乌鳢舒氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验

齐冬梅[1],徐　蕙[1],易　婷[2],王汉清[1],胡文军[1],张　震[1],林旭埜[1*]

(1.广东永顺生物制药股份有限公司,广州 511356;2.广州市黄埔军校纪念中学,广州 510770)

[收稿日期] 2015-10-16　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2016)02-0011-04　[中图分类号]S852.61

[摘　要]　对广东省佛山市某乌鳢养殖鱼场患病的乌鳢进行病原分离,将疑似分离菌S-1株进行形态和培养特性、生化特性鉴定、PCR鉴定、药敏试验和人工感染等试验。结果表明,该分离菌为舒氏气单胞菌。药敏试验结果表明,本分离菌对壮观霉素、米诺环素、庆大霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、头孢类等多种药物敏感。本研究为舒氏气单胞菌病细菌学检测及治疗提供了科学依据。

[关键词]　乌鳢;舒氏气单胞菌;分离鉴定;药敏试验

Isolation, Identification and Drug Susceptibility of *Aeromonas schubertii* in Snakeheaded Fish

QI Dong-mei[1], XU Hui[1], YI Ting[2], WANG Han-qing[1], HU Wen-jun[1], ZHANG Zhen[1], LIN Xu-ye[1*]

(1. *Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical co., ltd*, *Guangzhou* 511356, *China*;

2. *Guangzhou Whampoa Military Academy Memorial Middle School*, *Guangzhou* 510770, *China*)

Abstract: Bacterial pathogen was isolated in a snakeheaded fish farm in Foshan, Guangdong province. S-1 strain pathogenic bacterium was isolated from sick snakeheaded fish; the isolated bacterium was identified by morphological characteristics, biochemical characteristics researches, amplification of 16S rRNA by PCR and drug susceptibility test, experimental infection test. The isolated bacterium was confirmed as *Aeromonas schubertii*. Drug susceptibility test results showed that the isolated bacterium were sensitive to spectinomycin, minocycline, gentamycin, ofloxacin, norfloxacin and cephalosporin etc. The results provided scientific bases for detection and treatment of *Aeromonas schubertii*.

Key words: snakehead fish; *Aeromonas schubertii*; isolation and identification; drug susceptibility

作者简介:齐冬梅,博士,从事微生物学与免疫学研究。

通讯作者:林旭埜。E-mail: lxy68@21cn.com

[3]　赵　鹏,李德庆,董　宣. SPF鸡感染禽白血病病毒A/B亚群后血清抗体与卵黄抗体的变化及其相关性断[J]. 畜牧兽医学报, 2014,45(4):614-620.

[4]　陈　斌,杨志华. 鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的作用机理及应用前景[J]. 浙江畜牧兽医,2005,(1):9-10.

[5]　焦玉兰,朱秀同,赵玉龙,等. ELISA法检测卵黄和血清中禽呼肠孤病毒抗体相关性试验[J]. 中国兽药杂志,2013,49(2):37-39.

[6]　郑立勇,乔彦良,马凤龙,等. 卵黄抗体不同提取方法的比较[J]. 黑龙江畜牧兽医,2009,(1):106-107.

[7]　全国动物防疫标准化技术委员会. GB/T 17999-2008 SPF鸡微生物学监测[S]. 北京:中国标准出版社.

[8]　庄金秋,梅建国,沈志强. 禽网状内皮组织增生症病毒检测方法研究进展[J]. 家禽科学, 2013, 10:45-50.

(编　辑:李文平)

乌鳢别名生鱼、黑鱼,是一种肉食性凶猛鱼类,主要以鱼、虾等为食。近年来随着乌鳢人工养殖业的发展,该鱼的多种疾病也随之出现[1]。2014 年 9 月佛山某乌鳢养殖鱼场出现的大量乌鳢发病和死亡病例,病鱼表现为皮表溃烂,肝、肾和脾脏有不同程度白色病灶。对病鱼和濒死鱼进行细菌病原分离鉴定。成功分离到 1 株革兰氏阴性菌,并对该分离菌进行了培养特性、PCR 鉴定、生化鉴定、药敏试验和本动物回归试验,为研究舒氏气单胞菌的致病机理及建立病原学和免疫学诊断技术提供科学依据,并为临床治疗提供指导。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*病料*　广东省佛山市某乌鳢养殖鱼场病鱼和濒死鱼。

