

鲤嗜水气单胞菌感染症及其病原生物学特性

秦国民¹, 张晓君¹, 陈翠珍², 房海², 阎斌论¹

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 河北科技师范学院动物科学系, 河北 昌黎 066600)

摘要: 对一起养殖鲤 (*Cyprinus carpio*) 发生的病害进行了发病情况、临床特征、病理变化等方面的检验。以 3 尾病(死)鲤进行病变组织中的细菌检查及细菌分离, 对分离菌进行了形态特征、理化特性等较系统的表观分类学特征鉴定; 同时选择代表菌株进行了 16S rRNA 基因的分子鉴定, 测定了 16S rRNA 基因序列、分析了相关细菌相应序列的同源性、构建了系统发生树。结果表明, 分离菌为气单胞菌属 (*Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936) 的嗜水气单胞菌 [*A. hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943], 代表菌株 (HC060718-1 株) 16S rRNA 基因序列长度 (不包括引物结合区) 为 1 454 bp (GenBank 登录号: EF669478)。择代表菌株做对健康鲤的人工感染试验, 表明了分离鉴定的嗜水气单胞菌在被检鲤病例的相应原发病病原学意义及较强的致病作用。药敏试验结果显示, 对供试 37 种抗菌药物中的头孢噻肟等 23 种药物高度敏感, 对氨苄青霉素等 5 种药物敏感, 对青霉素 G 等 9 种药物耐药。

关键词: 鲤; 嗜水气单胞菌; 生物学特性

中图分类号: S941.42 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2008)02-0053-05

鲤 (*Cyprinus carpio*) 是我国淡水养殖的主导品种之一, 随着其养殖规模及养殖密度的不断扩大, 病害问题日趋严重, 尤其是由病原细菌引起的疾病已成为制约其养殖发展的明显障碍。在国内有关鲤细菌性病害已多有记载和报道, 如气单胞菌可引起鲤发生细菌性败血症、竖鳞病、暴发性传染病、体表出血感染症等 (汪开毓等, 1994; 安利国等, 1998; 陈怀青和陆承平, 1991; 张满隆等, 1999; 王振英等, 1993; 陈翠珍等, 1998)。

2006 年 7 月, 我们对河北秦皇岛某淡水养殖场发生的一起鲤病害进行了检验, 表明为由嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 所引起的感染。本文报告了对所检鲤嗜水气单胞菌感染发病情况及相应病原主要生物学性状, 旨在为对该病的有效检验与防治及对相应病原嗜水气单胞菌的进一步研究等提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 病例检验

对发病 (死) 鲤进行主要病理变化检验, 同时取其病变材料做抹片后, 以革兰氏染色镜检细菌, 并在此基础上进行细菌的分离与鉴定。

1.2 细菌分离与纯培养

取被检病死鲤病变组织, 划线接种于普通营养琼脂平板培养基, 28℃ 培养 48 h, 做细菌分离; 待分离细菌后, 分别选取其纯一或优势生长的细菌菌落移接于普通营养琼脂培养基斜面做纯培养 (28℃ 培养 24 h), 供鉴定用。

1.3 细菌鉴定

1.3.1 形态特征检查 取纯培养菌移接于普通营养琼脂斜面, 置 28℃ 培养 20 h 后, 制备成涂片标本, 经革兰氏染色镜检细菌形态。

1.3.2 菌落特征检查 取纯培养菌划线接种于普通营养琼脂、血液琼脂 (含 7% 家兔脱纤血的营养琼脂) 培养基平板, 置 28℃ 培养 24 h 和 48 h 分别检查生长情况及菌落特征。同时, 分别接种于普通营养肉汤 (管) 中, 置 28℃ 培养 24 h 检查液体培养的生长表现。

1.3.3 主要理化性状测定 取上述纯培养菌, 分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中, 按常规进行氧化酶、接触酶、糖 (醇及苷) 类代谢、H₂S 吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原、OF 试验、枸橼酸盐利用 (Simmons) 等较系统的理化特性测定, 试验主要参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英, 2001) 及《人及动物病原细菌学》(杨正时和房海, 2003)。

