

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171205002

http://www.yykxjz.cn/

杨昆明, 郭爱民, 马江霞, 段成任, 谢志胜, 岳城. 河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 42-51

Yang KM, Guo AM, Ma JX, Duan CR, Xie ZS, Yue C. Isolation, identification, and antibiotic sensitivity of bacillary enteritis in *Perca fluviatilis* Linnaeus. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(6): 42-51

## 河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验\*

杨昆明 郭爱民 马江霞 段成任 谢志胜 岳城<sup>①</sup>

(新疆农业大学动物医学学院 乌鲁木齐 830052)

**摘要** 河鲈(*Perca fluviatilis* Linnaeus)是新疆额尔齐斯河特有的土著鱼类,已开展人工养殖,但其病害相关研究较少。2016年,五家渠某水产推广站河鲈突然大批死亡,作者从发病的河鲈肝脏和肠道分离病原菌,对分离菌进行了传代纯化培养。结果显示,在20℃培养24h后,ZL1能形成边缘整齐、中间微隆起、表面光滑、浅黄色、有特殊芳香气味、大小为1.5~2mm的菌落,在血琼脂平板上能形成明显的 $\beta$ -溶血圈;ZL3和ZL5可形成圆形、微隆起、表面湿润光滑、灰白色、半透明、菌落大小为0.5~1mm的菌落,但在血琼脂平板上不能形成溶血圈。经革兰氏染色、生理生化、16S rRNA序列比对和基因序列进化树分析,鉴定ZL1株为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*),ZL3和ZL5株为迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)。药敏实验结果显示,ZL1株对庆大霉素、米诺环素、头孢他啶等药物高度敏感,对链霉素、青霉素、克拉霉素等耐药;ZL3和ZL5株对左氧氟沙星、链霉素和恩诺沙星敏感,对庆大霉素、氨苄西林、青霉素、复方新诺明等药物耐药。人工感染结果显示,分离菌均具有明显致病性。

**关键词** 河鲈;温和气单胞菌;迟缓爱德华菌;鉴定;药敏实验

**中图分类号** S941.42 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)06-0042-10

河鲈(*Perca fluviatilis* Linnaeus),地方名为五道黑,属于鲈形目(Perciformes)、鲈科(Percidae)、鲈属(*Perca*),是肉食性凶猛鱼类,广泛分布于欧洲、亚洲北部和美洲北部,在我国仅产于新疆的额尔齐斯河和乌伦古湖水域(唐富江等,2009),是新疆额尔齐斯河重要的土著经济鱼类之一(任慕莲等,2002),有生长速度快、抗病能力强等特点,其肉质鲜美,市场需求十分紧俏(唐富江等,2008)。近年来,由于过度捕捞和环境因素的影响,河鲈野生资源量大幅下降,目前

已开展人工养殖。2016年5月,新疆五家渠某池塘人工养殖河鲈出现食饵量下降、精神萎靡、对外界刺激反应不灵敏、时而侧游的现象,病鱼有肛门红肿、腹部膨大、体表鳞片脱落、烂尾烂鳃等症状,发病水温高(25℃),每个池子死亡数达250~350尾/d,造成巨大的经济损失。通过临床剖检、寄生虫学、细菌学、病理学等方法进行了诊断,在体表发现有锚头鳋(*Lernaea*),但寄生数量不多,不是造成河鲈死亡的首要因素,在排除了寄生虫感染和病毒感染造成死亡的

\* 国家自然科学基金项目(31360644)、国家科技支撑计划项目(2012BAD25B10-03)、新疆维吾尔自治区推广项目(2016C03013)和新疆农业大学研究生科研创新项目(XJAUAGRI2016006)共同资助[This work was supported by National Natural Sciences Foundation of China (31360644), National Science-Technology Support Plan Projects (2012BAD25B10-03), Xinjiang Uygur Autonomous Region Scientific and Technological Projects (2016C03013), Xinjiang Agricultural University Graduate Student Scientific Research Innovation Projects (XJAUAGRI2016006)]. 杨昆明, E-mail: ykunming@aliyun.com

