

鲫鱼维隆气单胞菌和腐败希瓦菌的分离鉴定、致病性和药敏分析

梅 寒, 王鑫毅, 卜令飞, 金 珊*, 赵青松, 陈寅儿

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832)

摘要: 从患病鲫鱼肝、肾、血体内分离到 JYV1605101 和 JYF1605102 2 株细菌, 人工感染试验和溶血活性测定表明这 2 株菌对健康鲫鱼具有较强毒性, 菌株 JYV1605101 对鲫鱼 LD₅₀ 为 3.31×10^3 cfu·g⁻¹, 对绵羊、小鼠、乌鳢、鲫鱼、鲤鱼、加州鲈等 6 种动物血细胞呈 β 溶血; 菌株 JYF1605102 对鲫鱼 LD₅₀ 为 1.48×10^2 cfu·g⁻¹, 对乌鳢、鲫鱼、鲤鱼、加州鲈的血细胞呈 β 溶血, 但对绵羊和小鼠血细胞呈 α 溶血. 经形态学观察, 生理生化试验及 16S rDNA 基因序列分析, 鉴定菌株 JYV1605101 为维隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*), 菌株 JYF1605102 为腐败希瓦菌(*Shewanella putrefaciens*). 菌株 JYV1605101 具有胞外蛋白酶、明胶酶、淀粉酶活性, 不具有脲酶、脂酶和卵磷脂酶活性; 菌株 JYF1605102 具有胞外蛋白酶、明胶酶活性, 不具有脲酶、脂酶、淀粉酶和卵磷脂酶活性. 药敏试验表明, 2 株菌都对其中的 18 种药物较敏感, 根据渔业用药规定和常用药情况, 氟苯尼考、四环素、米诺环素、强力霉素可作为鲫鱼维隆气单胞菌和腐败希瓦菌感染的候选控制药物.

关键词: 鲫鱼; 维隆气单胞菌; 腐败希瓦菌; 鉴定; 药敏试验

中图分类号: S917.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 01-0006-08

鲫鱼(*Carassius auratus*)广泛分布于全国各地水域, 其食用药用价值较高, 深受消费者喜爱, 是淡水养殖范围最广的一种经济鱼类, 我国年产量近 3.00×10^6 t. 由于高密度的养殖及不适当的管理措施, 近几年鲫鱼病害频繁暴发, 新的病原也不断出现. 目前已报道的鲫鱼病原主要有粘孢子虫(*Myxosporea* sp.)、指环虫(*Dactylogyrus* sp.)、锚头蚤(*Lernaea* sp.)等寄生虫^[1], 气单胞菌(*Aeromonas* sp.)^[2]、戴氏西地西菌(*Cedeceadavisae* sp.)^[3]、希瓦菌(*Shewanella* sp.)^[4]、柠檬酸杆菌(*Citrobacter* sp.)^[5]、邻单胞菌(*Plesiomonas* sp.)^[6]、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)^[7]、极毛杆菌(*Pseudomonas* sp.)^[1]等细菌, 鲤疱疹病毒 II 型(*Cyprinid Herpesvirus* II)^[8]、呼肠弧病毒(*Reoviridae* sp.)^[9]、类疱疹病毒(herpes-like virus)^[10]等病毒及水霉(*Saprolegnia* sp.)等真菌^[1]. 其中粘孢子虫病和由鲤疱疹病毒 II 型引

发的“鳃出血病”是目前鲫鱼的 2 大主要疾病^[8].

2016 年 5 月宁波某养殖场的鲫鱼出现批量死亡现象, 死亡率在 30% 以上. 病鱼主要症状为头部、腹部及鳍基等部位出血或充血, 有的眼球突出, 肝组织变软, 偶有明显的淤血斑点, 脾脏略肿大, 呈红黑色, 肾略肿, 腹腔有少量淡红色的积水. 为探明发病原因, 本文对患病鲫鱼进行了组织显微镜检查、病原的分离和分子鉴定、人工回归感染试验, 确认引起本次鲫鱼发病的致病菌为维隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)和腐败希瓦菌(*Shewanella putrefaciens*).

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用鱼

患病鲫鱼采自宁波某养殖池塘, 体重(250±50)

收稿日期: 2018-06-28.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41673076); 宁波大学学科项目(XKZSC1503).

第一作者: 梅寒(1992-), 女, 吉林吉林人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产病害防控. E-mail: meihan009@163.com

*通信作者: 金珊(1964-), 女, 浙江天台人, 教授, 主要研究方向: 水产动物病害防控. E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

$\text{g}\cdot\text{尾}^{-1}$; 健康鱼购自宁波另一养殖场, 体重(250 ± 20) $\text{g}\cdot\text{尾}^{-1}$, 经暂养 1 周确定无异常后进行实验.