1.3.4 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析
1.3.4.1 PCR 模板 DNA 的制备 选择代表菌株, 接种于 LB 肉汤中 28℃ 培养 16 h, 按小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (大连宝生物工程有限公司产, 批号 DV810A) 所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板

收稿日期: 2007-09-04

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2005000498)。

作者简介: 秦国民, 1967 年生, 男, 河北卢龙人, 讲师, 主要从事水产动物病害及病原微生物学研究。E-mail: zxp307@163.com

DNA。

1.3.4.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序
16S rRNA 基因 PCR 扩增的 2 个引物分别为 27F(正向引物): 5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8~27 个碱基位置)、1492R(反向引物): 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492~1510 个碱基位置)(Martin & Collier, 1998)。在 20 μ L 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 μ L, 1 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ L, 1.5 mmol/L MgCl₂ 1.6 μ L, 4 $\times$ dNTP 混合物 0.4 μ L, 引物各 0.2 μ L, 2.5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 模板 DNA 1 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 温育 6 min。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(Wizard PCR Prep, Promega)纯化后, 由上海博亚生物工程技术公司使用 3730 测序仪进行基因序列测定。

1.3.4.3 16S rRNA 基因序列系统发育树构建
分别对供试 3 个菌株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析, 并使用 ClustalK 1.8 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列, 进行多序列匹配排列(Multiple Alignments), 采用邻接法(neighbor joining method)获得分支系统树, 并通过 Bootstrap 法(重复 1 000 次)检验。

1.4 菌种分类位置确定

根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果, 主要参照《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed》(Holt et al 1994)、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(Krieg & Holt 1984)、《Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish》(Austin & Austin 1999)及有关资料, 并结合 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析的结果, 对供试菌进行菌种归类判定。

1.5 人工感染试验

取分离菌对健康鲤做人工感染试验。将供试代表菌株接种于普通营养肉汤 28 $^{\circ}$ C 培养 20 h 作为供试菌液(3×10^8 CFU/mL), 经腹腔接种健康鲤, 每尾接种 0.3 mL, 共 6 尾; 同时设立同剂量、同批无菌营养肉汤接种的对照; 均隔离养殖于试验水族箱中, 每天观察其感染后的发病与死亡情况, 以复制出同自然病例样的感染症并能重新分离回收至原感染菌作

为相应病原菌的判定指标。

1.6 药物敏感性测定

采用琼脂扩散法(K-B), 进行分离菌对常用抗菌类药物的敏感性测定, 以出现的抑菌圈直径作为相应的敏感与耐药判定指标(叶应妩和王毓三, 1997)。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变特征

河北秦皇岛某淡水养渔场所养鲤, 于 2006 年 7 月中旬有明显发病并时有死亡鱼。对送检的 5 尾鲤(发病濒死的 3 尾、刚刚死亡的 2 尾)进行检验, 3 尾病(死)鱼表现为体表有不同程度的出血和鳍出血; 剖检见 5 尾鱼均有不同程度的肝脏肿胀, 肠管出血, 2 尾鱼腹腔内有淡红色腹水, 肾脏不同程度肿胀, 2 尾肠胀气(肠内有较稀黏液)。

2.2 病变组织中的细菌

取上述剖检的 2 尾病死鲤的肝脏和肾脏组织做抹片后, 经革兰氏染色镜检发现均有大量细菌, 形态特征为革兰氏染色阴性、杆状及短杆状, 两端钝圆, 散在(个别的成双), 无芽孢, 大小多在(0.5~1.0) μ m $\times$ (1.0~2.5) μ m。

2.3 细菌分离

以上述剖检和镜检细菌的 2 尾病死鲤肾脏组织为材料分离细菌, 得到菌落数量较多且为同一种细菌的菌落。菌落特征为圆形光滑、边缘整齐、较隆起、不透明的浅灰黄白色。24 h 检查, 直径多在 1.6 mm 左右; 48 h 时, 多在 1.8 mm 左右, 生长良好。随机从每尾鱼分离菌各取 1 个菌落做纯培养, 共 2 株, 编号为: HC060718-1 和 HC060718-2 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存供鉴定用。

