(27±0.5)℃;试验 期间,每天用喷壶喷水3—4次,以保持中华鳖身表 湿润,每天观察发病、死亡情况。

细菌的分离和纯化 根据回归实验结果,将 感染症状与自然发病症状相似的菌株接种于营养 琼脂,28℃培养18h,菌株编码为T91-1,用含30%甘 油的营养肉汤保存于-80℃冰箱备用。

分离菌株T91-1的形态观察 T91-1菌株在 营养琼脂平板上28℃培养18h,观察菌落形态;并用 生理盐水制取菌悬液做芽孢染色;取新鲜纯培养的 直径约1 mm菌落,制作切片,染色,H-7500透射电 镜观察芽孢的形态,具体方法见参考文献[12]。

T91-1菌株生理生化鉴定 挑取营养琼脂平 板28℃培养18h的T91-1菌落,制成溶度为 6×10⁸CFU/mL的菌悬液,接种到API 50 CHB试剂 条,28℃下培养 24h,观察颜色变化。同时T91-1接 种10%脱纤维羊血琼脂培养基和脱脂牛奶培养基 上,28℃培养18h,观察溶血和蛋白酶活力。

基因扩增、转化和序列分析 T91-1 菌株接 种至营养琼脂中培养过夜(28℃),挑取单菌落在 200 µL的去离子水中重悬, 100℃水浴10min, 冰浴 5min, 12000 r/min离心5min, 取上清备用。16S rDNA PCR扩增引物为: 27F 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'/1492R 5'-GGCTACCTTGTTAC GACTT-3'。50 µLPCR反应体系: 27F、1492R引物 (10 µmol/L) 各1 µL, 2×mix 25 µL, 双蒸水补足体积, PCR扩增条件: 94℃预变性 2min; 94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃延伸 7min; PCR扩增产物1%琼脂糖电泳分离后回收纯化 PCR产物, 纯化16S rDNAPCR产物经p-EASY-T1 Cloning试剂盒导入大肠杆菌DH 5α中,从含氨苄青 霉素LB培养基上挑取单一白斑菌落,提取质粒送 华大基因测序。

将所得序列与GenBank中的核酸序列同源性 序列比对分析,选取与菌体T91-1相似性较高的细 菌16S rDNA序列,使用MAGE软件,采用邻接法 (Neighbor-joining)获系统发育树,自展数据集为 1000次。

GyrB基因扩增和序列分析 同上制备 DNA模板, GyrB基因PCR扩增引物序列和反应条件 见参考文献[13, 14]。GyrB基因PCR扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后用试剂盒回收纯化 PCR产物,送华大基因测序。

T91-1对小鼠的毒力将90只健康的小鼠 (18±2)g随机分成十组(每组9只)。同上文方法制备 T91-1菌悬液,以1.5×10⁸、1.5×10⁷、1.5×10⁶和 1.5×10⁵CFU/mL小鼠腹腔注射和灌胃,每只感染 0.1 mL,对照组注射和灌胃等量无菌生理盐水;每 天观察发病、死亡情况。同时,将36只健康的乳鼠 随机分成4组(每组9只),以1.2×10⁸、1.2×10⁷、 1.2×10⁶CFU/mL浓度分别对每组乳鼠灌胃,每只注 射 0.1 mL,对照组灌胃等量的无菌生理盐水,并观 察发病、死亡情况。

组织病理观察 自然发病濒死中华鳖的组织样品分别用波恩氏液浸泡1h,固定的组织用70%乙醇洗至无色,用70%—100%的乙醇逐级脱水,用石蜡包埋,切片,HE染色,在显微镜下观察。

2 结果

2.1 患病症状及解剖观察

患病中华鳖发病初期四肢无力,厌食,反应迟钝,游至岸边,竖起身体,不断上下摇头而亡(图版 I-1);解剖中华鳖腮腺严重充血(图版 I-3),脾脏 肿大,呈暗紫色(图版 I-5),肠系膜出血(图版 I-7)。瑞氏-姬姆萨染色结果如图,自然发病濒死的中 华鳖血(图版 I-9)、肝(图版 I-10)涂片中均发现 大量的短杆状芽孢杆菌。