1.1.2 主要试剂及药品

营养琼脂(NA)、胰蛋白胨琼脂(TSA)、血琼脂基础、药敏纸片等, 杭州滨和微生物试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 细菌通用引物 27F 和 1492R, 上海华大基因科技有限公司; API 20E 和 API 20NE 细菌鉴定试剂盒, 生物梅里埃(中国)有限公司; 绵羊血琼脂平板, 青岛海博生物有限公司.

1.2 方法

1.2.1 病鱼细菌分离及纯化

取典型症状的病鱼数尾, 75%酒精棉球擦拭消毒病鱼体表后, 解剖病鱼, 无菌操作取肝、肾、血液等处划线接种于 NA、TSA 平板, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 挑取形态特征一致的优势菌划线纯化, 取单菌落接种于斜面培养并保存.

1.2.2 病原菌的形态观察及生理生化鉴定

病原菌接种 TSA 平板 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后进行革兰氏染色及电镜样品制作, 电镜制样参考王鑫毅等^[11]方法, 日立 H-7650 电镜观察菌体形态. 生理生化试验采用 API 20E 和 API 20NE 细菌鉴定试剂盒并参考 Satomi 等文献^[12-15]进行.

1.2.3 病原菌的 16S rDNA 序列分析

引物 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r(5'-TACGTTACCTTGTTACGACTT-3') 用来对分离菌的 16S rDNA 基因序列进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$, 其中 $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $5.0\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$ $4.0\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 模板 DNA, Taq DNA 聚合酶($2.5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $36\text{ }\mu\text{L}$. PCR 扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, PCR 产物送上海华大基因公司完成测序.

将所测得的分离菌 16S rDNA 基因序列上传至 Genbank 数据库, 利用 BLAST 进行序列同源性比对, 上传至 EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) 与标准菌株进行相似性比较. 采用 ClustalX 软件进行多序列比对, 利用 MEGA 7 软件, 采用邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树, 通过自举分析 (bootstrap) 1 000 次, 检测置信度.

1.2.4 分离菌致病性试验

根据 1.2.2 和 1.2.3 细菌鉴定结果, 本次从病鱼中分离到的细菌为 2 种, 选取编号为 JYV1605101 和 JYF1605102 的 2 种代表菌株进行人工感染试验. 试验在 $120\text{ cm}\times 80\text{ cm}\times 50\text{ cm}$ 的塑料桶中进行, 每桶放养健康鲫鱼 10 尾, 水温(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 连续充气, 暂养 7 d 后进行感染试验. 单菌感染试验共分为 2 大组, 每组中又分 6 组, 其中每组中的 1~5 组为感染组, 第 6 组为对照组. 混合感染试验设 2 个试验组和 1 个对照组. 分离菌接种 TSA 斜面, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后根据麦氏浊度管无菌生理盐水制成菌浓度约为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 $10^4\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 细菌量通过平板活菌计数确定. 单菌感染组每个菌浓度肌肉注射 10 尾, 每尾注射 0.2 mL , 对照组 10 尾注射同量无菌生理盐水. 混合感染组取 2 株菌的 $10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 菌液各 0.1 mL 注射, 其他方法同单菌感染组. 试验期间随时观察鲫鱼并记录感染与死亡情况, 一旦发现死鱼立即取出进行解剖, 取鱼主要组织进行细菌再分离, 并鉴定细菌. 参考孙瑞元^[16]方法计算细菌半致死量.

1.2.5 病原菌的溶血活性和胞外酶活性测定

胞外酶活性的测定参考王鑫毅等^[11]方法进行. 溶血活性测定采用商品绵羊血琼脂平板和自制血琼脂平板. 血琼脂平板制作参考徐华^[17]方法, 将采好的小鼠、乌鳢、鲫鱼、鲤鱼、加州鲈等血分别注入灭菌试管中, 用竹签轻轻搅动, 直到看见竹签上裹有纤维蛋白, 留下的血液即为脱纤维血液. 取各脱纤维血液 1 mL , 分别加入 20 mL 灭菌的血琼脂基础中, 制成血琼脂平板.

1.2.6 病原菌的药敏试验

病原菌接种 TSA 斜面, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h 后制成浓度约 $10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌悬液均匀涂布 TSA 平板上, 贴上药敏纸片, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24 h, 测量抑菌圈的直径, 药物敏感性判定根据杭州滨和微生物试剂有限公司提供的药敏判读标准进行.

