

圆口铜鱼维氏气单孢菌的分离鉴定及药敏试验

曹恒源^{1,2}, 乔 晔², 陈小娟², 潘 磊², 谢建军², 董 纯², 安 苗¹, 王小明³, 杨少荣³

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025;

2. 水利部中国科学院水工程生态研究所, 水利部水工程生态效应与生态修复重点试验室, 武汉 430079;

3. 中国三峡建设管理有限公司, 成都 610041)

摘要:从濒死圆口铜鱼的脾和肾病灶部位分离优势菌, 进行纯化分离并开展生理生化鉴定、16S rDNA 序列分析以及常用抗生素药物的药敏性筛选, 以期丰富圆口铜鱼病害防治的基础资料。分离出的 1 株优势菌在 BHI 固体培养基上长出表面光滑的灰白色圆形菌落, 边缘整齐、不透明、稍隆起; 序列长度为 1 399 bp, 与维氏气单孢菌的同源性为 100%, 与维氏气单孢菌(KT964297.1; KJ650080.1; KM362731.1)聚为一支, 置信度 99。结合菌落形态特征和生理生化特征, 鉴定菌株为维氏气单孢菌。该菌株对氟苯尼考等 7 种药物敏感, 对利福平中度敏感, 对新霉素等 9 种药物耐药。

关键词:圆口铜鱼; 维氏气单孢菌; 生化鉴定; 16S rDNA 序列; 药敏试验

中图分类号:S941.42, S965.127 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2016)04-0095-06

圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)属于鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)鮡亚科(Gobioninae)铜鱼属(*Coreius*), 集中分布于长江上游的干流及支流的急流中(Zhang et al, 2010), 且又以金沙江中下游和雅砻江下游为主要分布区域(刘乐和等, 1990; 唐会元等, 2012)。近年来, 水利工程修建、过度捕捞等人类活动干扰对圆口铜鱼生存繁殖造成了较大影响, 唐会元(2012)等 2006-2010 年调查结果发现, 圆口铜鱼早期资源量在其主要分布区金沙江中段逐年显著减少。圆口铜鱼物种保护问题日益受到关注, 有关单位相继开展了圆口铜鱼的人工驯养、繁殖, 2010 年水工程生态研究所开展圆口铜鱼人工繁殖技术研究工作首次获得突破, 2014 年三峡总公司中华鲟研究所进行了圆口铜鱼人工驯养繁殖(李晓东等, 2014)。综合多年人工驯养的经验发现, 鱼病问题是圆口铜鱼人工驯养和繁殖中的难点之一。目前针对圆口铜鱼的病害研究资料较少, 寄生虫性疾病方面已报道的仅有锚头蚤病(周剑等, 2008)、小瓜虫病(刘强平等, 2005; 张其中等, 2005)和寄生于幼鱼肠道内的小吻虫病(冉江波等, 2005); 细菌性

疾病方面仅见赤皮病报道(吴春艳等, 2010), 但对病原菌并没有准确鉴定, 研究结果并不充分。

2015 年 7 月, 暂养于水利部中国科学院水工程生态研究所鱼类驯养室内的圆口铜鱼暴发了不明病原菌造成的细菌性疾病, 短期内死亡数十尾, 造成了较大的损失。为了鉴定病原, 探讨防治对策, 从濒死圆口铜鱼的脾和肾病灶部位分离到 1 株优势菌, 进行了纯化分离并开展了生理生化鉴定、16S rDNA 序列分析以及常用抗生素药物的药敏性筛选, 以期丰富圆口铜鱼病害防治的基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

患病圆口铜鱼取自水利部中国科学院水工程生态研究所鱼类驯养室。患病初期表现为摄食减少, 游动缓慢且离群, 随着病情的加重, 病鱼不再摄食, 浮头进而出现死亡现象。对其进行外表观察和解剖发现: 体表和鳍条有明显溃疡, 鳃呈轻微溃烂, 肝脏呈弥散状并伴随胆汁外渗, 体肾有脱落现象, 胃部存有胆汁且外渗至腹腔(图 1), 胃肠内无食物; 其他器官和组织未见明显病症。

1.2 试验试剂和仪器

主要试剂: BHI 培养基(BD, Becto™ Brain Heart Infusion)、细菌 DNA 提取试剂盒(FOREGENE Co., LTD)、药敏试剂盒(杭州微生物试剂有限公司)、生化鉴定试剂盒(杭州微生物试剂有限公司)和快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(康为世纪生物科技