2.4 分离菌的鉴定

2.4.1 形态特征 2 株菌的形态一致, 均为革兰氏染色阴性、两端钝圆、散在或个别成双排列、无芽孢、大小多在(0.5~1.0) μ m $\times$ (1.0~2.0) μ m 的杆菌。

2.4.2 培养特性 在普通营养琼脂上的菌落特征和生长情况同从病料中直接分离的; 在血液营养琼脂上, 与在普通营养琼脂上的一致, 48 h 菌落直径多在 2.0 mm, β 型溶血。在普通营养肉汤的液体培养基中, 呈均匀混浊生长, 管底有圆点状沉淀菌体(摇动后呈线状上升、易消散), 有轻度菌环(摇动后易消散)。

2.4.3 理化性状 供试 2 株纯培养菌对所测主要理化性状的反应结果一致, 具体见表 1。

表 1 分离菌的理化特性

Tah 1 Physiological and biochemical characteristics			
项目	结果	项目	结果
37℃生长	+	α-甲基-D-葡萄糖苷	-
氧化酶	+	乳糖	-
接触酶	+	海藻糖	+
产H ₂ S(纸条法)	+	甘露糖	-
O-F试验	F	果糖	+
动力	+	甘露醇	-
明胶液化	+	山梨糖	-
枸橼酸盐利用	+	糊精	+
葡萄糖产酸	+	卫茅醇	-
葡萄糖产气	+	甘油	+
山梨醇	-	麦芽糖	-
蜜二糖	-	尿素酶	-
棉子糖	-	苯丙氨酸脱氨酶	+
菊糖	-	卵磷脂酶	+
水杨苷	+	乙酰胺酶	+
侧金盏花醇	-	淀粉酶	+
纤维二糖	-	吡啶	+
半乳糖	+	甲基红	-
蛋白酶	+	V-P试验	+
DNA酶	+	0% NaCl中生长	+
蔗糖	-	1% NaCl中生长	+
鼠李糖	-	6% NaCl中生长	+
肌醇	+	丙二酸盐利用	+
木糖	-	吐温 80	+
苦杏仁苷	-	硝酸盐还原	-
阿拉伯糖	-		

注: + 示阳性, - 示阴性, F 示发酵型。
Notes The table symbol“+” positive,“-” negative,“F” ferment

2.4.4 16S rRNA 基因序列与系统发育学 取 HC060718-1 株作为代表菌株进行 16S rRNA 基因序列与系统发育学分析, 其 16S rRNA 基因序列长度(不包括引物结合区)为 1 454bp(GenBank 登录号: EF669478)。将 HC060718-1 株的 16S rRNA 基因序列在国际互联网上进行同源性检索, 结果均与气单胞菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类。在检索出的嗜水气单胞菌序列中, HL060811-1 株与它们的同源性分别在 98% 至 100%。选取了其中部分菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 1 所示。

根据 2 株分离菌的形态特征及理化特性, 结合 16S rRNA 序列测定与系统发育分析结果, 判定其为气单胞菌属的嗜水气单胞菌。

2.5 人工感染试验

择 HC060718-1 株按 1.5 中所述进行的人工感染试验, 感染后 1d(死亡 1 尾)、2d(死亡 2 尾)、3d(死亡 1 尾)共死亡 4 尾(死亡率 66.7%)。剖检可见鱼体不同程度的肝脏肿胀、肾脏肿胀、肠管充血并有出血, 有 3 尾存在不同量的腹水(淡红色)。取感染死亡 2 尾鱼的肝做细菌分离, 均回收到了原感染

菌, 余 2 尾和对照 4 尾养殖观察 10d 均正常存活。
2.6 药物敏感性

取 HC060718-1 株菌, 测定对 37 种抗菌类药物的敏感性。结果均对供试的头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮、头孢吡肟、氨基南、红霉素、阿奇霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素、妥布霉素、丁胺卡那霉素、新霉素、大观霉素、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、四环素、氯霉素、复方新诺明、呋喃妥因、恩诺沙星共 23 种药物高度敏感(抑菌圈直径在 22~40mm); 对头孢唑啉、多西霉素、多黏菌素 R 利福平、甲氧苄啶、呋喃唑酮共 6 种药物敏感或低敏(抑菌圈直径在 12~18mm); 对青霉素 G、苯唑青霉素、氨苄青霉素、头孢拉啶、克林霉素、万古霉素、新生霉素、杆菌肽共 8 种耐药(无抑菌圈形成)。