<sup>①</sup> 通讯作者:岳城,教授, E-mail: yuechengxnd@aliyun.com

收稿日期:2017-12-05, 收修改稿日期:2017-12-22

情况下, 怀疑是细菌感染所致。剖检病鱼内脏, 进行细菌分离纯化, 通过革兰氏染色、生理生化实验、药物敏感性实验、分子生物学实验对分离菌进行了初步鉴定, 在此基础上通过测序对细菌 16S rRNA 基因序列进行分析, 并构建进化树, 以探讨分离菌在所属菌群中的分类位置。本研究旨在丰富河鲈细菌病病原研究资料, 并为河鲈细菌病的防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

来自新疆五家渠某养殖场的患病河鲈 16 尾, 病鱼有鳞片脱落、腹部膨胀、肛门红肿外突的症状。体长约为 15~28 cm, 体重约为 170~300 g, 用于临床剖检、病料采集和病原菌分离。剖检时, 已有部分鱼翻肚、死亡。实验用河鲈为该场未发病同批次鱼池, 体长约为 12~22 cm, 体重约为 145~250 g, 在实验室暂养 3 周, 确定健康无病后, 用于回归感染实验。

LB 肉汤、LB 琼脂、M-H 培养基购自青岛日本水生物技术有限公司; 细菌微量生化实验管、革兰氏染液、药敏纸片购自杭州天河微生物试剂有限公司; 细菌 16S rRNA 通用引物、序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; 胶回收试剂盒购自 OMEGA 生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒购自全式金生物科技有限公司。

### 1.2 剖检观察

肉眼检查病鱼体表有无甲壳类寄生虫, 同时, 分别刮取鳃丝粘液和体表粘液, 在体视显微镜下观察粘液中是否有寄生虫(赵江山等, 2011)。依次检查鱼头、腹、鳍、肛门有无病变; 剖开腹部, 检查有无腹腔液, 肝脏、胆囊、脾脏和肾脏等器官质地、形态, 有无出血, 肠壁弹性及肠道内容物。

### 1.3 细菌分离培养

无菌条件下, 采集病鱼腹腔液、肝脏、脾脏、肠和肾脏。腹腔液用接菌环蘸取, 在 LB 琼脂培养基上划线; 内脏用灭菌手术剪剪开, 用横断面在 LB 琼脂培养基上涂抹, 再持接菌环在涂抹处划线, 20℃倒置培养 16~24 h。挑取形态一致的单个优势菌落, 进行分离传代纯化培养。

### 1.4 细菌鉴定

挑取琼脂平板上单菌落, 经稀释、涂片、固定和染色后, 显微镜油镜下观察菌体形态和颜色, 镜下观察菌体单一后, 挑取单个菌落接种于 Mueller-

Hinton(M-H)液体培养基, 置于 20℃恒温摇床, 培养 24 h, 用培养的菌液进行 V-P、H<sub>2</sub>S 等生理生化实验, 实验结果参照房海等(2014)进行分析。

分离纯化的细菌接种于 LB 液体培养基中, 于 20℃恒温摇床培养 24 h 后, 用 30%甘油与菌液 6:4 加到 EP 管中混匀封口, 作为菌种保存。以菌液为底物, 进行菌液 PCR。选用细菌通用引物扩增 16S rRNA(正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGC-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 反应体系(25 μl): Super mix 12.5 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, 底物 2 μl, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μl。PCR 反应条件: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 40 s, 54℃退火 60 s, 72℃延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃再延伸 10 min。

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 连接转化并提取质粒, 质粒送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 上 Blast 比对, 用 MEGA6.0 软件对序列进行多重比较, 并构建系统发育树。

### 1.5 致病菌药敏实验

吸取 100 μl M-H 液体培养基培养的菌液, 均匀涂布于 M-H 琼脂培养基表面, 用烧灼后的无菌镊子夹取药敏片, 以适当间隔粘贴于琼脂培养基表面, 并轻压药敏片, 使之与培养基充分接触。正置 0.5 h, 然后, 倒置于 20℃恒温培养箱, 培养 16~24 h 后, 观察并测量抑菌圈直径, 根据抑菌圈的大小来判断该菌对相应药物的敏感程度(尚红等, 2015)。

