

高体革鲷温和气单胞菌的分离·鉴定及药敏试验

陈言峰¹, 冯伟强¹, 张辉华¹, 陈建酬¹, 张绮琼¹, 邹记兴², 付立霞^{3*} (1. 佛山科学技术学院生命科学学院, 广东佛山 528231; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642; 3. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要 [目的] 分离并鉴定患病的高体革鲷(*Scortum barco*)的致病菌,并研究其药敏特性。[方法] 从濒死的高体革鲷体内分离到2株致病菌(FS1491、FS1492),通过其生理生化特征与16S rDNA序列分析对其进行鉴定;通过人工感染试验测定2株致病菌对高体革鲷的半致死剂量(LD_{50});最后,通过药敏试验确定其对抗生素的敏感性。[结果] 通过鉴定确定2株致病菌均为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*),此2株致病菌对高体革鲷的半致死剂量依次为 2.1×10^5 和 8.5×10^4 cfu/g。该菌对头孢噻肟、环丙沙星、诺氟沙星和左氧沙星等抗生素高度敏感。[结论] 该研究可为防治温和气单胞菌引起的高体革鲷疾病提供参考。

关键词 高体革鲷;温和气单胞菌;鉴定;药敏试验

中图分类号 S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)03-133-03

Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria *Aeromonas sobria* in Cultured *Scortum barco* and Their Antibiotic Susceptibility Test
CHEN Yan-feng¹, FENG Wei-qiang¹, ZHANG Hui-hua¹, FU Li-xia^{3*} et al (1. College of Life Science, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231; 3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract [Objective] Pathogenic bacteria from diseased *Scortum barco* were isolated and identified, and their antibiotic susceptibility was studied. [Method] Two pathogenic bacterial strains (FS1491, FS1492) were isolated from moribund *Scortum barco*, and they were identified through physiological and biochemical characteristics test and 16S rDNA sequence analysis. The half lethal dose (LD_{50}) values for the isolates to *Scortum barco* were determined by the artificial infection experiment. Besides, the antibiotic susceptibility of the isolates was studied. [Result] These two bacteria were identified to be *A. sobria*. The LD_{50} values for the isolates to healthy *Scortum barco* were 2.1×10^5 and 8.5×10^4 cfu/g, respectively. The result of antibiotic susceptibility test showed the isolates were highly susceptible to cefotaxime, ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin and so on. [Conclusion] This study could provide references to prevent and control the disease of *Scortum barco* resulted from *A. sobria*.

Key words *Scortum barco*; *Aeromonas sobria*; Identification; Antibiotic susceptibility test

高体革鲷(*Scortum barco*),隶属鲈形目(Perciformes),鲷科(Theraponidae),革鲷属(*Scortum*),俗称宝石鲈、宝石鱼、翡翠鱼等,是我国从澳大利亚引进的一种优良的淡水经济鱼类。该鱼具有生长速度快、食性杂和适应性强等优良养殖性状,且肉质鲜美,骨刺少,蛋白质含量高,具有较高的经济价值和广阔的养殖前景^[1]。然而,随着集约化高密度养殖规模的不断扩大,高体革鲷的细菌性疾病日益严重,目前已有迟缓爱德华氏菌^[2]、无乳链球菌^[3]及海豚链球菌^[4]引发的高体革鲷病害的报道。笔者于2014年9月对来自广东省佛山市某养殖场的部分患病的高体革鲷进行了致病菌的分离鉴定、人工感染试验、抗生素敏感性试验,旨在为高体革鲷疾病的防控提供参考。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 濒死的高体革鲷取自佛山市某养殖场。病鱼体表有部分溃烂的病灶,腹部膨胀,肛门红肿,解剖后发现肝脏变脆,呈土黄色,严重者肝脏呈糜烂状。细菌生化反应微量鉴定管、革兰氏染色液和芽孢染色液均购自广东环凯微生物有限公司,成套的抗生素药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 致病菌的分离与纯化 选取症状典型的濒死高体革

鲷,无菌操作从肝、肾、脾取样,划线接种于营养琼脂平板,28℃培养48h后挑取单个菌落进行纯化培养。按照染色液的说明书,对已纯化的细菌进行革兰氏染色、芽孢染色,并按照文献[5]中的方法对细菌进行荚膜染色,置于显微镜下进行观察。

1.3 致病菌的生理生化鉴定 分别将FS1491和FS1492的新鲜菌落接种于无菌营养肉汤,35℃培养18h后,分别取80μl菌液加入到每种生化鉴定管中,35℃培养12~48h后,根据生化鉴定管的说明书判定结果。