1.1.2　*培养基及主要试剂*　胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)和胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、鲜血琼脂平板、革兰氏染色液等购自广东环凯微生物科技有限公司;生化试剂、药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技北京有限公司;16S rRNA 通用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3　*健康乌鳢*　购自佛山市南海镇九江区乌鳢养殖基地。

1.2　方法

1.2.1　*病原菌的分离培养*　无菌取发病和濒死乌鳢的肝脏和肾脏,分别划线接种于 TSA 和鲜血琼脂平板,28 ℃培养 24 h 后,观察菌落生长情况。挑选典型菌落多次纯培养后进行革兰氏染色,显微镜下观察细菌形态特征。

1.2.2　*生化鉴定*　根据分离菌的培养特性、染色特性,选择葡萄糖、麦芽糖、果糖、木糖、乳糖、鼠李糖、蔗糖、甘露醇、七叶苷、H_2S、液化明胶、H_2O_2、氧化酶、硝酸盐还原试验等按照常规方法进行生化鉴定[2]。

1.2.3　*药敏试验*　药敏试验采用 WHO 推荐的 Kirby - Bauer 纸片扩散法,分离菌株对近 20 种常用抗菌药物的敏感性进行检测,将检测平板置 28 ℃培养 24 h,测量抑菌圈直径,按美国临床实验室标准化研究所(CLSI)的标准判定为敏感、中度敏感和耐药[3]。

1.2.4　*16S rRNA 基因扩增*　取菌液按基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA,以其为模板利用 16S rRNA 通用引物进行基因扩增。上游引物 P1:5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAB - 3';下游引物 P2:5' - ACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3'。

50 μL 反应体系:ddH_2O 38.5 μL、10 × Taq reaction buffer (Mg^{2+} plus) 5 μL、dNTP (2.5 mmol/L)4 μL、上下游引物各 1 μL、模板 0.25 μL、Taq 酶 0.25 μL;扩增条件:95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,共 30 循环;72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,观察结果。扩增产物纯化后与 pMDT - 19 载体连接,提取质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.5　*动物回归试验*　将分离菌株接种 TSB 肉汤,28 ℃培养 24 h 后,平板计数法测定菌液浓度。用无菌生理盐水稀释并调整菌液浓度为:3.8×10^9、7.6×10^8 CFU/mL。100 ~ 150 g 健康乌鳢 150 尾随机分成 3 组,每组 50 尾。两个试验组分别腹腔注射菌液 0.1 mL/尾,对照组注射 TSB 肉汤 0.1 mL/尾。攻毒后观察和记录试验鱼的死亡情况,并对死亡鱼进行剖解和病原菌的分离,分离菌进行革兰氏染色及 16S rRNA PCR 鉴定。

2　结果与分析

2.1　*分离菌的培养特性和形态观察结果*　分离菌经革兰氏染色镜检可见革兰氏阴性,两端钝圆小杆菌,多单个散在,无芽胞和荚膜(图 1)。普通营养琼脂平板上菌落为光滑、灰白色、半透明、隆起、边缘整齐、湿润、圆形的中等大小菌落。将分离株命名为 S - 1。

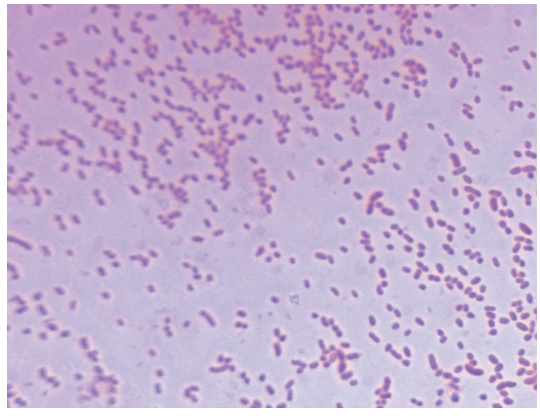

图 1　S - 1 株革兰氏染色镜检结果(1000 ×)