2.2 T91-1对中华鳖回归感染

用分离株T91-1对健康中华鳖进行回归感染。 1.2×10⁸ CFU感染的中华鳖在感染后第3天开始出现死亡,至感染后第7天各实验组的累计死亡率分别为100%(1.2×10⁸ CFU/mL)、100%(1.2×10⁷ CFU/mL)、40%(1.2×10⁶ CFU/mL)和40%(1.2×10⁵ CFU/mL)。用SPSS软件分析,其LD₅₀为4.91×10⁵ CFU/mL)。用SPSS软件分析,其LD₅₀为4.91×10⁵ CFU/mL。发病和死亡的中华鳖病症与自然发病中华鳖症状相同,石蜡切片结果显示,攻毒后在濒死的中华鳖肝、肾组织中,可见大量短杆状、革兰氏阳性的芽孢杆菌。生理盐水注射对照组无异常症状或者死亡,中华鳖体内未分离到芽孢杆菌。

2.3 T91-1菌株形态

分离株T91-1在营养琼脂培养基表面粗糙、干燥、呈低凸起形,边缘不规则、似圆形、质地松软、无色素、颜色为灰色的毛玻璃状菌落,菌落直径5—7 mm(图 1A),菌体大小为(1.0—1.2) μm× (3.0—5.0) μm,圆形芽孢大小1.0—1.5 μm,中生或近中生(图 1B)。透射电子显微镜下芽孢呈卵圆形,可观察到前芽孢和已经释放的芽孢(图 1C)。

2.4 T91-1生理生化特性

由表 1可见, T91-1为葡萄糖、果糖、甘露醇、 淀粉、糖原、核糖、N-乙酰葡萄糖胺、七叶灵、 葡萄糖酸钾阳性; 阿拉伯糖等均为阴性; API系统鉴 定生化鉴定系统(APIWEB Plus software V3.2.2 Version)分析表明与蜡样芽胞杆菌相似度分别为 97.4%, 经伯杰氏细菌手册^[15]与蜡样芽胞杆菌 ATCC14579基本符合,鉴定为蜡样芽胞杆菌。

T91-1在10%脱纤维羊血培养基生长良好, 28℃18h菌落为浅灰色、不透明、溶蜡状,同时出 现明显的β溶血,内层为清晰透明的溶血圈,外层为 不完全溶血的半透明溶血圈;脱脂牛奶平板上,出 现完全透明的蛋白水解圈。

2.5 16S rDNA基因序列和系统发育分析

将T91-116S rDNA基因序列(登录号: KY648906) 进行BLAST同源性序列比对分析,与蜡样芽孢杆菌 的相似性为99%。在系统发育树中,分离株T91-1与苏云金芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、维德曼芽孢 杆菌(Bacillus wiedmannii)及东洋芽孢杆菌(Bacillus toyonensis)聚为一类,表明分离株T91-1为蜡样芽孢 杆菌(图 2)。

2.6 gyrB基因序列和系统发育分析

为进一步确认T91-1的分类地位, 克隆并测定 了T91-1 gyrB基因序列, BLAST同源性序列比对分 析表明: T91-1的gyrB基因蜡样芽孢杆菌的相似性 为99%。系统发育树分析T91-1与蜡样芽孢杆菌聚 为一类。综合16S rDNA进一步鉴定表明为蜡样芽 孢杆菌(图 3)。

2.7 T91-1对小鼠的致病性

为检测蜡样芽孢杆菌分离株T91-1对人类的潜 在致病性和毒性,采用ICR乳鼠进行灌胃攻毒。灌 胃24h后,高浓度组(1.2×10⁸ CFU/mL)乳鼠全部死亡; 48h后,中浓度组(1.2×10⁷ CFU/mL)乳鼠死6只,低浓 度组(1.2×10⁶ CFU/mL)乳鼠死3只; 72h后,各组灌胃 乳鼠全部死亡,死亡鼠出现皮下、脚掌、脑部等出 血(图 4)等症状;口灌盐水组未出现症状和死亡。 腹腔注射和口灌的4周龄实验小鼠12—24h出现反 应迟钝、厌食等症状, 24h后逐渐恢复正常, 未出现