收稿日期: 2016-05-06

基金项目: 圆口铜鱼人工繁殖技术研究(2)(JGJ/0242013)。

作者简介: 曹恒源, 1987 年生, 男, 硕士研究生, 专业方向为水产动物遗传育种与利用。E-mail: caohengyuan123@126.com

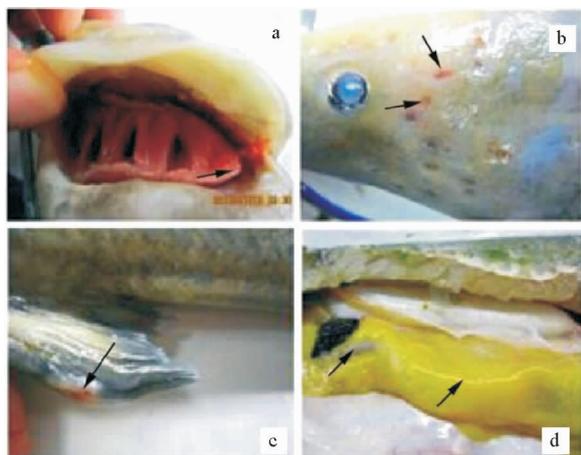
通信作者: (1)董纯。E-mail: dongc1314@163.com;

(2)安苗, 副教授, 从事水生动物增殖与鱼类种质资源研究。

E-mail: gzuam@163.com

有限公司)等。

主要仪器:PCR仪(Biometra, T-professional, Germany)、恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)、洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)和化学发光成像与分析系统(Bio-RAD, ChemiDoc™ XRS+, USA)等。



a. 鳃部轻微溃烂, b. 体表溃疡, c. 鳍条溃疡, d. 肝脏呈弥散状并伴随胆汁外渗

图1 圆口铜鱼病症

a. gill fester b. ulcer on body surface, c. ulcer on fin ray, d. liver dispersion and bile leakage

Fig. 1 Disease symptoms of *Aeromonas veronii* infection in *Coreius guichenoti*

1.3 病原菌的分离和培养以及菌种保藏

濒死圆口铜鱼体表消毒,于脾、肾处取样,采用平板划线法在BHI琼脂培养基上划线,28℃培养24 h后,挑取单菌落,在同样的培养基上划线和培养以获取菌株的纯培养。将菌株纯培养于BHI琼脂培养基中经再次培养足量后分装加甘油(终浓度50%)于-80℃下保藏备用。菌株编号为YT01。

1.4 生化反应鉴定

取保藏菌种YT01,于血平板中平板划线法后28℃中培养24 h,待菌落生长足够量后于洁净工作台中挑取适量菌株接入生化反应管,于28℃中培养24~48 h后比对反应结果予以验证。

1.5 16S rDNA 序列的扩增与测序

取保藏的YT01菌株,解冻后接种于BHI液体培养基中,28℃培养24 h后进行离心集菌,以27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')为引物(Blackwood et al, 2003),参照Bacteria DNA Isolation Kit使用说明书进行细菌总DNA的提取操作。PCR反应体系为50 μL: 5 μL 10 × PCR Buffer, 1 μL dNTP

(10 mmol/L),上、下游通用引物(F/R, 10 μmol/L)各1 μL, 0.5 μL rTaqDNA聚合酶(5 U/μL), 2 μL DNA模板, ddH₂O补足至50 μL。PCR反应条件为: 95℃预变性5 min, 95℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 共30个循环后72℃下延伸10 min。扩增产物用快速琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收,送武汉奥科生物技术有限公司进行测序。

1.6 序列分析与系统发育树的构建

使用NCBI中的BLAST软件将YT01测序得到的16S rDNA的序列进行序列同源性分析,之后使用CLUSTAL X2软件对同源序列进行序列比对。采用ClustalX1.83软件与GenBank数据库中检出的序列进行多序列匹配排列,使用MEGA6.06软件采用邻接法(Neighbor joining method)构建系统发育树,并通过1000次的自举分析(Bootstrap)进行置信度检测。

1.7 药敏试验

药敏试验采用纸片扩散法(K-B法)。用涂布棒将300 μL恒温培养振荡器摇好的菌均匀涂布于6个BHI固体培养基上,将17种药敏纸片均匀贴于其上,3片/皿,培养24 h后测量抑菌圈的直径(mm),根据统计结果将其分为敏感、中度敏感、耐药。