2 结果

2.1 病原菌的分离及菌株形态特征

从患病鲫鱼体内分离的细菌中选取菌落形态明显不同的 2 株优势菌进行纯化培养, 编号分别为

JYV1605101 和 JYF1605102. 在 TSA 培养基上 28℃ 培养, 2 株菌都生长良好, 培养 24 h 菌落直径 1~2 mm. 菌株 JYV1605101 菌落呈圆形, 表面光滑, 颜色灰白, 不透明; 菌株 JYF1605102 菌落呈暗红色, 表面光滑, 不透明且湿润. 在 TSA 平板上 28℃ 培养 18 h 做革兰氏染色和电镜观察. 结果显示, 菌株 JYV1605101 和菌株 JYF1605102 均为革兰氏阴性杆菌, 大多散在, 两端钝圆, 有极生单鞭毛, 具有纤毛, 无芽孢和荚膜, 菌株 JYV1605101 菌体大小为 $(0.5\sim0.8)\mu\text{m}\times(1.0\sim2.3)\mu\text{m}$, 菌株 JYF1605102 大小为 $(0.5\sim0.8)\mu\text{m}\times(1.5\sim2.8)\mu\text{m}$, 如图 1 所示.

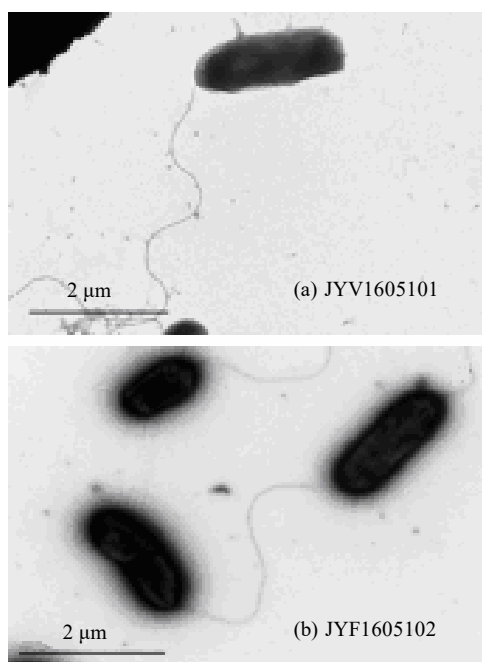


图 1 二株分离菌的菌体形态

2.2 菌株 JYV1605101 和 JYF1605102 的生理生化鉴定

采用 API 20E 和 API 20NE 试剂盒并参考文献 [12-15] 对菌株 JYV1605101 和 JYF1605102 进行生理生化鉴定, 结果见表 1 和表 2. 菌株 JYV1605101 具有鸟氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶、氧化酶和过氧化氢酶阳性, 能发酵葡萄糖产酸产气, 液化明胶, 还原硝酸盐, 但不能在 6% NaCl 中生长, 脲酶阴性. 以上主要特征与赵乃昕等^[14]以及房海等^[15]对维隆气单胞菌的描述完全一致, 因此, 认为菌株 JYV1605101 可能为维隆气单胞菌(*A. veronii*). 菌株 JYF1605102 具有氧化酶、过氧化氢酶、鸟氨酸脱羧酶阳性, 还原硝酸盐, 能水解甘露醇、麦芽糖,

不产吲哚, 不能利用柠檬酸盐、葡萄糖、七叶灵, 没有尿酶, 赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶阴性. 以上试验结果与 Satomi 等^[12]和 Ziemke 等^[13]描述的希瓦菌属细菌主要特征完全符合, 因此, 认为菌株 JYF1605102 为希瓦菌属(*Shewanella* sp.)细菌. 此外, 根据赵乃昕等^[14]的描述, 菌株 JYF1605102 生理生化试验结果与腐败希瓦菌(*S. putrefaciens*)表型特征较一致.

表 1 2 菌株的 API 20E 反应及其他生理生化试验结果

试验项目	维隆气单胞菌	JYV 1605101	腐败希瓦菌	JYF 1605102
β-半乳糖苷酶	+	+	-	-
精氨酸双水解酶	V	+	-	-
赖氨酸脱羧酶	+	+	-	-
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	+
柠檬酸利用	+	+	-	-
H ₂ S 产生	-	-	+	+
脲酶	-	-	-	-
色氨酸脱氨酶	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶	V	+	-	-
吲哚产生	+	+	-	-
Vp 试验	+	+	+	+
明胶酶	+	+	V	+
葡萄糖	+	+	-	-
甘露醇	+	+	+	+
肌醇	-	-	-	-
山梨醇	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-
蔗糖	+	+	-	+
密二糖	-	-	-	-
苦杏仁甙	+	+	+	+
阿拉伯糖	-	-	-	-
氧化酶	+	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+
脂酶	+	+	-	-
淀粉酶	+	+	-	-
卵磷脂酶	-	-	-	-
蛋白酶	+	+	+	+
37℃ 生长	+	+	V	+
4℃ 生长	+	+	+	+
42℃ 生长	+	+	-	-
6% NaCl	-	-	-	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性, “V”表示不定, 下表同.