图 1 蜡样芽孢杆菌分离株T91-1 Fig. 1 B. cereus T91-1 A. 在营养琼脂上的形态特征; B. 芽孢染色; C. 超薄切片: × 30000

A. *B. cereus* T91-1 was grown in nutrient agar plate and observed morphology character; B. *B. cereus* T91-1 of spore staining; C. *B. cereus* T91-1 of thin-layer electron microscopy: × 30000

死亡;对照组未观察到异常症状。

2.8 发病中华鳖的主要器官病理特征

取天然发病中华鳖肾、肝、肺等组织,固定后

经HE染色,可见发病中华鳖肾、肝、肺出现明显 病理变化,其中肾损伤严重,近曲小管上皮细胞核 肿大,发生颗粒变性,肾小管上皮细胞向管腔靠近,

生化性状 Biochem test	T91-1	ATCC 14579	生化性状 Biochem test	T91-1	ATCC 14579	生化性状 Biochem test	T91-1	ATCC 14579
对照Control	_	_	肌醇INO	_	_	D-棉子糖RAF	_	_
甘露醇GLY	+	ND	甘露醇MAN	_	-	淀粉AMD	+	+
赤藻糖醇ERY	_	-	山梨醇SOB	_	-	糖原GLYG	+	+
D-阿拉伯糖DARA	_	-	L-山梨糖SBE	_	-	木糖醇XLT	_	_
L-阿拉伯糖LARA	_	-	L-鼠李糖RHA	_	d	D-龙胆二糖GEN	_	d
D-核糖RIB	+	+	卫茅醇DUL	_	-	D-土伦糖TUR	_	d
D-木糖DXYL	_	-	苦杏仁苷AMY	_	-	D-来苏糖LYX	_	_
L-木糖LXYL	_	-	熊果甙ARB	+	+	D-塔格糖TAG	_	_
D-侧金盏花醇1 ADO	-	-	水杨苷SAL	+	+	D-岩藻糖DFUC	_	-
甲基-β-D-吡喃木糖苷MDX	_	-	D-纤维二糖CEL	+	d	L-岩藻糖LFUC	_	_
甲基-α-D-吡喃甘露糖苷MDM	_	-	D-麦芽糖MAL	+	+	D-阿拉伯醇DARL	_	_
甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷MDG	_		D-乳糖LAC	_	-	L-阿拉伯醇LARL	_	_
N-乙酰葡萄糖胺NAG	+	+	D-蜜二糖MEL	_	-	D-半乳糖GAL	_	_
七叶灵柠檬酸铁ESC	+	+	D-蔗糖SAC	_	d	D-葡萄糖GLU	+	+
葡萄糖酸钾GNT	+	ND	D-海藻糖TRE	+	+	D-果糖FRU	+	+
2 酮基葡萄糖酸钾2KG	_	-	菊粉INU	_	-	D-甘露糖MNE	_	_
5酮基葡萄糖酸钾5KG	_	-	D-松三糖MLZ	_	-			

表1 API 50 CHB生化鉴定结果 Tab. 1 The result of API 50 CHB

注:阳性.+;阴性.-;ND.文献中该性状数据;d-.存在不同性状

Note: positive. +; negative. -; ND. characterin reference; d-. different



Fig. 2 Phylogenetic tree constructed from 16S rDNA sequence analysis by Neighbor-Joining method

严重时相互分离或与基膜剥离,部分上皮细胞胞核 呈溶解状态,肾小囊囊腔变大,肾血管球缩小,肾小 球内皮细胞萎缩,胞核固缩,部分肾血管球血管破 裂,红细胞渗出,或肾小球坏死、解体,肾脏结构出 现崩解(图版 II);肝细胞肿大、大量肝细胞颗粒变 性,肝中央静脉和窦状隙周围大量红细胞,肝细胞 界限模糊,血管壁上皮细胞增生,胞质不均匀,细胞 核被挤向一边,染色质淡染,部分消失(图版 II);肺 泡上皮细胞坏死,血管扩张充血(图版 II-7),并且出 现大量铁血黄素沉着(图版 II-8),嗜酸性粒细胞浸 润(图版 II-8);心脏血管扩张充血,组织松散(图版 II-10),心脏组织中可观察到大量嗜酸性粒细胞浸 润(图版 II-11)。