2 结果

2.1 菌落形态特征

自患病圆口铜鱼中最终分离出1株优势菌,在BHI固体培养基上经28℃培养13 h后,长出表面光滑的灰白色圆形菌落,其边缘整齐、不透明、稍隆起。

2.2 生理生化鉴定

利用36种生化管对从患病圆口铜鱼中分离得到的菌株YT01进行生化反应鉴定,反应结果见表1。

2.3 序列分析与系统发育树的构建

利用细菌16S rDNA通用引物对菌株YT01的基因片段进行扩增和测序,得到其序列长度为1399 bp,使用NCBI中的Blast进行同源检索,发现所测序列与维氏气单孢菌的同源性为100%。从NCBI下载气单孢菌属(*Aeromonas*)中23个细菌的16S rDNA序列(序列号见图2),经同源一致比对后(长度1322位点),以迟钝爱德华氏菌的16S rDNA序列(KC570942)为外群构建系统发育树,结果表明菌株YT01与维氏气单孢菌(KT964297.1;

KJ650080.1;KM362731.1)聚为一支,置信度 99(见图 2)。再结合上述菌落形态特征和生理生化特征,鉴定菌株 YT01 为维氏气单孢菌。

表 1 圆口铜鱼源分离菌株 YT01 的生化反应特征

Tab.1 Biochemical characteristics of strain YT01, isolated from *Coreius guichenoti*

反应项目	结果	反应项目	结果
木糖	N	蔗糖	P
甘露糖	P	丙二酸盐	N
草糖	P	醋酸盐	P
鼠李糖	N	卫茅醇	N
麦芽糖	P	肌醇	N
乳糖	N	甘露醇	P
棉子糖	N	鸟氨酸脱羧酶	N
葡萄糖	P	七叶苷	N
蜜二糖	P	甘油	N
葡萄糖(产气)	P	精氨酸双水解酶	P
MR	N	O-F	F
侧金盏花醇	N	水杨素	N
尿素	N	氰化钾生长试验	N
纤维二糖	P	硫化氢	N
β-半乳糖苷(ONPG)	N	苯丙氨酸	N

注: P - 阳性, N - 阴性, F - 发酵型, R - 抗性

Note: P-Positive, N-Negative, F-Fermentation, R-Resistance

2.4 药敏试验

用 17 种常用药物对菌株 YT01 做药物敏感性试验,结果(表 2)显示:该分离菌株对氟苯尼考、诺氟沙星等 7 种药物敏感,对利福平中度敏感,对新霉素、痢特灵等 9 种药物耐药,其中对磺胺甲基异恶唑、阿莫西林和青霉素 3 种药物为完全耐药。

3 讨论

3.1 维氏气单孢菌的分离鉴定

维氏气单孢菌(*Aeromonas veronii*)为革兰氏阴性杆菌,模式菌株为 ATCC35604 (CDC1169-83) (Abbott et al, 2003)。作为一种条件致病菌,近年在西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*) (马志宏等,2009)、框镜鲤(*Cyprinus carpio*) (龚倩等,2010)和鲶(*Parasilurus asotus*) (Nawaz et al, 2010)等多种鱼以及青虾(*Macrobrachium nipponense*) (潘晓艺等,2009)、中华鳖(*Trionyx sinensis*) (李本旺等,2000)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) (房海等,2008)等多种水产动物中有报道,均造成了严重的经济损失。因此,该致病菌引起了学者的广泛关注和研究。