1.4 人工感染试验 选取70尾健康的高体革鲷,体质量(221±19)g,分为7组,每组10尾,其中6组为感染组,1组为对照组。将FS1491接种于新鲜营养琼脂斜面,35℃下恒温培养18h,用无菌生理盐水洗下菌苔,制成浓度为 1.69×10^9 cfu/ml的菌悬液,并分别稀释至 1.69×10^8 、 1.69×10^7 、 1.69×10^6 、 1.69×10^5 和 1.69×10^4 cfu/ml。分别将以上6个浓度的菌悬液对以上6个感染组高体革鲷进行腹腔注射,每尾注射0.5ml。对照组高体革鲷每尾注射0.5ml的无菌生理盐水。人工感染后,感染组及对照组置于不同水簇箱中,连续观察14d,每天记录受试鱼的发病症状与死亡的尾数,并对死亡的鱼进行细菌再分离,采用改进的寇氏法^[6]计算半致死剂量 LD_{50} 。采用相同的方法进行FS1492对高体革鲷的半致死剂量的测定。

1.5 16S rDNA 序列分析 采用细菌16S rDNA通用引物(正向:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向:5'-TACGGC-TACCTTGTACGACT T-3')^[7]进行扩增。PCR反应体系(50μl)为:细菌DNA模板2μl,正、反向引物(10mmol/L)各1μl,4×dNTP(10mmol/L)2μl,10×PCR缓冲液(含 Mg^{2+})

基金项目 江苏省高校自然科学基金(11KJB240002);广东省教育部产学研项目(2010b090400255);广东省大学生创新创业训练计划项目(201411847059);广东省普通高校青年创新人才项目;佛山科学技术学院校级科研项目。

作者简介 陈言峰(1981-),男,山东潍坊人,讲师,博士,从事淡水养殖鱼类病害研究。*通讯作者,博士,从事水产动物抗逆性研究。

收稿日期 2014-12-08

5 μl , DNA 聚合酶(1 U/ μl) 2 μl , 双蒸水 37 μl 。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s,30 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,送交上海英潍捷基生物技术有限公司纯化后测序。将测序所得到的 16S rDNA 序列,与 GenBank 数据库中的已知核酸序列进行 BLAST 分析,选取与该序列相似性较高的核酸序列,采用 ClustalX 1.83 和 MEGA 4.1 软件进行多序列比对和系统发育树的构建。

1.6 药敏试验 采用纸片琼脂扩散(K-B)法对 FS1491 和 FS1492 进行药敏试验。将药敏纸片用无菌镊子贴置于涂布菌液的营养琼脂表面,35 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 后测量抑菌圈直径

的大小。

2 结果与分析

2.1 致病菌的形态学特征 FS1491 和 FS1492 均为革兰氏阴性杆菌,无芽孢,无荚膜。在营养琼脂培养基上生长,形成光滑、略隆起、圆形、乳白色的菌落,直径约 2.0 mm。在 LB 肉汤中培养时,上层略浑浊,管底有絮状沉淀,摇动后均匀散开。

2.2 致病菌的生理生化鉴定 由表 1 可知,FS1491 和 FS1492 的生理生化特征与温和气单胞菌相似。根据《伯杰细菌鉴定手册》^[8],初步鉴定该 2 株致病菌为温和气单胞菌。

表 1 分离菌的生理生化特征

检测项目	FS1491	FS1492	温和气单胞菌	检测项目	FS1491	FS1492	温和气单胞菌
			<i>A. sobria</i>				<i>A. sobria</i>
运动性	+	+	+	精氨酸双水解酶	+	+	+
靛基质	+	+	+	葡萄糖产酸	+	+	+
七叶苷	-	-	-	葡萄糖产气	+	+	+
硫化氢	-	-	-	麦芽糖	+	+	+
西蒙氏枸橼酸盐	-	-	-	蔗糖	+	+	+
甲基红	-	-	-	木糖	-	-	-
V-P	+	-	d	甘露醇	+	+	d
苯丙氨酸脱氨酶	+	+	+	肌醇	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	山梨醇	-	-	d
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	侧金盏花醇	-	-	-
精氨酸脱羧酶	+	+	+	水杨素	-	-	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性,“d”表示种间存在差异。

2.3 人工感染试验 人工感染后,高体革鲂从第 3 天开始死亡,死亡的鱼呈现出与自然发病的鱼相似的症状,从死亡的鱼体内可再次分离到原注射细菌。由表 2 可知,FS1491 和 FS1492 对高体革鲂的半致死剂量依次为 2.1×10^5 和 8.5×10^4 cfu/g。