3 讨论

2016年6月至7月,杭州某养殖场中华鳖大面积 死亡,发病中华鳖血液和肝涂片瑞氏-姬姆萨染色 后,发现大量芽孢样杆菌。从濒死中华鳖中分离到 的T91-1回归感染健康中华鳖可出现与自然发病中 华鳖相似症状,*LD*₅₀为4.91×10⁵CFU/ind.,人工感染 发病中华鳖内脏可分离到大量芽孢杆菌纯菌落,人 工感染鳖肝、肾切片中可见大量芽孢杆菌,表明 T91-1对中华鳖有很强致病性,是本次引起杭州市 中华鳖发病的病原菌。T91-1在营养琼脂和血平板 上呈浅灰色、不透明、毛玻璃状菌落和典型ß溶血: 芽孢染色和菌体超薄切片显示为中生或近中生芽 孢。T91-1菌株为葡萄糖、果糖、甘露醇、淀粉、 糖原、核糖、N-乙酰葡萄糖胺、七叶灵、葡萄糖 酸钾阳性, 经API生化鉴定系统V3.2.2分析表明与 蜡样芽胞杆菌相似度分别为97.4%,与蜡样芽胞杆 菌典型菌株ATCC14579性状基本符合^[15],鉴定为蜡 样芽胞杆菌。T91-1的16S rDNA序列和gvrB基因序 列分析表明与蜡样芽孢杆菌的相似性均为99%:在 系统发育树上, 16S rDNA序列与同为蜡样芽孢杆 菌群的蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌(B. thuringiensis)以及近年来新发现的维德曼芽孢杆菌(B. wiedmannii)及东洋芽孢杆菌(B. tovonensis, 又译作 图瓦永芽孢杆菌)聚为一类; gyrB基因系统发育树 分析表明T91-1与同为蜡样芽孢杆菌群的蜡样芽孢 杆菌、苏云金芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌(B. anthracis)聚为一类。综合上述分析,确定T91-1为蜡样芽 孢杆菌。T91-1血平板上呈典型β溶血, 与苏云金芽 孢杆菌、蕈状芽孢杆菌的弱溶血及炭疽芽孢杆菌 的不溶血有明显区别^[16]。

蜡样芽孢杆菌在自然界分布广泛,不同菌株的 致病性差异性大^[17]。蜡样芽孢杆菌也是重要的食 源性致病菌,可造成人类患呕吐综合症、腹泻综合 症等疾病,患者可发生心内膜炎和败血症等症状^[18,19],









图 4 T91-1口灌感染乳鼠的皮下出血症状

Fig. 4 Subcutaneous hemorrhagic symptoms of moribund sucking mice oral infected by B. cereus T91-1

也可引起新生儿患脑膜炎直至致死^[20]。近年来,蜡 样芽孢杆菌引起水生生物致病的报道有增加的趋 势,先后报道了刺参(Stichopus japonicus)^[21]、中华 鳖^[9]、南美白对虾(Penaeus vannamei)^[22]、锦鲤 (Cryprinus carpio)^[23]、罗非鱼(Oreochromis niloticus)^[24] 等水生动物的芽孢杆菌感染[24]。谭爱萍等[9]最早报 道了由蜡样芽孢杆菌引起的养殖中华鳖疾病,发病 鳖四肢无力、反应迟钝、身体竖起、摇头而死,主要 发生于5—7月,可危害幼鳖、成鳖和亲鳖等,主要 危害100 g以上体重鳖,发病率可达15%—30%,严 重时最高死亡率可达100%。广东分离的蜡样芽孢 杆菌JY07和JY09对中华鳖半数致死量为3.39×10⁸CFU/ mL。2014年,陈健舜报道了杭州市由苏云金芽孢 杆菌(B.thuringiensis)引起的中华鳖疾病、分离菌株 注射感染健康中华鳖的LD50为1×10^{4.87}—10^{5.30} CFU/ ind.即1×10^{5.87}—10^{6.30} CFU/mL,本研究分离的蜡样 芽孢杆菌T91-1对健康甲鱼的LD50为4.91×105 CFU/ ind., 相当于4.91×10⁶ CFU/mL, 毒力强度与Chen等^[3] 报道相似,而分类鉴定与谭爱萍相同。鉴于蜡样芽 孢杆菌群各个种,系统进化树上十分接近,为明确 分离菌株的分类地位,本研究对生化性状、16SrDNA 和gyrB等进行了综合比较,最后确定为蜡样芽孢杆 菌。同时对发病中华鳖进行了系统的病理分析,对 分离菌株的毒力因子及溶血素BL (hbl)基因进行了 分析(待发表资料),确定了分离菌株的致病性和在 本病例中的作用。