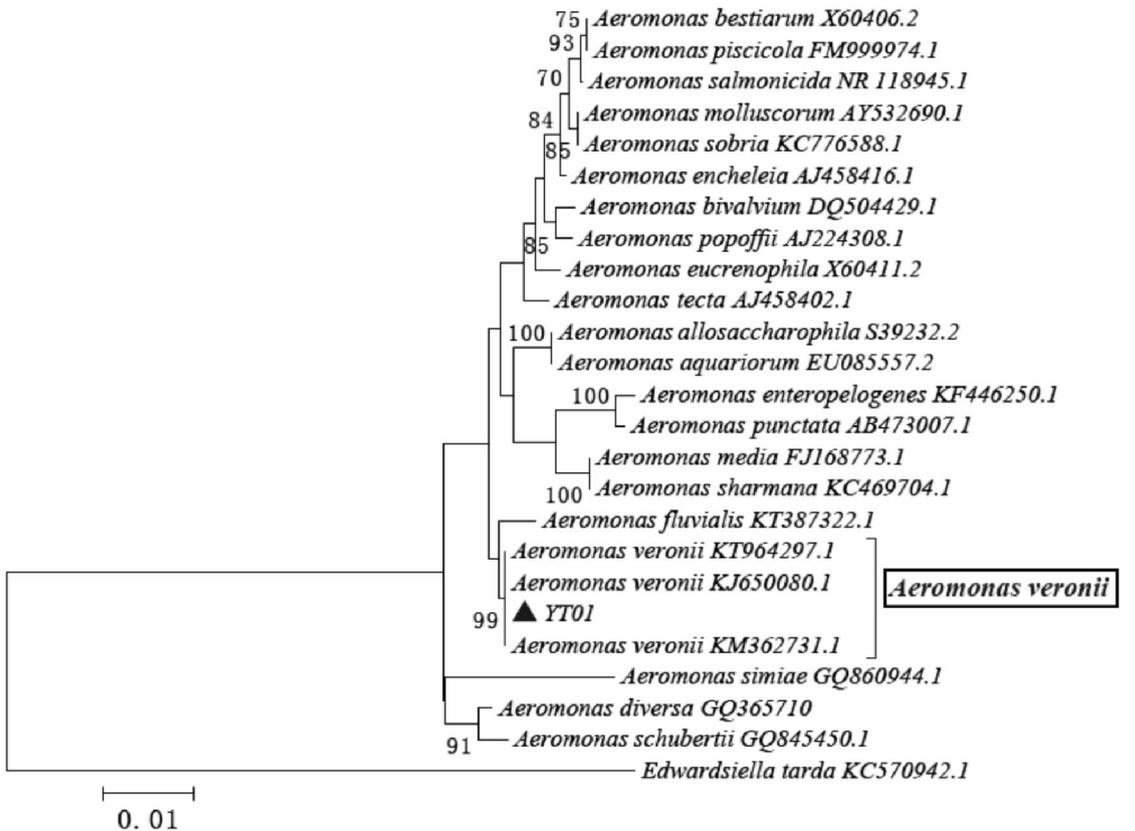


图 2 25 个细菌 16S rDNA 基因序列构建的 NJ 系统发育树 (1000 Bootstrap)

Fig.2 Phylogenetic tree of 25 *Aeromonas* strains based on 16S rDNA gene sequence using the NJ method (1000 Bootstrap)

表2 菌株 YTO1 的药物敏感性试验

Tab. 2 Antibiotic susceptibility of the YTO1 strain

药物名称	抑菌圈 / mm	敏感性	药物名称	抑菌圈 / mm	敏感性
磺胺甲基异恶唑	0	R	卡那霉素	8	R
阿莫西林	0	R	四环素	23	S
新霉素	9	R	新生霉素	6	R
痢特灵	11	R	氟苯尼考	26	S
利福平	16	I	诺氟沙星	25	S
奥复星	29	S	左氧沙星	26	S
青霉素	0	R	环丙氟哌酸	25	S
链霉素	9	R	恩诺沙星	27	S
庆大霉素	10	R			

注: S-敏感($d > 20$ mm); I-中度敏感(15 mm $< d \leq 20$ mm); R-耐药($d \leq 15$ mm)。

Note: S-high sensitivity ($d > 20$ mm); I-moderate sensitivity (15 mm $\leq d \leq 20$ mm); R-low or no sensitivity ($d \leq 15$ mm)。

本研究从 11 尾患病濒死圆口铜鱼的脾、肾处均只分离出了同一特征菌株,结合所有患病鱼具有相同症状的现象,可以推断该分离菌株为致病菌病原,将其命名为 YTO1 菌株。该菌的菌落生长特征与框镜鲤(*Cyprinus carpio*) (龚倩等,2010)、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*) (黄文明等,2013)和斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*) (黄小丽等,2010)等检出的维氏气单胞菌的菌落生长特征一致。综合各项生化反应结果后查询《Bergey's manual of determinative bacteriology》(Holt et al, 1994),发现与维氏气单胞菌的生化反应特征最为相似,初步将其判断为维氏气单胞菌。但生化反应结果中有少部分并不一致,这种情况在其他细菌的检出中也同样存在,推测这或许与试验条件、菌株自身等原因有关,有待进一步验证。