### 1.6 病理组织切片

将健康鱼和患病鱼的肝脏和肠体完整切下并保存在 4%甲醛中, 按照病理组织切片法(李钰等, 2014), 采用 LEICA RM2235 手摇连续切片机进行石蜡组织切片, 并对切片进行染色, 镜下对比病变内脏切片与健康内脏切片间组织的变化。

### 1.7 回感实验

实验设 3 个浓度组, 每个浓度组 2 个梯度浓度, 高浓度组: 1×10<sup>9</sup>、1×10<sup>8</sup> CFU/ml; 中浓度组: 1×10<sup>7</sup>、1×10<sup>6</sup> CFU/ml; 低浓度组: 1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>4</sup> CFU/ml。测定 3 个目标菌液在 OD<sub>600 nm</sub> 下的吸光值, 用无菌生理盐水调至相同后, 再稀释成相应浓度的细菌悬液。每尾腹部肌肉注射 0.1 ml, 对照组注射等量的无菌生理盐水, 每组注射 10 尾, 保持水温为 20℃, 不间断供氧, 连续观察 7 d, 每天定时投喂, 观察并记

录实验鱼的症状及每天死亡数目,死鱼及时捞出并剖检,检查其体表及内脏器官的病变情况并做记录,同时,进行细菌分离。参考累积法(Reed-Muench)计算半数致死量(LD<sub>50</sub>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 体表检查及病理剖检结果

在鱼背鳍基部和腹部发现锚头蚤,剥落之后,鳞片基部有出血,鱼腹部膨胀,肛门红肿外突,严重者轻压腹部可见淡黄色液体从肛门流出。剖开腹部,有腹水;肝脏肿大,出血不明显;肠壁淤血严重,肠道内几乎没有食物,整个肠道有大量胶冻状黄色黏液,肠壁变薄且无弹性。

### 2.2 致病菌形态特征

从患病鱼肝脏、肠道分离得到优势菌,革兰氏染色均为阴性短杆菌,无荚膜,也不形成芽孢,菌体成对或单独存在,有时可见首尾相连,形成有弧度的长链状菌体,但是,调节细准焦螺旋可见是由几个单独的短杆菌形成;在 LB 琼脂培养基上,ZL1 可形成边缘整齐、微隆起、表面光滑、浅黄色、有特殊芳香气味、菌落大小为 1.5~2 mm (20℃, 24 h)的菌落,且在血琼脂平板上能形成明显的 β-溶血圈;ZL3 和 ZL5 可形成圆形、微隆起、表面光滑且湿润、灰白色、半透明、菌落大小为 0.5~1 mm (20℃, 24 h)的菌落,在血琼脂平板上不能形成溶血圈。

### 2.3 生理生化结果

生理生化反应显示,ZL1 株产酸不产气,能利用 V-P、蔗糖、葡萄糖、明胶、枸橼酸(Simmons);在含 5% (W/V) NaCl 的培养基中能生长,高于 6%不生长;不利用果糖、水杨苷、纤维二糖、H<sub>2</sub>S、酒石酸、阿拉伯糖。ZL3、ZL5 株产酸、产气,能利用葡萄糖、硫化氢;在含 4% NaCl 的培养基中能生长,高于 5%不生长;V-P、明胶、枸橼酸反应阴性;不利用蔗糖、果糖、水杨苷、纤维二糖、阿拉伯糖、酒石酸(表 1)。

### 2.4 PCR 鉴定及系统发育树构建

对分离菌 16S rRNA 进行 PCR 扩增,通过 1%琼脂糖凝胶电泳可见,片段长度约为 1600 bp。把测序反馈序列上传 NCBI 进行基因序列比对,结果显示,ZL1 株为温和气单胞菌,ZL3、ZL5 2 株菌为迟缓爱德华氏菌。将 3 株菌序列在 EzBioCloud 上同时进行比对,结果与 NCBI 比对结果相同,其中,ZL1 株的相似率为 99.78%,ZL3 的相似率为 99.17%,ZL5 的