表 2 人工感染试验结果

菌株	菌液浓度 cfu/ml	试验鱼数 尾	死亡数 尾	死亡率 %	半致死剂量//cfu/g
FS1491	1.69×10^4	10	2	20	2.1×10^5
	1.69×10^5	10	6	60	2.1×10^5
	1.69×10^6	10	7	70	2.1×10^5
	1.69×10^7	10	9	90	2.1×10^5
	1.69×10^8	10	10	100	2.1×10^5
FS1492	1.69×10^4	10	4	40	8.5×10^4
	1.69×10^5	10	7	70	8.5×10^4
	1.69×10^6	10	8	80	8.5×10^4
	1.69×10^7	10	9	90	8.5×10^4
	1.69×10^8	10	10	100	8.5×10^4
	1.69×10^9	10	10	100	8.5×10^4

2.4 16S rDNA 序列分析 将 FS1491 和 FS1492 所扩增的 16Sr DNA 的序列 (Accession No. KP168436 和 KP168437) 分别与 GenBank 中的序列进行比对,结果与温和气单胞菌同源性均为 100%,进一步鉴定此 2 株菌为温和气单胞菌。从图 1 可以看出,FS1491 和 FS1492 的 16S rDNA 序列与温和气单胞

菌的 16S rDNA 序列自然聚类。

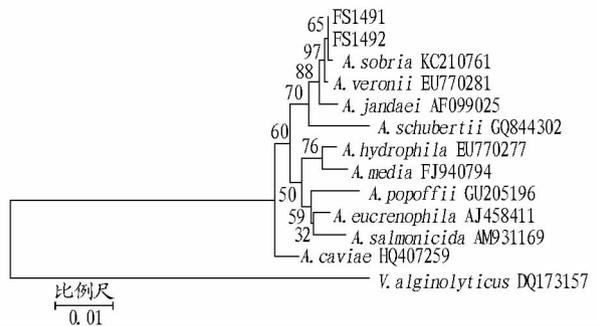


图 1 根据 FS1491 和 FS1492 的 16S rDNA 序列构建的系统发育树

2.5 药敏试验 由表 3 可知,根据美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 抗菌药物敏感性试验执行标准 (CLSI - M100 - S18)^[9],分离菌对头孢噻肟、环丙沙星、诺氟沙星和左氧氟沙星等抗生素高度敏感,对复方新诺明、头孢唑林、新霉素中度敏感,对利福平与林可霉素耐药。

3 讨论

温和气单胞菌广泛分布于养殖水体中,是危害我国淡水养殖业重要的致病病原之一。对水产养殖动物而言,温和气单胞菌属于条件病原菌,其主要致病因子为溶血素、肠毒素和细胞毒素等,在适宜条件下该菌即可大量繁殖而导致疾病暴发。温和气单胞菌感染的宿主较为广泛,目前已引起多种鱼类(如淡红墨头鱼 (*Garra rufa*)^[10]、尼罗罗非鱼 (*Oreochro-*

mis niloticus)^[11]、河鲈 (*Perca fluviatilis Linnaeus*)^[12]、黑鲫 (*Carassius carassius*)^[13]、革胡子鲶 (*Clarias gariepinus*)^[14]、斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*)^[15]、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[16]、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)^[17] 等) 的病害。该研究中从患病高体革鲮分离到温和气单胞菌, 在国内外尚属首次。

表 3 分离菌对 17 种抗生素的药敏试验结果

抗生素	含量 μg/片	抑菌圈直径//mm		敏感性
		FS1491	FS14912	
阿米卡星	30	20.0	20.0	S
卡那霉素	30	21.0	21.0	S
链霉素	10	17.0	17.0	S
复方新诺明	23.75/1.25	13.0	12.5	I
庆大霉素	10	20.0	20.0	S
头孢唑啉	30	18.0	18.0	I
四环素	30	26.0	26.0	S
头孢拉定	30	23.5	24.0	S
利福平	5	10.0	10.0	R
强力霉素	30	25.0	25.0	S
林可霉素	2	9.5	9.0	R
头孢噻肟	30	36.0	36.0	S
左氟沙星	5	27.0	27.0	S
诺氟沙星	10	26.0	26.5	S
多粘菌素 B	300	12.0	12.0	S
新霉素	30	18.0	18.0	I
环丙沙星	5	28.0	28.0	S