本研究分离的蜡样芽孢杆菌T91-1呈典型的 β溶血,同时含有较高水平的胞外蛋白酶,但培养上 清单独不具有溶血能力。文献报道表明蜡样芽孢 杆菌的溶血现象与溶血素BL有关,该溶血素由 L2、L1和B几个不同的溶血组份组成,通过各组成 与红细胞膜单独或协同结合,造成红细胞破碎^[25], 该毒素是导致人类食物中毒的重要毒力因子^[26]。 从T91-1对乳鼠灌胃毒力强于注射感染来看,T91-1 对小鼠具有较大的肠毒性,对人类可能构成潜在的 风险。T91-1回归感染健康中华鳖后可使实验鳖排 泄物增多,提示分离菌株对鳖存在较大的肠毒性。 需要对分离株非溶血性肠毒素nhe(NHE)^[27]和溶血 性毒素hbl(HBL)^[28–31]开展进一步研究。

值得注意的是,本次从杭州市中华鳖养殖场分 离到的蜡样芽孢杆菌,该病原可在该场所有发病池 分离到,发病鳖症状相似,病鳖各脏器、血液及脑 部均可分离到单一的芽孢杆菌样纯培养,同期杭州 市其他发病的中华鳖养殖场未分离到优势的芽孢 杆菌,表明该病未在杭州市其他中华鳖养殖场引起 流行。分析发病场中华鳖养殖条件,发现该场养殖 密度较高,水质蓝藻水平极高,2016年和2017年均 发生芽孢杆菌大规模感染。该病原是来源于带毒 力基因蜡样芽孢杆菌制剂的不当使用,还是在养殖 环境周边存在较高的蜡样芽孢杆菌背景,需要进一 步跟踪分析。

参考文献:

- [1] Liu H L. The development of biological research in principal freshwater reptiles cultivated in china [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2005, 20(1): 61—68 [刘焕亮. 中国淡水爬行动物主要养殖种类生物学研究进展. 大连水产学院学报, 2005, 20(1): 61—68]
- [2] He Z Y. The Soft-shelled Turtle of Efficient Culturing Technology and Examples [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press. 2016, 11 [何中央. 中华鳖高效养殖致富技术 与实例. 北京: 中国农业出版社. 2016, 11]
- Chen J S, Zhu N Y, Kong L, et al. First reported fatal Bacillus thuringiensis infections in Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*) [J]. Aquaculture, 2014, 428-429: 16-20
- [4] Yang X L, He L, Ke F E. Statue quo and prospect for researching diseases of soft-shelled turtle, *Trionyx* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1995, 2(4): 78—85 [杨先乐, 贺路, 柯福恩. 鳖病研究的现状及其展望. 中国水产科学, 1995, 2(4): 78—85]
- [5] Zhang Z, Chen B, Yuan L, *et al.* Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(1): 127–137
- [6] Pan X Y, Hao G J, Yao J Y, et al. Identification and pathogenic facts studying for Edwardsiella tarda from Edwardsiellosis of Trionyx sinensis [J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(6): 40—45 [潘晓艺, 郝贵杰, 姚嘉赟, 等. 中华鳖爱德华菌病病原菌的分离鉴定及致病因子研究. 淡水渔业, 2010, 40(6): 40—45]
- [7] Lin Y G, Ye J, Shi TT, et al. Isolation and identification of pathogen Proteus mirabilis from diseased Chinese softshelled turtle Pelodiscus sinensis [J]. Fisheries Science, 2014, 33(12): 800—803 [林亚歌, 叶键, 石婷婷, 等. 中华 鳖源奇异变形杆菌的分离鉴定与致病性研究. 水产科学, 2014, 33(12): 800—803]
- [8] Kong L, Zhu N Y, Bei Y J, et al. Isolation and identification of pathogenic Morganella morganii isolates from Chinese soft-shelled Turtle Pelodiscus sinensis [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(3): 722—727 [孔蕾, 朱凝瑜, 贝亦江, 等. 中华鳖(Pelodiscussinensis)摩氏摩根菌(Morganellamorganii)的鉴定及 致病性研究. 海洋与湖沼, 2013, 44(3): 722—727]
- [9] Tan A P, Zhao F, Jiang F, et al. Isolation and identification of Bacillus cereus from Trionyxsinensis [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(20): 115—119 [谭 爱萍, 赵飞, 姜兰, 等. 中华鳖致病性蜡样芽孢杆菌的分 离鉴定与特性分析. 广东农业科学, 2011, 38(20): 115—119]