表 2 2 菌株的 API 20NE 反应结果

试验项目	维隆气 单胞菌	JYV 1605101	腐败希瓦 菌	JYF 1605102
硝酸盐还原	+	+	+	+
吡嗪产生	+	+	-	-
精氨酸双水解酶	V	+	-	-
脲酶	-	-	-	-
七叶灵	+	+	-	-
明胶酶	+	+	+	+
β-半乳糖苷酶	+	+	-	-
葡萄糖	+	+	-	-
阿拉伯糖	-	-	+	-
甘露糖	+	+	-	-
甘露醇	+	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺	NA	-	+	+
麦芽糖	+	+	+	+
葡萄糖酸盐	NA	-	-	-
癸酸	NA	-	-	-
己二酸	-	-	NA	-
苹果酸	NA	-	+	-
柠檬酸	+	-	-	-
苯乙酸	NA	+	NA	-
氧化酶	+	+	+	+

注: “NA”表示未检测。

2.3 菌株 JYV1605101 和 JYF1605102 的 16S rDNA 基因序列分析

对菌株 JYV1605101 和 JYF1605102 的 16S rDNA 扩增后的序列进行测序, 得到片段长度分别为 1 465 bp(GenBank 登录号为 KU163442)和 1 463 bp(GenBank 登录号为 KU163441)。采用 BLAST 对菌株 JYV1605101 和 JYF1605102 的 16S rDNA 序列进行同源性比对, 结果显示: 菌株 JYV1605101 与维隆气单胞菌 KF358431 的同源性为 99%; 菌株 JYF1605102 序列同源性>99%的都是腐败希瓦菌(个别未鉴定到种的希瓦菌属成员除外); 采用 EZBioCloud 网站的标准菌株比对结果, 菌株 JYV1605101 与维隆气单胞菌 CECT4257 的 16S rDNA 序列相似性为 99.86%, 菌株 JYF1605102 与腐败希瓦菌 JSM20190 序列的 16S rDNA 相似性为 99.58%。

利用 MEGA 5.05 软件, 采用邻位相连法构建系统发育树, 如图 2 和图 3 所示, 结合形态特征和

生理生化特性鉴定结果, 菌株 JYV1605101 鉴定为维隆气单胞菌(*A. veronii*), 菌株 JYF1605102 鉴定为腐败希瓦菌(*S. putrefaciens*)。

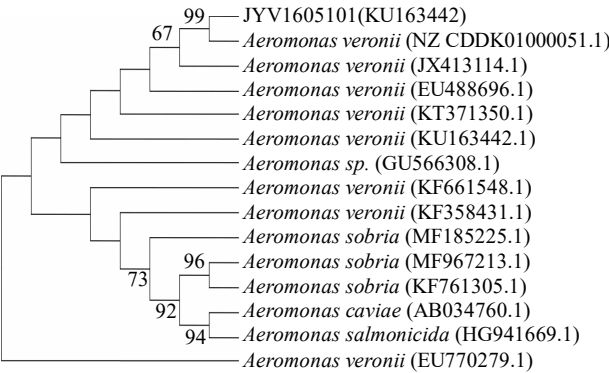


图 2 菌株 JYV1605101 的 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

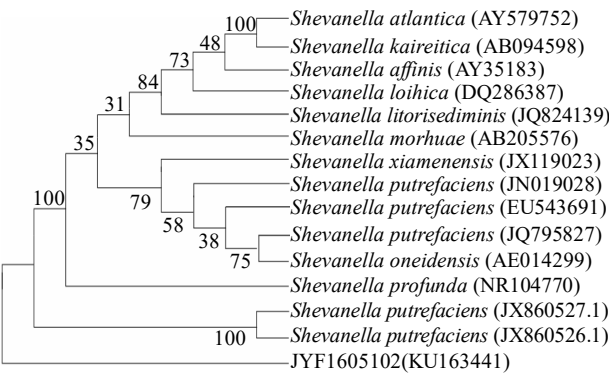


图 3 菌株 JYF1605102 的 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

2.4 维隆气单胞菌 JYV1605101 和腐败希瓦菌 JYF1605102 的致病性试验

采用维隆气单胞菌 JYV1605101 和腐败希瓦菌 JYF1605102 对鲫鱼进行人工回归感染试验, 结果见表 3。肌肉注射 JYV1605101 和 JYF1605102, 感染组鲫鱼均可呈现游动无力、呼吸缓慢、食欲降低, 高浓度感染组感染鱼腹部、鳍基等部位呈出血症状, 部分鱼体表出现溃烂, 解剖可见肝组织变软、糜化、有色斑, 肾略肿, 病鱼症状与感染浓度呈正相关, 实验组鱼出现的病症与自然发病鱼相似(图 4)。根据感染试验死亡率, 计算出 JYV1605101 和 JYF1605102 对鲫鱼的 LD₅₀ 分别为 3.31×10³ 和 1.48×10² cfu·g⁻¹。其中 JYF1605102 感染组还可出现腹腔积水, 脾脏肿大、呈暗红色等症状。以 JYV1605101 菌 5.20×10⁷ cfu·mL⁻¹ 和 JYF1605102 菌 4.63×10⁷ cfu·mL⁻¹ 各 0.1 mL 对鲫鱼进行混合注