表 1 分离菌的生理生化特性  
Tab.1 Physiological-biochemical characteristics of isolated bacteria

测试项目 Test item	菌株 Strain				
	ZL3	ZL5	迟缓爱德华氏菌 <i>E. tarda</i> *	ZL1	温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i> *
V-P 反应 V-P reaction	-	-	+	+	+
硫化氢 H <sub>2</sub> S	+	+	-	-	-
明胶 Gelatin liquefaction	-	-	-	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	-	+
西蒙氏枸橼酸钠 Simmons sodium citrate	-	-	-	+	+
酒石酸 Tartaric acid	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-
水杨苷 Salicin	-	-	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-	-	+	+
1% NaCl	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+	+
5% NaCl	-	-	+	+	+
6% NaCl	-	-	-	-	-
4℃	-	-	-	+	+
20℃	+	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+	+
37℃	+	+	+	±	+

+: 阳性; -: 阴性; ±: 生长缓慢。\*: 参考文献(房海等, 2010)

+: Positive; -: Negative; ±: Slow growth. \*: Reference (Fang, et al, 2010)

相似率为 99.31%。初步修饰后将序列上传 NCBI 并获得 3 个序列号 (MF767618、MF980985 和 MF992220)。选择 8 个气单胞菌属标准参考株,运用 Mega 6.0 建立系统发育树,以 *Bacterium* 为外类群,所做进化树显示,ZL1 与上海株 *A. sobria* KX692881 聚为 1 支,置信度为 88 (图 1)。

选择 12 个爱德华氏菌属标准参考株,以维氏气

单胞菌(*Aeromonas veronii* KY767542)为外类群, 所做进化树显示, ZL3 与四川株 KF872771 聚为 1 支, 置

信度为 67; ZL5 与广州株 JX393017 聚为 1 支, 置信度为 72 (图 2)。

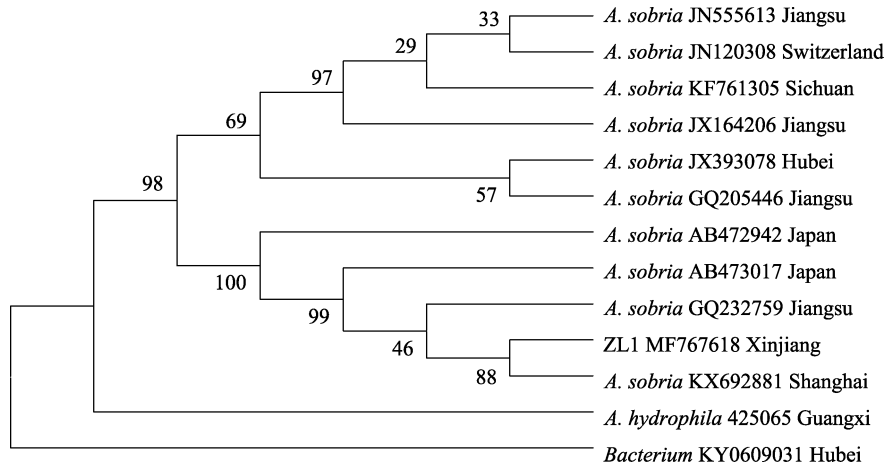


图 1 基于分离菌株 ZL1 16S rRNA 基因与同源性菌株相应基因构建的系统发育树  
Fig.1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene of isolated strain ZL1 and corresponding genes of homologous strains