- [10] Li L K. Screening of alkaline protease producing strain and cloning and expression of its *ap* gene [D].Thesis for Master of Science. Henan Agricultural University, Zhengzhou. 2006 [李林珂. 蛋白酶产生菌的筛选及其*ap*基因 的克隆和表达. 河南农业大学, 郑州. 2006]
- [11] Lin Z Y, Huang J L. Assessment of the stain effect with improves R-J stain [J]. *Heilongjiang Medical Journal*, 2008, **32**(7): 521—522 [林志远, 黄建玲. 一种改良瑞氏-姬姆萨染色液的染色效果评价. 黑龙江医学, 2008, **32**(7): 521—522]
- [12] Du Y Y, Zhou L P, Yan T, et al. Experimental study on lethality of rats in Mycoplasma infection [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(3): 269—272 [杜园园,周 丽萍, 闫涛,等. 发酵支原体、梨支原体大鼠致死性感 染实验研究. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(3): 269—272]
- [13] Miller R A, Kent D J, Watterson M J, et al. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(12): 8492–8504
- [14] Durak M Z, Fromm H I, Huck J R, et al. Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paeniba-cillus* spp. isolated from fluid milk products [J]. *Journal* of Food Science, 2006, 71(2): M50–M56
- [15] Paul V,George G, Dorothy J, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition [M]. New York: Springer. 2009, 73-82 (ISBN 0-387-95041-9)
- [16] Ministry of Health of the People's Republic of China. GB4789.14—2003, National Food Safety of Standard Food Microbiological Examination: *Bacillus cereus* of Detection [S]. Beijing: China Standard Press. 2003 [中华 人民共和国卫生部. GB4789.14—2003, 食品安全国家 标准食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验. 北京: 中国 标准出版社. 2003]
- [17] Zhao Z Y. Isolation and identification of *Bacillu cereus* from Piglet [D]. Hunan Agricultural University. 2014 [赵 振宇. 猪源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定. 湖南农业大学. 2014]
- [18] Gao J Z, Zheng X M, Wang B. An investigation by Bacillus cereus caused food poisoning [J]. Chinese Journal of Public Health Management, 2008, 24(4): 387—388 [高景 枝,郑向梅,王滨.一起由蜡样芽孢杆菌引起食物中毒 调查分析.中国公共卫生管理, 2008, 24(4): 387—388]
- [19] Schoeni J L, Wong A C. Bacillus cereus food poisoning and its toxins [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(3): 636–648
- [20] Chu W P, Que T L, Lee W K, *et al.* Meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus* in a neonate [J]. *Hongkong*