表3 二菌株对鲫鱼的感染试验结果

菌株	组别	试验数	菌液浓度/ (cfu·mL ⁻¹)	剂量/mL	感染后不同时间的死亡数/尾								死亡率/%
					1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	
JYV1605101	1	10	5.20×10 ⁸	0.2	1	0	1	1	3	2	1	1	100
	2	10	5.20×10 ⁷	0.2	0	0	1	1	1	2	1	2	80
	3	10	5.20×10 ⁶	0.2	0	1	0	0	1	1	2	0	50
	4	10	5.20×10 ⁵	0.2	0	0	0	1	0	0	0	1	20
	5	10	5.20×10 ⁴	0.2	0	0	0	0	1	0	0	0	10
	对照组	10	生理盐水	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JYF1605102	1	10	4.63×10 ⁷	0.2	1	1	0	3	1	3	1	0	100
	2	10	4.63×10 ⁶	0.2	0	0	1	1	2	2	3	0	90
	3	10	4.63×10 ⁵	0.2	0	0	0	1	2	1	2	1	70
	4	10	4.63×10 ⁴	0.2	0	0	0	0	1	0	2	0	30
	5	10	4.63×10 ³	0.2	0	0	0	0	1	0	0	0	10
	对照组	10	生理盐水	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

射感染试验,感染组在实验 7 d 时死亡率为 100%. 对各感染组的发病鱼进行细菌分离,可获得与 JYV1605101 和 JYF1605102 形态特征完全一致的菌株,表明 JYV1605101 和 JYF1605102 对鲫鱼有较强的致病性.

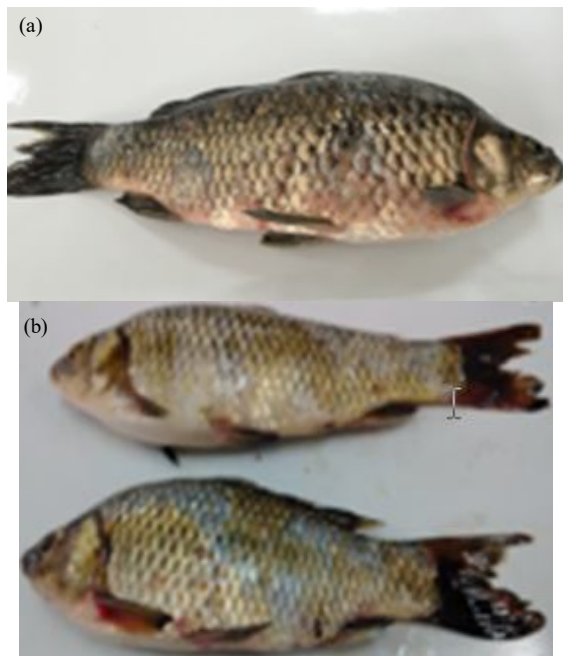


图4 (a)感染发病鱼和(b)自然发病鱼

2.5 维隆气单胞菌 JYV1605101 和腐败希瓦菌 JYF1605102 的溶血活性

由绵羊、小鼠、乌鳢、鲫鱼、鲤鱼、加州鲈等 6 种动物的血制成血琼脂平板进行病原菌溶血活性

的试验结果见表4, 维隆气单胞菌 JYV1605101 对 6 种动物的血细胞都具有溶血作用, 呈 β 溶血, 溶血能力乌鳢 > 加州鲈 > 鲫鱼 > 鲤鱼 > 小鼠 > 绵羊. 而腐败希瓦菌 JYF1605102 对乌鳢、鲫鱼、加州鲈呈完全(β)溶血, 但其对绵羊和小鼠的溶血不完全, 呈 α 溶血, 溶血能力乌鳢 > 鲫鱼 > 加州鲈 > 鲤鱼 > 小鼠 > 绵羊.