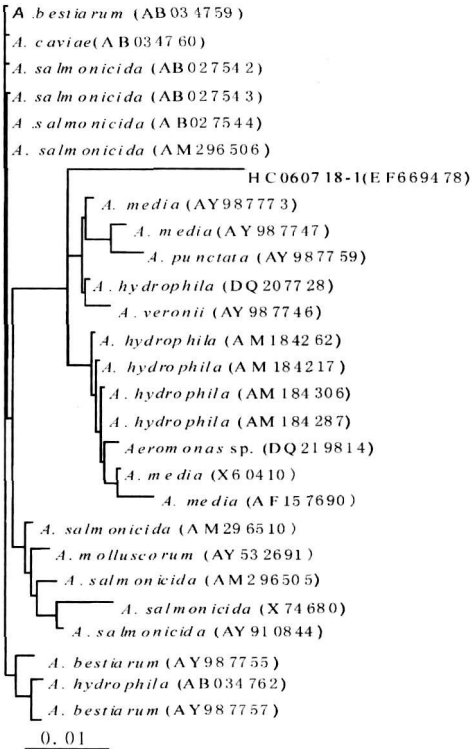


图 1 16S rRNA 基因序列系统发育树
(AB034759~AY987757 为菌株在 NCB I 的登录号)
Fig 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (AB034759~AY987757 were database accession numbers in NCB I).

3 结语与讨论

嗜水气单胞菌在有的资料中也记作亲水气单胞菌, 为气单胞菌属细菌中较早的成员, 是一种在水体中广泛存在的细菌, 可引起鱼类及其它水产养殖动物的多种病害。该菌最早是由 Sanarelli 在 1891 年从受感染的青蛙中分离到的, 并确认该菌能使青蛙

发生红腿病 (red leg disease), 但由于该菌在自然界尤其是水体中广泛分布, 一般为正常共栖菌, 因此在较长的一段时期对其致病性并未能引起高度重视。随着水产养殖生产的发展, 经常从一些水产养殖动物的暴发病例中检出该菌并确定了它的原发病原学意义, 才使人们注意到了它对水产养殖的严重危害性。

在我国, 近些年来也多有因嗜水气单胞菌引起水产养殖动物暴发性病害的报道, 可引起鲢、鳙、鲤、鳊、鲮鱼、鳊鱼、银鲫、异育银鲫、团头鲂、麦穗鱼、黄尾密鲮、吻鲮、金鱼、香鱼、黄鳝、泥鳅、草鱼等多种淡水养殖鱼类发生相应的细菌性败血症, 且常表现为发病急剧、高发病率和致死率; 同时, 也有记述该菌可引起环节动物门的宽体金线蛭发生细菌性败血症, 可引起陆生动物如猪、鸭、家兔等感染发病 (张晓君等, 2006; 邓绍基, 2000; 李克敏等, 1998; 韦强等, 1990); 另外, 该菌也属于人的一种条件致病菌, 能引起人的食物中毒、介水传染病、感染性腹泻、继发感染、败血症等 (杨守明和王民生, 2006)。因此, 目前已跃然成为引人注目的人及动物共患病的重要病原 (聂青和, 2000)。

本次所检鲤病例表现为败血症感染病变。通过对自然病死鱼肝和肾等病变组织做直接染色标本发现细菌、有规律地分离到细菌并经鉴定表明为同种细菌、对用健康鲤做人工感染试验复制出同自然病例的发病与死亡并回收得到原感染菌等方面的研究, 以及对分离菌进行了主要理化特性方面较系统的表观分类学指征检验及系统发育学分析, 表明所检出的细菌为嗜水气单胞菌且为被检鲤病例的相应病原菌, 证明了其原发病原学意义, 进一步表明了该菌在水产养殖动物中的广泛致病作用。对分离菌株的药物敏感性测定结果, 可作为在药物防治嗜水气单胞菌感染时选择用药及对嗜水气单胞菌耐药规律研究的参考。