Medical Journal, 2001, 7(1): 89-92

- [21] Luo Y W, Hao Z K, Wang Y G, et al. A Bacillus cereus isolates causing "rot-skin syndrome" of Stichopus japonicus [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2009, 36(2): 60—63 [骆艺文, 郝志凯, 王印庚, 等. 一株 引起刺参"腐皮综合征"的蜡样芽孢杆菌. 水产科技情 报, 2009, 36(2): 60—63]
- [22] Velmurugan S, Palanikumar P, Velayuthani P, et al. Bacterial white patch disease caused by Bacillus cereus, a new emerging disease in semi-intensive culture of Litopenaeusvannamei [J]. Aquaculture, 2015, 444(3): 49-54
- [23] Huang B W, Liu X, Gao H Q, et al. Preparation and application of inactivated vaccine for skin fester disease of Cryprinus carpio [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(20): 5320—5323 [黄博闻, 刘茜, 部华侨, 等. 锦鲤腐皮病灭活疫苗制备及使用. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5320—5323]
- [24] Yang B B, Yu L X, Liu Y T, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of Bacillus cereus from tilapia [J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(4): 51—56 [杨 移斌, 余琳雪, 刘永涛, 等. 罗非鱼源蜡样芽孢杆菌分 离、鉴定及药敏特性研究. 淡水渔业, 2017, 47(4): 51—56]
- [25] Kumari S, Sarkar P K. Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment [J]. Food Control, 2016, 69: 20–29
- [26] Wang L G, Wang Q, Qi J S, et al. Detection of hemolysin BL gene and hemolysin in several Bacillus cereus [J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(3): 21—23 [王利国, 王琦,齐俊生,等. 几种芽胞杆菌溶血素BL基因及其溶 血素的检测. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 21—23]
- [27] Granum P E, Sullivan K O, Lund T. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **177**(2): 225–229
- [28] From C, Pukall R, Schumann P, et al. Toxin-producing ability among Bacillus spp. outside the Bacillus cereus group [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1178–1183
- [29] Lund T, De Buyser M L, Granum P E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(2): 254–261
- [30] StenforsArnesen L P, Fagerlund A, Granum P E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins
 [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(4): 579–606
- [31] Ehlingschulz M, Fricker M, Scherer S. Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2004, 48(7): 479–487

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY ANALYSIS OF BACILLUS CEREUS FROM CHINESE SOFT-SHELLED TURTLES, PELODISCUS SINENSIS

MENG Qing-Zhen¹, YIN Fei¹, FU Chao-Ying¹, CHEN Fan², LIU Chang-Jun³, YUAN Na¹, WANG Li², ZHANG Hong-Hu¹ and QIAN Dong¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315000, China; 2. Hangzhou Aquaculture Technique Extension Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310000, China; 3. Xiangshan Ocean and Fishery Bureau of Zhejiang Province, Xiangshan 315711, China)

Abstract: The epizootic outbreaks were recorded in Chinese soft-shelled turtle farm in Hangzhou, Zhejiang province in summer of 2016. The diseased turtles were an orexia, lags in responsive, abnormal or lonely swimming. The moribund turtles would creep and lie on the shore with continuous head-shaking with a 20% mortality. Gram positive rod with single endospore were isolated from liver, kidney, spleen and blood of moribund turtles with typical symptoms. Stain T91-1 was identified as Bacillus cereus with API 50 CHB strip, 97.4% similarity to B. cereus reference strains by BioMérieux APIWEB Plus software V3.2.2. The identification was confirmed by phylogenetic analysis using 16S rDNA and gyrB whole gene, 99% similarity to type strains ATCC14579 of *B. cereus* T91-1 that showed typical β hemolytisis on sheep blood agar and large transparent circle on the milk agar, indicating the existence of hemolytic and extracellular protease toxin. The T91-1 challenged turtles died from day 3 to day 7 with the symptoms similar to natural infected turtles, and LD₅₀ of B. cereus T91-1 was 4.91×10⁵ CFU/ind. Large number of Bacillus-like rods were observed in blood and liver smear stained with Wright-Giemsa. A large number of Bacillus-like were found in kidney, liver, lung and heart of native diseased turtles with vascular dilatation and congestion, as well as infiltrated eosinophils. All ICR suckling mice were killed at day 3 after oral administrated with T91-1 at concentration ranged from 1.2× 10⁶ CFU/mL to 1.2×10⁸ CFU/mL with hemorrhagic subcutis and cerebrum. Four weeks old mice were injected or oral administrated with T91-1 at 1×10^7 — 10^9 CFU/mL, which showed anorexia, lags in responsive within 12h to 24h, but no death was recorded. These results demonstrated that B. cereus T91-1, with the strong pathogenicity to Chinese softshelled turtles and enterotoxigenic to mice, could be the pathogen of outbreaks of Chinese soft-shelled turtles diseases in this farm in Hangzhou.