表4 2 菌株对 6 种动物血细胞的溶血活性 mm

动物	透明圈直径	
	JYV1605101	JYF1605102
鲫鱼	14	20
鲤鱼	11	14
乌鳢	17	22
加州鲈	15	17
绵羊	5	3
小鼠	7	4

2.6 维隆气单胞菌 JYV1605101 和腐败希瓦菌 JYF1605102 的药敏试验结果

对维隆气单胞菌 JYV1605101 和腐败希瓦菌 JYF1605102 进行了 36 种药物的敏感性测定, 结果见表 5. 根据杭州滨和微生物试剂有限公司提供的药敏判读标准, 2 菌株共同敏感的药物共 18 种, 主要为四环素类 3 种, 氨基糖甙类 4 种, 氯霉素类 2 种, 喹诺酮类 4 种, 头孢类 3 种, 磺胺类 1 种, 呋喃类 1 种. 而 2 菌株共同耐药的药物共 7 种, 其中 5 种为青霉素类药物, 2 种为头孢类药物.

表5 二菌株的药敏试验结果

药物	规格/ ($\mu\text{g}\cdot\text{disc}^{-1}$)	JYV1605101		JYF1605102	
		抑菌圈 直径/mm	药敏	抑菌圈 直径/mm	药敏
四环素	30	26	S	25	S
强力霉素	30	20.5	S	29	S
米诺环素	30	28	S	32	S
链霉素	10	16	S	16	S
庆大霉素	10	15	S	21	S
大观霉素	100	27	S	23	S
丁胺卡那	30	21.5	S	7	R
新霉素	30	21	S	19	S
卡那霉素	30	16	I	16	I
氟苯尼考	30	38	S	35	S
氯霉素	30	32	S	22	S
罗红霉素	15	14	I	23	S
红霉素	15	12.5	R	26	S
麦迪霉素	30	0	R	19	S
萘啶酸	30	12	R	49	S
依诺沙星	10	41	S	33	S
诺氟沙星	10	41.5	S	28	S
复方新诺明	23.75, 1.25*	21	S	21	S
青霉素钠	6	0	R	0	R
氨苄西林	10	0	R	0	R
氨苄青霉素	10	0	R	0	R
阿莫西林	20	0	R	0	R
苯唑西林	1	0	R	0	R
羧苄西林	100	0	R	24	S
头孢西丁	30	36	S	24	S
头孢唑肟	30	38	S	39	S
头孢拉定	30	18	S	17	I
头孢唑林	30	10	I	0	R
头孢他啶	30	30.5	S	29	S
头孢氨苄	30	10	R	12	R
克林霉素	15	0	R	12	R
利福平	5	18	I	20	S
恩诺沙星	10	40	S	37	S
环丙沙星	5	41	S	31	S
痢特灵	300	19.5	S	21	S
磺胺异噁唑	300	26.5	S	0	R

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药。*: 两数据分别对应 SMZ 和 TMP。

3 讨论

本实验从患病鲫鱼体内分离到2株细菌, 经形态学观察、生理生化试验及16S rDNA 基因分析认为菌株 JYV1605101 为维隆气单胞菌(*A. veronii*), 菌株 JYF1605102 为腐败希瓦菌(*S. putrefaciens*)。人工回归感染和溶血性试验证实 2 株菌都具有较强致病性, 人工感染试验可使鲫鱼出现与自然发病鱼相似的病症, 致死率为 100%。溶血性试验也显示这 2 株菌对鲫鱼血细胞具有较强的溶解作用, 因此, 确定维隆气单胞菌(*A. veronii*)和腐败希瓦菌(*S. putrefaciens*)是引起本次鲫鱼疾病的致病菌。

维隆气单胞菌(*A. veronii*)是 1983 年美国疾病预防控制中心鉴定和命名的一个新种, 归于气单胞菌属(*Aeromonas*)^[18]。据报道, 维隆气单胞菌是土壤和水域中的正常菌群, 为条件致病菌。近年来由维隆气单胞菌引起我国养殖鱼类和其他水产动物的病例日益增多, 感染范围也逐渐扩大, 如何涛等^[19]从患病草鱼中分离到维隆气单胞菌, 实验显示该菌能引起草鱼肌肉出血, 体表溃烂, 短时间内导致草鱼大量死亡; 胡秀彩等^[20]研究表明, 维隆气单胞菌可引起蝶尾金鱼鳞片脱落, 腐皮出血; 贾俊鹏等^[21]也通过实验证实锦鲤感染维隆气单胞菌后可出现溃疡、出血、腹水等症状; 此外, 还有维隆气单胞菌引起团头鲂、鲢、鳙、斑点叉尾鲷等鱼类及中华鳖、中华绒螯蟹等其他水产动物疾病的报道^[15,22-26]。腐败希瓦菌是一种在环境和鱼类中广泛分布的细菌。资料显示, 该菌为多种水产品的主要腐败菌^[27]。该菌作为病原菌报道不多, 国内曾报道过腐败希瓦菌引起新疆乌伦古湖区域养殖东方欧鳊溃烂病^[28], 江苏盐城异育银鲫大批死亡被报道病原为腐败希瓦菌, 该分离菌 28 d LD₅₀ 为 2.1×10^3 cfu·g⁻¹^[4]; 吕俊超^[29]和徐欣等^[30]也曾分别从患病大菱鲈和河蟹中分离得到腐败希瓦菌。此外, 樊汶樵等^[31]还从患病棘腹蛙体内分离到腐败希瓦菌, 人工感染试验证实其为棘腹蛙消化道出血病的致病菌, LD₅₀ 值为 6.6×10^7 cfu·只⁻¹。国外仅见腐败希瓦菌引起鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和鳊鱼(*Oncorhynchus mykiss*)^[32]、金带篮子鱼(*Siganus rivulatus*)^[33]、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[34]等感染病例的报道。由于维隆气单胞菌和腐败希瓦菌不仅能引起动物