16S rDNA 序列在维氏气单胞菌种属间有较高的区分度(Yanez et al, 2003; Figueras et al, 2000),本文借助细菌 16S rDNA 通用引物对 YTO1 进行扩增、测序后,将其与相似度较高的 24 个气单胞菌属序列建立分子进化树,并以迟缓爱德华氏菌为外群,分离菌株 YTO1 与维氏气单胞菌(KT964297.1; KJ650080.1; KM362731.1)聚为一支。据此可推测 YTO1 菌株为维氏气单胞菌。另外,维氏气单胞菌可导致鱼溃疡(徐洋等,2015)、溃烂(张振国等,2015),与濒死圆口铜鱼的溃疡症状一致。综合以上菌落形态特征、生化反应结果、16S rDNA 序列比对结果,以及致病特征等,认为本文分离出的致病菌 YTO1 为维氏气单胞菌株。目前维氏气单胞菌已成为影响我国水产养殖产业的一个常见病原菌,是许多经济鱼类的致病菌(苟小兰等,2013;康元环等,2014)。本研究首次发现了该菌在圆口铜鱼的感染

病例,可为今后防治该细菌感染提供依据。

3.2 维氏气单胞菌的药敏分析

从药敏试验结果可以看出,本研究中圆口铜鱼感染的维氏气单胞菌对磺胺甲基异恶唑、阿莫西林和青霉素完全耐药;对卡那霉素、新霉素、新生霉素、痢特灵、链霉素和庆大霉素也具有一定的耐药性;对四环素、氟苯尼考、诺氟沙星、奥复星、左氧沙星、恩诺沙星和环丙氟哌酸等药物敏感。而陈红莲(2014)等对黄鳍源维氏气单胞菌的药敏结果则是对卡那霉素、新霉素、链霉素、庆大霉素呈敏感,黄文明(2013)等对胭脂鱼源维氏气单胞菌的药敏试验发现,对庆大霉素高度敏感。

这些不同结果可能是由于保藏菌株的传代变异、原生存环境、养殖过程中的用药和试验标准的不同所造成的(夏飞等,2012)。参照该菌的药敏分析结果,结合患病圆口铜鱼进食减少等症状,制定了针对维氏气单胞菌的口服加药浴的治疗方法,病情很快得到了控制,为今后该病的治疗提供了用药参考。

参考文献

- 陈红莲,江河,胡王,等,2014. 黄鳍病原性维氏气单胞菌温生物变种的分离与鉴定[J]. 生物技术通报,(3):130-136.
- 房海,陈翠珍,张晓君,等,2008. 中华绒螯蟹病原维氏气单胞菌的检验[J]. 中国人兽共患病学报,24(1):45-49.
- 龚倩,高淑琴,单晓枫,等,2010. 框镜鲤致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报,32(12):981-983.
- 苟小兰,王利,刘港彪,2013. 齐口裂腹鱼维氏气单胞菌的耐药性分析[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),39(5):674-678.
- 黄文明,王利,冀国桢,等,2013. 胭脂鱼维氏气单胞菌和中间气单胞菌的鉴定及药物敏感性[J]. 水产科学,32(4):210-214.
- 黄小丽,吴春艳,邓永强,等,2010. 斑点叉尾鮰维氏气单胞菌病的病理组织学观察[J]. 中国兽医科学,40(7):738-742.
- 康元环,孟庆峰,夏京津,等,2014. 乌鳢致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 动物医学进展,35(5):40-43.
- 李本旺,李春枝,张邦杰,等,2000. 中华鳖口咽腔溃烂综合症病原的研究[J]. 水产科技情报,27(5):210-213.
- 李晓东,危兆盖,黄照,等,2014. 长江珍稀特有鱼类圆口铜鱼人工驯养繁殖成功[J]. 水产科技情报,41(5):268-269.
- 刘乐和,吴国犀,王志玲,1990. 葛洲坝水利枢纽兴建后长江