2.2　*生化鉴定结果*　S - 1 株分离菌可发酵葡萄糖、麦芽糖、果糖;不发酵木糖、乳糖、鼠李糖、蔗糖、

甘露醇、七叶苷,H_2S、液化明胶、H_2O_2、氧化酶均为阴性反应;硝酸盐还原试验为阳性反应,与《伯杰氏系统细菌学手册》[2]对此菌的描述相符,详细结果见下表1所示。

表1　分离株S-1生化鉴定结果表

项目	结果	项目	结果
木糖	-	蔗糖	-
乳糖	-	甘露醇	-
鼠李糖	-	H_2S	-
葡萄糖	+	液化明胶	-
麦芽糖	+	硝酸盐还原	+
果糖	+	H_2O_2	-
七叶苷	-	氧化酶	-

"+"为阳性,"-"为阴性

2.3　药敏试验结果　选择近20种抗菌药物做药物敏感性试验,结果显示分离菌S-1株对卡那霉素、四环素、克拉霉素、红霉素、妥布霉素耐药,对其他受试药物有着不同程度的敏感性,对多数受试药物具有较高的敏感性,具体结果详见表2。

表2　分离株S-1药敏试验结果表

药物名称	含量(μg/片)	敏感程度
卡那霉素	30	R
链霉素	10	S
四环素	30	R
氯霉素	30	I
壮观霉素	100	S
红霉素	15	R
新霉素	30	I
克拉霉素	15	R
米诺环素	30	S
庆大霉素	10	S
妥布霉素	10	R
氨苄西林	10	S
阿莫西林	10	S
环丙沙星	5	S
氧氟沙星	5	S
诺氟沙星	10	S
头孢吡肟	30	S
头孢噻肟	30	S
头孢呋辛	30	S

"S"为高敏;"I"为中度敏感;"R"为耐药

2.4　16S rRNA基因序列分析结果　以S-1分离株纯培养物DNA为模板,以细菌16S rRNA通用引物进行PCR扩增,琼脂糖电泳检测到16S rRNA的扩增片段约为1700 bp,与预期目的片段大小一致(图2)。

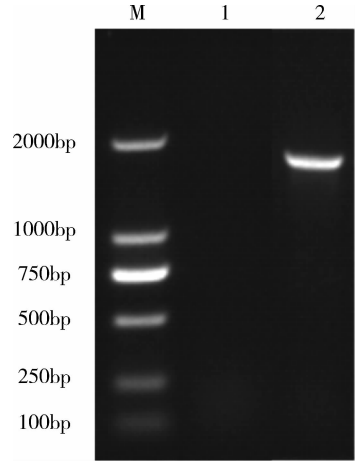

图2　S-1株分离菌16S rRNA PCR扩增结果(M:marker 2000;1:空白对照;2:分离株S-1)

将16S rRNA基因测序结果与GenBank中序列进行BLAST分析比对,分离菌与舒氏气单胞菌的同源性最高,达99%以上(GenBank序列号GQ844302.1),由此确定该分离菌为舒氏气单胞菌。

2.5　动物回归试验结果　试验鱼攻毒24 h后,2个攻毒剂量均开始出现死亡,死亡症状表现为:鳃盖四周出血,内脏各脏器黑色,肠道透明出血。各剂量组试验鱼死亡情况见表3。试验鱼观察至第14天,实验组仅存的1尾鱼进行解剖,可见脏器散在小白点,这与最初分离的症状相符,对病鱼进行病原菌进行分离纯化,革兰氏染色及16S rRNA鉴定,结果均与分离株S-1相同。

表3　分离株S-1攻毒试验结果表

分组	攻毒菌液	试验鱼数	攻毒剂量/CFU	死亡率/%
实验组	S-1	50	3.8×10^8	100(50/50)
	S-1	50	7.6×10^7	98(49/50)
对照组	TSB	50	—	0(0/50)

3　讨论与小结

乌鳢常见主要细菌性疫病主要有由杀鲑气单胞菌(*Aeromonas Salmonicida*)[4];嗜水气单胞菌(*Aeromouas hydrophila*);维氏气单胞菌(*Aeromouas verouii*);河弧菌(*Vibrio fluvialis*)等引起的出血病、由嗜水气单胞菌(*Aeromouas hydrophila*)引起的腐