严重病害,也能引起人类多种疾病,是重要的人畜鱼共患病病原^[4,15,18],因此,亟需进一步关注和深入研究。

近几年维隆气单胞菌的耐药性已逐渐增强,其中对青霉素、氨苄西林、阿莫西林、庆大霉素、红霉素、诺氟沙星、洛美沙星、阿米卡星、阿奇霉素等许多药物耐药^[23-24,35]。而腐败希瓦菌的药敏研究较少,贾春红等^[36]实验显示其对青霉素、氨苄西林、头孢他啶、苯唑西林、万古霉素、头孢拉定等药物耐药。本文采用琼脂扩散法测定了维隆气单胞菌 JYV1605101 和腐败希瓦菌 JYF1605102 对 36 种化学药物的敏感性,结果显示这 2 株菌对其中的氟苯尼考等 18 种药物共同敏感,对青霉素和头孢类等 7 种药物共同耐药。参考其他学者的研究结果并考虑到我国规定的禁用渔药和常用药情况,建议氟苯尼考、四环素、米诺环素、强力霉素等 4 种药物可作为治疗鲫鱼维隆气单胞菌病和腐败希瓦菌病的候选药物。同时,养殖过程用药要严格执行上市前休药期的规定,加强养殖管理,以生态防病为主,尽量减少用药。

参考文献:

- [1] 杨秀雄. 高密度养殖鲫鱼常见疾病防治法[J]. 吉林水产, 2015(16):81.
- [2] 韩艳楠, 余银春, 王鑫毅, 等. 牛蛙致病变形菌的鉴定及其敏感药物筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1280-1287.
- [3] 巴翠玉, 赵福广, 张培军, 等. 鲫鱼戴氏西地西菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(5):107-109.
- [4] 秦蕾, 张晓君, 毕可然. 一种新的异育银鲫病原——腐败希瓦菌[J]. 微生物学报, 2012, 52(5):558-565.
- [5] 王利, 魏勇, 龙钟明, 等. 鲫鱼弗氏柠檬酸杆菌的耐药表型及耐药基因检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(8):14-17.
- [6] 陆文浩, 杨家新, 陈辉, 等. 异育银鲫类志贺单胞菌的鉴定[J]. 淡水渔业, 2009, 39(2):48-53.
- [7] 陆文浩, 陈辉, 王习达, 等. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(4):303-309.
- [8] 林秀秀. 患鲤疱疹Ⅱ型病毒病异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)组织和血液病理的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [9] 巴翠玉, 张培军, 赵福广, 等. 异育银鲫呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2017(2):22-26.
- [10] Lu H D, Zhu G Z, Fan L P, et al. Etiology and pathology of epidermal papillomas in *Allogynogenetic crucian carp* (*Carassius auratus gibelio* ♀ x *Cyprinus carpio* var. *singonensis* ♂)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 83(1):77-84.
- [11] 王鑫毅, 韩艳楠, 金珊, 等. 乌鳢产卵期金黄色杆菌的鉴定及其胞外产物特性分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(3):641-646.
- [12] Satomi M, Vogel B F, Gram L, et al. *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov. isolated from marine fish of the Baltic Sea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(1):243-249.
- [13] Ziemke F, Höfle M G, Lalucat J, et al. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998, 48(1): 179-186.
- [14] 赵乃昕, 苑广盈. 医学细菌名称及分类鉴定[M]. 3 版. 济南: 山东大学出版社, 2013:115-120; 173-179.
- [15] 房海, 陈翠真, 张晓君. 水产养殖动物病原细菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010:389-446.
- [16] 孙瑞元. 简捷实用的半数致死量综合计算法[J]. 药学报, 1963, 10(2):65-74.
- [17] 徐华. 红斑狼疮细胞检查方法的改进[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 1996, 15(3):182.
- [18] 吴同奎, 单晓枫, 孟庆峰, 等. 维隆气单胞菌研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(7):41-44.
- [19] 何涛, 邹升, 龚亮, 等. 草鱼病原菌 AvX005 的分离鉴定及其拮抗菌筛选研究[J]. 水产科学, 2018, 37(1):15-23.
- [20] 胡秀彩, 孙金辉, 孙敬锋, 等. 患病蝶尾金鱼维隆气单胞菌温和生物变种的分离鉴定[J]. 水生态学杂志, 2018, 39(1):105-110.
- [21] 贾俊鹏, 康元环, 张冬星, 等. 锦鲤致病性维隆气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(1):19-23.
- [22] 赵宇亮, 吕梦溪, 苏欣, 等. 中华鳖病原维隆气单胞菌的分子鉴定及分子分类学研究[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2011, 35(4):417-422.
- [23] 房海, 陈翠珍, 张晓君, 等. 中华绒螯蟹病原维隆气单胞菌的检验[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(1):45-49.
- [24] 葛铮. 不同淡水鱼类维隆气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [25] 周光, 谢骏, 周群兰, 等. 团头鲂养殖池塘维隆气单胞菌的致病性耐药性及在不同生态位间的差异[J]. 江苏