- 干流铜鱼和圆口铜鱼的繁殖生态[J]. 水生生物学报, 14(3):205-215.
- 刘强平,张其中,赵海涛,等,2005. 圆口铜鱼耐过小瓜虫感染二例[J]. 四川动物,24(2):183.
- 马志宏,杨慧,李铁梁,等,2009. 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. 微生物学报,49(10):1289-1294.
- 潘晓艺,沈锦玉,李建应,等,2009. 青虾“软壳综合症”病原及其特性[J]. 微生物学通报,36(10):1571-1576.
- 冉江波,张其中,魏明,2005. 长江上游圆口铜鱼幼鱼肠道内寄生小吻虫种群生态的研究[J]. 生态学杂志,24(6):703-706.
- 唐会元,杨志,高少波,等,2012. 金沙江中游圆口铜鱼早期资源现状[J]. 四川动物,31(3):416-421,425.
- 吴春艳,曾如奎,黄小丽,等,2010. 圆口铜鱼赤皮病的诊治[J]. 科学养鱼,(9):58.
- 夏飞,梁利国,谢骏,2012. 异育银鲫病原维氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 淡水渔业,(5):22-26.
- 徐洋,蔺凌云,姚嘉赞,等,2015. 黄颡鱼“溃疡综合征”病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 淡水渔业,(5):100-104.
- 周剑,陈先均,李孟均,2008. 圆口铜鱼锚头蚤病的防治[J]. 中国水产,(1):71.
- 张其中,陈达丽,2005. 患小瓜虫病圆口铜鱼的组织病理学观察[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),30(6):1112-1115.
- 张振国,孙志景,冯守明,等,2015. 淡水白鲟头部溃烂病病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 淡水渔业,(2):62-66.
- Abbott S L, Cheung W K, Janda J M, 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2348-2357.
- Blackwood C B, Marsh T, Kim S H, et al, 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 926-932.
- Figueras M J, Soler L, Chacón M R, et al, 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2069-2073.
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al, 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins: 190-191, 253.
- Nawaz M, Khan S A, Khan A A, et al, 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish [J]. *Food Microbiology*, 27: 327-331.
- Yanez M A, Catalan V, Apraiz D, et al, 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 875-883.
- Zhang F, Tan D, 2010. Genetic diversity in population of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti* Sauvage et Dabry) from Yangtze River determined by microsatellite DNA analysis [J]. *Genes & Genetic Systems*, 85: 351-357.

(责任编辑 张俊友)

Isolation, Identification and Drug Susceptibility Test of *Aeromonas veronii* from *Coreius guichenoti*

CAO Heng-yuan^{1,2}, QIAO Ye², CHEN Xiao-juan², PAN Lei², XIE Jian-jun²,
DONG Chun², AN Miao¹, WANG Xiao-ming³, YANG Shao-rong³

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, P. R. China;

2. Key Laboratory of Ecological Impacts of Hydraulic-projects and Restoration of Aquatic Ecosystem of Ministry of Water Resources, Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430079, P. R. China;

3. China Three Gorges Projects Development Co., Ltd. Chengdu 610041, P. R. China)

Abstract: The early life resource of *Coreius guichenoti* is decreasing significantly year by year in its primary habitat, the middle Jinsha River, and this is arousing concern about the need for conservation. Fish disease is the primary problem for domestication and propagation of *Coreius guichenoti*. In July, 2015, an unknown bacterial disease broke out in the domesticated *Coreius guichenoti* in Wuhan, resulting in the death of over ten fish in a short time. To identify the pathogen and explore prevention strategies, a dominant strain, labeled YT01, was isolated from the spleen and kidney of moribund *Coreius guichenoti*. Biochemical analysis, 16S rDNA sequencing and an antibiotic susceptibility test were carried out and the data generated will support efforts to control and prevent disease in *Coreius guichenoti*. The isolated YT01 strain, grown on BHI solid media developed round gray-white colonies with smooth surfaces, neat, opaque and slightly raised. The 16S rDNA sequence of YT01 strain was 1 399 bp long and 100% homologous to *Aeromonas veronii*. A phylogenetic tree was constructed based on the 16S rDNA sequence of the YT01 strain and 16S rDNA sequences from another 24 *Aeromonas* strains obtained from the NCBI GenBank database. The sequence of the YT01 strain clustered into a clade with *Aeromonas veronii* (KT964297.1; KJ650080.1; KM362731.1), with a confidence level of 99%. Combined with the morphological characteristics and physiological and biochemical characteristics of the colony, the YT01 strain was conclusively identified as *Aeromonas veronii*. Antibiotic susceptibility of the YT01 strain was tested using 17 common antibiotics. Results show that the YT01 strain is highly sensitive to 7 antibiotics, including florfenicol, moderately sensitive to rifampin and strongly resistant to 9 antibiotics, including neomycin.

Key words: *Coreius guichenoti*; *Aeromonas veronii*; biochemical identification; 16S rDNA sequence; susceptibility test