注:“S”为高度敏感,“I”为中度敏感,“R”为耐药。

根据分离菌的形态学特征、生理生化特性的检测结果, 参考《伯杰细菌鉴定手册》, 鉴定 2 株致病菌均为温和气单胞菌。通过对扩增到的分离菌的 16S rDNA 序列进行分析, 此 2 株菌与温和气单胞菌的同源性最高(100%)。用分离菌人工感染健康高体革鲮后, 从死亡的鱼体内分离到了原感染细菌, 证实此次分离到的 2 株温和气单胞菌即为该病的致病菌。FS1491 和 FS1492 对高体革鲮半致死剂量分别为 2.1×10^5 和 8.5×10^4 cfu/g, 说明此 2 株菌对高体革鲮均具有较强的致病力^[18]。

尽管抗生素的使用会引发水产动物生理障碍及药物残留、环境污染、水体中有益菌群失调以及病原菌的耐药性等问题, 但合理有效使用抗生素仍是目前水产养殖业细菌性疾病防治的主要方法。此次药敏试验结果表明, 分离到的 2 株温和气单胞菌对头孢噻肟、环丙沙星、诺氟沙星和左氟沙星的敏感性高, 可为该病暴发时治疗药物的选择提供参考。另外, 此结果与童桂香等^[19] 报道的黄沙鳖 (*Trionyx sinensis*) 源温和气单胞菌菌株在对四环素和庆大霉素的敏感性、韩英等^[20] 报道的黄河鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck

et Schlegel) 源温和气单胞菌菌株对卡那霉素的敏感性以及李槿年等^[21] 报道的鳊源温和气单胞菌菌株对环丙沙星的敏感性均有差异, 这可能与菌株来源于不同动物或养殖过程中长期使用某些药物导致致病菌产生耐药性有关。在防治温和气单胞菌引起的鱼类疾病过程中, 药物的选用应以不同菌株的药敏试验结果为主要依据, 避免因滥用药物导致该菌产生耐药性从而降低防治效果。

参考文献

- [1] 马国红, 刘羽清, 师吉华, 等. 高体革鲮幼鱼肌肉营养成分分析[J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(1): 90-93.
- [2] 叶旭红, 林先贵, 王一鸣. 养殖澳洲宝石鱼迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及致病基因的检测[J]. 淡水渔业, 2010, 40(1): 50-54.
- [3] 黄木珍, 黄维. 宝石鲈无乳链球菌病的分离鉴定及防治方法[J]. 海洋与渔业, 2013(12): 58-59.
- [4] 邱军强, 杨先乐, 李怡, 等. 高体革鲮链球菌出血性败血症病原与组织病理的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(2): 115-120.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 76-77.
- [6] 杨茂成. 兽医统计学[M]. 北京: 中国展望出版社, 1990.
- [7] XIAO J F, WANG Q Y, LIU Q, et al. Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China[J]. Aquac Res, 2009, 40(1): 13-17.
- [8] HOLT J G, KRIEGER, SNEATH PHA, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th) [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 203-204.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth Informational Supplement[S]. Pennsylvania USA, 2007: 36-42.
- [10] MAJTAN J, CERNY J, OFUKANA A, et al. Mortality of therapeutic fish *Garra rufa* caused by *Aeromonas sobria* [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2012, 2(2): 85-87.
- [11] LI Y, CAI S H. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail - rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Curr Microbiol, 2011, 62(2): 623-627.
- [12] WAHLI T, BURR S E, PUGOVKIN D, et al. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L [J]. J Fish Dis, 2005, 28(3): 141-150.
- [13] FICHI G, CARDETIG, COCUMELLI C, et al. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy [J]. J Fish Dis, 2013, 36(10): 823-830.
- [14] 黄钧, 施金谷, 黄艳华, 等. 革胡子鲶暴发性流行病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 广西畜牧兽医, 2012, 28(6): 323-326.
- [15] 苏应兵, 邹桂伟, 袁科平, 等. 斑点叉尾鲴暴发性败血症病原的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 37-41.
- [16] 黄钧, 温华成, 施金谷, 等. 黄颡鱼体表溃疡病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2012, 43(1): 107-112.
- [17] 张晓君, 邴旭文, 姚东瑞, 等. 泥鳅溃疡病及病原菌和气单胞菌生物学及分子特征研究[J]. 水产科学, 2010, 29(12): 696-702.
- [18] SANTOS Y, TORANZA A E, BARJA J L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish [J]. Infect Immun, 1988, 56: 3285-3293.
- [19] 童桂香, 韦信贤, 黎小正, 等. 黄沙鳖温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 广东农业科学, 2010(12): 124-126.
- [20] 韩英, 刘敏, 姜艳平. 鲤鱼出血病病原的研究和药敏试验[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(5): 593-597.
- [21] 李槿年, 魏梅芳. 鳊烂尾病病原的分离与鉴定[J]. 水利渔业, 2000, 20(4): 39-40.