参考文献:

- 安利国, 傅荣恕, 邢维贤, 等. 1998 鲤竖鳞病病原及其疫苗的研究 [J]. 水产学报, 22(2): 136-141.
- 陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 1998 鲤鱼体表出血感染症的病原菌检验 [J]. 河北农业技术师范学院学报, 12(1): 10

- 14

- 陈怀青, 陆承平. 1991 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究 [J]. 南京农业大学学报, 14 (4): 87-91.
- 邓绍基. 2000 一起猪嗜水气单胞菌病的诊疗报告 [J]. 当代畜牧, (5): 28-29
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社.
- 李克敏, 黄文贤, 袁锦和, 等. 1998 鸭嗜水气单胞菌病的病原鉴定和免疫试验 [J]. 中国兽医杂志, 24 (12): 13-14.
- 聂青和. 2000 感染性腹泻病 [M]. 北京: 人民卫生出版社.
- 汪开毓, 冯泽光, 冯炳芳. 1994 鲤鱼细菌性败血症的病原分离鉴定 [J]. 四川农业大学学报, 12 (2): 298-303.
- 王振英, 李学勤, 马家好, 等. 1993 鲤鱼豚鼠气单胞菌感染症的研究 I. 病原分离鉴定 [J]. 兽医大学学报, 13 (1): 55-57
- 韦强, 佟承刚, 陶秀荣. 1990 从家兔中分离到一株嗜水气单胞菌的鉴定 [J]. 中国人兽共患病杂志, 6(1): 57-58
- 杨守明, 王民生. 2006 嗜水气单胞菌及其对人的致病性 [J]. 疾病控制杂志, 10(5): 511-514
- 杨正时, 房海, 主编. 2003 人及动物病原细菌学 [M] 石家庄: 河北科学技术出版社.
- 叶应妩, 王毓三. 1997 全国临床检验操作规程 (第 2 版) [M]. 南京: 东南大学出版社.
- 张满隆, 卢彤岩, 刘红柏, 等. 1999 鲤隐性败血症病原菌的分离与鉴定 [J]. 水产学杂志, 12(1): 38-41.
- 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 2006 宽体金线蛭嗜水气单胞菌感染的病原检验 [J]. 微生物学通报, 33(1): 46-52
- Austin B & Austin D A. 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish [M]. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Krieg N R & Holt J G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Volume 1. London. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Martin F Polz & Colleen M. Cavanaugh. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR [J]. Appl Environ Microbiol. 64 (10): 3724-3730

(责任编辑 万月华)

Infection and Biological Characterization of *Aeromonas hydrophila* from Diseased carp *Cyprinus carpio* L.

QIN Guo-min¹, ZHANG Xiao-jun¹, CHEN Cuizhen², FANG Hai², YAN Birlun¹

(1. College of Ocean, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

2. Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, China)

Abstract The bacterial septicaemia of carp *Cyprinus carpio* were examined, including development of infection, clinical appearance, pathological changes and biological characteristics of pathogenic bacteria. The pathogenic bacteria from tissues of three diseased (or dead) carps were examined and isolated, identification of phenotypic information of isolates was conducted extensively, including the morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics; in addition, the molecular identification of representative strain was conducted, the 16S rRNA gene was sequenced and compared with that of related strains, molecular phylogenetic tree was constructed. The results showed that the identified strain belonged to *Aeromonas hydrophila* [(Chester 1901) Stanier 1943] of *Aeromonas* (Kluyver and van Niel 1936), the sequenced 16S rRNA gene of strain HC060718-1 (GenBank accession No. EF669478) is 1454bp in length. The artificial infection experiment of representative strain to healthy carp was conducted, the results showed the corresponding primitive causal agent of the disease and strong pathogenicity of *A. hydrophila* to examined carp. Antibiotic sensitivity using 37 antimicrobial agents showed that isolates were high sensitive to 23 agents including cefotaxime, were sensitive to 5 agents including ampicillin, were resistant to 9 agents including penicillin G.

Key words *Cyprinus carpio* L.; *Aeromonas hydrophila*; biological characterization