Key words: Chinese soft-shelled turtle; Bacillus cereus; Identification; Pathogenicity



图版 I 自然发病濒死中华鳖症状

Plate I Gross signs of naturally infected Chinese soft-shelled turtles

瑞氏-姬姆萨染色40×; 1. 后期病鳖的抬头; 2.健康中华鳖; 3. 病鳖腮腺充血; 4. 健康中华鳖腮腺; 5. 脾肿大、暗紫色; 6. 健康中华鳖脾脏; 7. 病鳖肠道痉挛/充血; 8. 健康中华鳖肠道; 9. 血涂片; 10. 肝涂片

Wright-Giemsa stain 40×; 1. craned and twisted necks; 2. heath Chinese soft-shelled turtles; 3. hemorrhagic parotid gland; 4. heath Chinese soft-shelled turtles parotid gland; 5. swollen spleen with dark purple; 6. heath Chinese soft-shelled turtles spleen; 7. spasm hemorrhagic intestina; 8. heath Chinese soft-shelled turtles intestina; 9. blood smear: 10. liver smear



图版Ⅱ 中华鳖组织病理特征

Plate II Histopathological characteristics in Chinese soft-shelled turtle

HE染色 400×; 1. 肾小管上皮细胞肿大、颗粒变性(箭头a), 肾小管间界限消失, 形成合包体(箭头c), 肾小管间小血管扩张(箭头b); 2. 肾小球萎缩, 结构崩解, 肾小囊腔变大, 囊壁上皮细胞溶解坏死(箭头a), 大量芽孢样杆菌(箭头b); 3. 健康中华鳖肾组织; 4. 肝细胞颗粒变性(箭头a), 肝组织血管扩张充血(箭头b), 肝细胞间界限模糊(箭头c), 肝组织中炎症细胞浸润(箭头d); 5. 肝组织大量芽孢样杆菌(箭头a), 血铁黄素沉着(箭头b)(HE, 400×); 6. 健康中华鳖肝组织; 7. 肺组织中出现血铁黄素沉着(箭头a), 大量短杆状芽孢杆菌(箭头b); 8. 肺组织血管扩张严重充血(箭头a), 肺组织中嗜酸性粒细胞浸润(箭头b); 9. 健康中华鳖肺组织; 10. 自然发病中华鳖心组织血管扩张充血(箭头a)和芽孢样杆菌(箭头b); 11. 自然发病中华鳖心组织嗜酸性粒细胞浸润; 12. 健康中华鳖心组织

HE staining 400×, 1. swellen renal tubular epithelial cells with flocular degeneration (arrow a), renal tubular interstitial boundaries indistincted and symplast formed (arrow c) in naturally infected soft-shelled turtle; 2. atrophy glomerular, and enlarged renal capsular space with necrosis epithelial cells of renal capsule wall (arrow a) and *Bacillus*-like bacteria (arrow b) in naturally infected soft-shelled turtle; 3. health Chinese soft-shelled turtle kidney tissue; 4. flocular degeneration (arrow a), vascular dilated and congested (arrow b), indistinct boundaries in hepatocytes (arrow c), inflammatory cells infiltration in liver (arrow d) in naturally infected soft-shelled turtle; 5. large number of *Bacillus*-like bacteria (arrow b) in naturally infected soft-shelled turtle; 5. large number of *Bacillus*-like bacteria (arrow b) in naturally infected soft-shelled turtle; 8. congested pulmonary artery (arrow a), large number of *Bacillus*-like bacteria (arrow b) in naturally infected soft-shelled turtle; 9. health Chinese soft-shelled turtle; 11. eosinophils infiltrated in heart in naturally infected soft-shelled turtle; 12. health chinese soft-shelled turtle heart tissue