皮病、由费氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freuudii*)等引起的腹水病[5]、鲡诺卡菌(*Nocardia seriolea*)引起的结节病[6]等。虽然乌鳢鱼的抗病能力较强,但由于养殖密度和集约化程度提高,水环境差等多种原因,乌鳢各种细菌性病害频繁发生,影响了乌鳢养殖业的发展。本试验从皮表溃烂,肝、肾和脾脏有不同程度白色病灶的濒死乌鳢肝脏和肾脏中分离得到 S - 1 株菌,经形态特性、培养特性、生化特性、分子生物学鉴定试验、综合人工本动物回归试验确定为确定为舒氏气单胞菌。舒氏气单胞菌是近年来发现的一个新的气单胞菌新种[7],是人 - 畜 - 鱼共患病原菌[8-10]。对于舒氏气单胞菌在水生动物的相关报道和深入研究不多,J Y Liu[11]、Y F Chen[12]、罗霞[13]也证实了舒氏气单胞菌是对乌鳢危害严重的致病菌。余华等[14]在温泉鱼体内分离到致病的舒氏气单胞菌。

从药敏试验结果来看,该分离株对大多数的抗菌药和杀菌药物都敏感,余华[14]报道分离的舒氏气单胞菌对头孢类抗生素(头孢曲松、头孢氨噻亏)和壮观霉素等敏感。J Y Liu[11]报道分离的舒氏气单胞菌对头孢菌素 V,氯霉素,环丙沙星,氟苯尼考等敏感。Y F Chen[12]头孢哌酮和头孢西丁、氯霉素,但耐氨卞青霉素,青霉素,克林霉素,苯唑西林等。在日常防治由该菌引起的鱼体发病时,除加强日常饲养管理外,可选用该菌的敏感药物进行这类疾病的防治。但防控该病时应该严格遵循国家制定的相关渔药使用法规,不使用氯霉素等禁药,正确合理使用药物,保障该产业的绿色健康发展,确保人类的食品安全。

本研究中主要对发病乌鳢进行病原菌分离鉴定和药物敏感性试验,分离菌的药物敏感性试验结果可为有效药物的选择提供参考。本试验的结果为疫苗的开发应用及本病的防治提供了理论基础。

参考文献:

[1] 房 海,陈翠珍,张晓君. 水产养殖动物病原细菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2010.

[2] R. E. Buchanan, N. E. Gibbons.《伯杰氏系统细菌学手册》[M]. 第 8 版,北京:科学出版社,1984.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement [S].

[4] 周冬仁,罗毅志,杭小英,等. 1 株乌鳢源杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的分离与鉴定[J]. 海洋湖沼通报,2015,38(3): 64 - 70.

[5] 吴同垒,单晓枫,王桂芹,等. 乌鳢主要病害的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011,9(上):29 - 31.

[6] 王国良,徐益军,金 珊,等. 养殖乌鳢诺卡菌病及其病原研究[J]. 水生生物学报,2009,33 (2) :277 - 283.

[7] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:127 - 130.

[8] Kannan S, Chattopadhyay U K, Pal D, *et al*. Isolation and identification of aeromonas from patients with acute diarrhoea in Kolkata, India[J]. Indian J Med Microbiol,2001,19:190 - 192.

[9] 高海英,潘慧英,王 芳. 江阴市首次从食品中检出舒伯特气单胞菌[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12 (3):329.

[10] 刘向前,申作江,陈建文,等. 一起由舒伯特气单胞菌引起的食物中毒调查报告[J]. 现代预防医学,1999,26 (4) : 536 - 537.

[11] J Y Liu, A H Li. First case of Aeromonas schubertii infection in the freshwater cultured snakehead fish, Ophiocephalus argus (Cantor), in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35 (5):335 - 342.

[12] Y F Chen, R S Liang, X L Zhuo, *et al*. Isolation and characterization of Aeromonas schubertii from diseased snakehead, Channa maculata (Lacepe`de) [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35 (6):421 - 430.

[13] 罗 霞,邓国成,廖国礼,等. 斑鳢内脏白点病病原的分离鉴定[J]. 大连海洋大学学报,2012,27(4):95 - 100.

[14] 余 华,何 智,严玉宝,等. 温泉鱼致病性类志贺邻单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国动物检疫,2009, 26(7):37 - 39.

(编 辑:侯向辉)