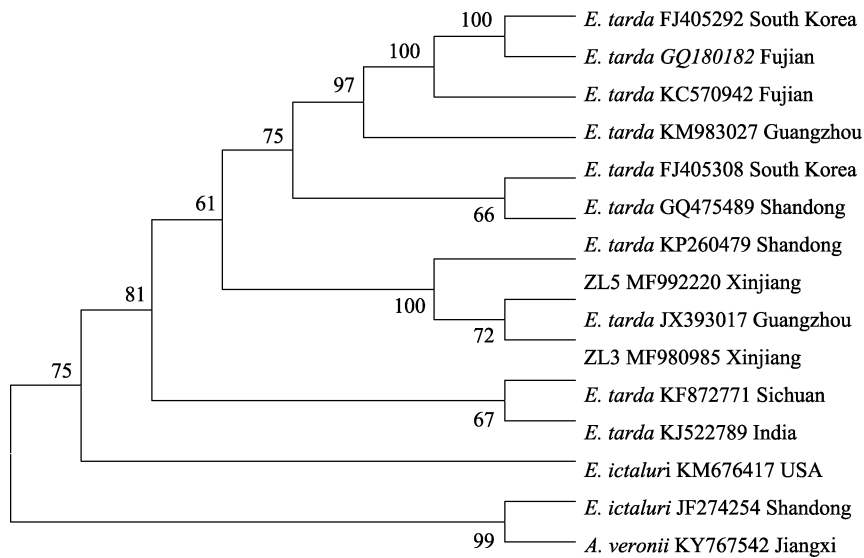


图 2 基于分离菌株 ZL3 和 ZL5 16S rRNA 基因与同源性菌株相应基因构建的系统发育树  
Fig.2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA genes of isolated strain ZL3, ZL5, and corresponding genes of homologous strains

### 2.5 药敏实验结果

用 21 种水产常用药进行药敏实验, 药敏实验判定结果参照美国临床实验室标准化委员会 VET01-A4 标准(表 2)。结果显示, ZL1 株对庆大霉素、米诺环素、头孢他啶等药物高度敏感; 对链霉素、青霉素、克拉霉素、哌拉西林、卡那霉素等耐药。ZL3 株对恩诺沙星、左氧氟沙星、链霉素敏感; 对庆大霉素、青霉素、复方新诺明等药物耐药。ZL5 株对左氧氟沙星、链霉素、恩诺沙星敏感; 对庆大霉素、氨苄西林、青

霉素、复方新诺明等药物耐药。

### 2.6 病理组织切片

正常肠道由内向外分为粘膜、粘膜下层、肌层和外层, 其中, 粘膜和粘膜下层向肠道内突出形成褶皱状的肠绒毛。通过病理组织切片染色, 可观察到病鱼肠粘膜变性坏死(图 3A), 肠道细胞呈凝固性坏死(图 3B)。正常肝脏细胞呈多边形, 边缘整齐, 细胞核在中间(图 3D); 而病鱼肝脏炎性细胞浸润, 脂肪空泡变性(图 3C)。

表2 病原菌的药敏实验结果  
Tab.2 Results of antibiotic sensitivity test of strain pathogenic bacteria

抗生素 Antibiotics	含药量 Content of dispersion ( $\mu\text{g}/\text{pill}$ )	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i>		迟缓爱德华菌 <i>E. tarda</i>			
		ZL1 抑菌圈 Inhibition zone of ZL1	判定结果 Result	ZL3 抑菌圈 Inhibition zone of ZL3	判定结果 Result	ZL5 抑菌圈 Inhibition zone of ZL5	判定结果 Result
庆大霉素 Gentamycin	10	22	S	12	R	10	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	30	14	I	23	S	24	S
阿米卡星 Amikacin	30	14	I	12	I	14	I
链霉素 Streptomycin	10	2	R	19	R	18	R
头孢噻肟 Cefotaxime	30	32	S	25	S	23	S
大观霉素 Spectinomycin	5	16	I	10	R	8	R
氨曲南 Aztreonam	30	36	S	34	S	32	S
复方新诺明 Sulfamethoxazole	23.75/1.25	0	R	0	R	0	R
哌拉西林 Piperacillin	100	0	R	0	R	0	R
氨苄西林 Ampicillin	10	4	R	0	R	0	R
克拉霉素 Clarithromycin	2	12	R	14	R	12	R
阿奇霉素 Azithromycin	15	20	S	12	S	10	R
青霉素 Penicillin G	10	0	R	6	R	6	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	13	I	26	S	18	S
卡那霉素 Kanamycin	30	14	I	16	I	14	I
苯唑西林 Oxacillin	1	0	R	8	R	6	R
四环素 Tetracycline	30	12	R	10	R	12	R
氟苯尼考 Florfenicol	30	16	I	20	S	16	I
米诺环素 Minocycline	30	30	S	18	I	18	I
阿洛西林 Azlocillin	75	20	S	20	S	20	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	32	S	24	R	18	I