- 农业科学, 2012, 40(5):192-196.
- [26] 王旭, 颜其贵, 雷燕, 等. 中国大鲵腐皮病病原菌的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(10):944-948.
- [27] 王庆丽. 养殖大黄鱼和海水鲈鱼冷藏过程中特定腐败菌的鉴别[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012.
- [28] 成沛. 东方欧鳊溃烂病病原菌的分离鉴定及流行病学研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
- [29] 吕俊超. 养殖大菱鲆病原菌的分离鉴定、组织病理学及免疫组织化学[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [30] 徐欣, 陈军昌. 五种中草药对河蟹腐败假单胞菌的抑菌作用[J]. 水产科学, 2002, 21(2):24-27.
- [31] 樊汶樵, 周莉, 廖冰洁, 等. 感染棘腹蛙的腐败希瓦菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(15):166-168; 299.
- [32] Kozinska A, Pekala A. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish—a potential new pathogen of fish[J]. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 2004, 24:189-193.
- [33] Saeed M O, Alamoudi M M, Al-Harbi A H. A *Pseudomonas* associated with disease in cultured rabbit-fish *Siganus rivulatus* in the Red Sea[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1987, 3:177-180.
- [34] Korun J, Akgün-Dar K, Yazici M. Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured European sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey[J]. Revue de Médecine Vétérinaire, 2009, 160:532-536.
- [35] 黎炯, 叶星, 卢迈新, 等. 罗非鱼维隆气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(3):132-136.
- [36] 贾春红, 李淑芳, 张继东. 3株方斑东风螺病原希瓦菌对35种常用抗菌药物的敏感性试验[J]. 江西水产科技, 2013(1):17-19.

Isolation, identification, pathogenicity and antibiotics sensitivity analysis of *Aeromonas veronii* and *Shewanella putrefaciens* from crucian carp *Carassius auratus*

MEI Han, WANG Xin-yi, BU Ling-fei, JIN Shan*, ZHAO Qing-song, CHEN Yin-er
(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: Two bacterial strains were isolated from sick crucian carp, *Carassius auratus*, JYV1605101 and JYV1605102. The artificial infection test and hemolytic tests suggested both strains were highly toxic. The LD₅₀ of strain JYV1605101 to crucian carp was 3.90×10^6 cfu·mL⁻¹. Strain JYV1605101 is β-hemolytic to blood of *Ovis aries*, *Mus musculus*, *Channa argus*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Micropterus salmoides*. The LD₅₀ of strain JYF1605102 to crucian carp was 2.36×10^5 cfu·mL⁻¹. Strain JYV1605102 is β-hemolytic to blood of *C. argus*, *C. auratus*, *C. carpio* and *M. salmoides* and α-hemolytic to blood of *O. aries* and *M. musculus*. The morphology observation, biochemical characteristic and 16s rDNA sequencing analysis showed that strain JYV1605101 was *A. veronii* and strain JYV1605102 was *S. putrefaciens*. Strain JYV1605101 produces the extracellular enzyme activity of protease, gelatinase and amylase, rather than the activity of urease, lipase and lecithinase. Strain JYF1605102 has the extracellular enzyme activity of protease and gelatinase, rather than the activity of amylase, urease, lipase and lecithinase. The result of drug sensitivity test demonstrated that both strains are relatively sensitive to 18 types of drugs. According to the regulation of fishery medication and usage of routine drugs, it is suggested that florfenicol, tetracycline, minocycline and doxycycline could be considered as the candidate treatment to the crucian carp diseases caused by *A. veronii* and *S. putrefaciens*.

Key words: *Carassius auratus*; *Aeromonas veronii*; *Shewanella putrefaciens*; identification; drug sensitivity test

(责任编辑 韩超)