注: R: 耐药; I: 中度耐药; S: 敏感

Note: R: Resistant; I: Intermediately resistant; S: Sensitive

## 2.7 致病菌回感实验

为了探究主要致病菌, 进行分组人工回感实验。腹部肌肉注射 ZL1 6 h 后, 可见高浓度组游动缓慢; 12 h 后, 高浓度组开始出现翻肚的现象, 且腹部注射处皮肤红肿; 18 h 后, 开始有死亡现象; 96 h 后, 高浓度 II 组全部死亡; 8 d 内高浓度组全部死亡。

人工腹部肌肉注射 ZL3、ZL5 后, 首日高浓度组可见死亡, ZL5 低浓度组也出现死亡, 怀疑是注射时鱼体的应激所造成。实验鱼注射 12 h 后, 高浓度组出现翻肚侧游现象, 且腹部注射处皮肤红肿; 18 h 后, ZL5 组死亡 4 尾, ZL3 组死亡 2 尾; 96 h 后, ZL5 高浓度 II 组全部死亡; 7 d 内 ZL5 高浓度组全部死亡; 15 d 内 ZL3 高浓度组全部死亡。

将 ZL1、ZL3 和 ZL5 等浓度混匀, 人工腹部肌肉注射 0.1 ml, 正常饲养 3 h 后, 高浓度组和中浓度组出现侧游情况; 6 h 后, 有鱼死亡; 48 h 后, 高浓度

几乎全部死亡; 中浓度 II 组在 5 d 全部死亡。

实验期间, 高浓度组在注射菌液后正常投喂期间, 进食量明显低于低浓度组; 发病时间短于低浓度组; 注菌各组发病症状相似, 从各组死亡与濒临死亡的实验鱼肝脏、肠道等处分离得到与 ZL1、ZL3、ZL5 的形态、生理生化特征相一致的细菌。ZL1、ZL3 和 ZL5 的  $LD_{50}$  依次分别为  $8.91 \times 10^5$ 、 $4.47 \times 10^4$  和  $1.12 \times 10^4$  CFU/ml, 混合组的  $LD_{50}$  为  $0.32 \times 10^4$  CFU/ml。对照组饮食正常, 没有死亡。结果显示, 分离菌都具有致病性, 其中, 迟缓爱德华菌(ZL3 和 ZL5)的致病力更强(表 3)。

## 3 讨论

### 3.1 温和气单胞菌和迟缓爱德华菌对水产业的危害

温和气单胞菌隶属于弧菌科、气单胞菌属, 是水体常见菌, 广泛分布于各类水体中, 是一种条件性致

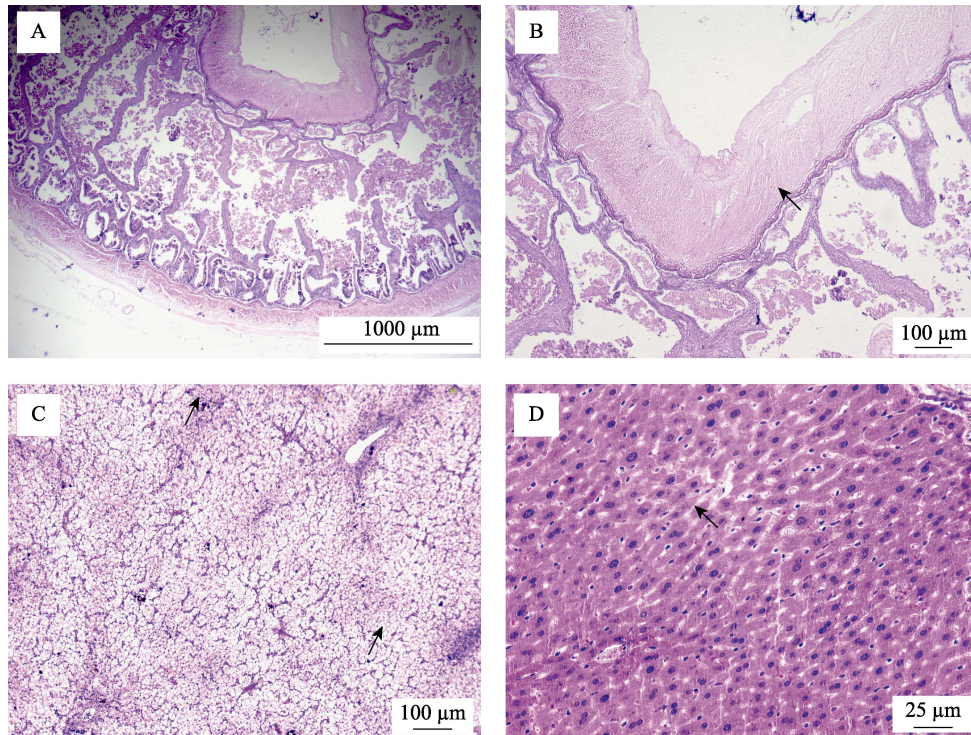


图 3 病理组织切片

Fig.3 Pathological tissue sections

A: 病变肠道纵切面; B: 肠粘膜变性坏死; C: 肝脏炎性细胞浸润、脂肪空泡变性; D: 正常肝脏

A: Infected intestinal longitudinal section; B: Intestinal mucosal degeneration and necrosis;

C: Liver inflammatory cells infiltration, hepatic fatty vacuolar degeneration; D: Normal liver

病菌(陈小莉, 2010)。近年, 气单胞菌造成的水生动物细菌性疾病频发, 从患病异育银鲫(刘永涛等, 2017)、齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)(赵静等, 2016)、鲟鱼(*Acipenser sinensis*)(肖艳翼等, 2015)、斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)(杨移斌等, 2017)、泥鳅(*Oriental weatherfish*)(姚东瑞等, 2010)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(刘敏等, 2005)、黄鳝(*Monopterus albus* Zuiew)(任红梅等, 2010)、黄沙鳖(*Truogx sinensis*)(农新闻等, 2015)、黄金鲫(*Carassius auratus auratus*)(梁利国等, 2013)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(彭宣宪等, 2001)、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)(蔡完其等, 2002)等水生动物体表和肝脏等处分离并鉴定出温和气单胞菌。温和气单胞菌可产生溶血素(hly)(Heuzenroeder *et al*, 1999)、气溶素(aer)(Singh *et al*, 2008)、细胞兴奋性肠毒素(alt)(Granum *et al*, 1998)等毒力因子。

爱德华菌属主要有迟缓爱德华菌和鲇鱼爱德华菌(*E. ictaluri*)。迟缓爱德华菌属于肠杆菌科爱德华氏菌属, 是淡水和海水养殖鱼类的一种重要致病菌(Mohanty *et al*, 2007)。迟缓爱德华菌造成斑点叉尾鲟(段翠兰等, 2013)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)(张晓君等, 2005)、罗非鱼(邓显文等, 2009)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

*idella*)(辛静等, 2011)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)(董传甫等, 2002)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus* Linnaeus)(董丽, 2009)、黄鳝(Shao *et al*, 2016)、中华鳖(*Trionyx sinensis*)(朱芸, 2007)等多种温水性水产动物患病, 很少造成冷水性鱼类患病。刘韬等(2014)报道, 从齐口裂腹鱼体内分离得到该菌, 其他冷水性鱼类未见报道。

迟缓爱德华菌能引起人的脑膜炎、腹膜炎、败血症、软组织感染、肠道疾病, 在热带和亚热带最为常见(Schlenker *et al*, 2009), 中国台湾报道的 22 例肠道感染病例中, 死亡率为 23%, 因此, 提出将此菌作为肠道感染常规检查内容, 以腹泻病病原菌高度重视(Wang *et al*, 2005)。崔新风等(2006)临床报道称, 该菌也可造成肝脓肿。

### 3.2 分离菌药敏结果分析及中药防控优势

通过以上药敏实验, 可见温和气单胞菌对链霉素、青霉素、克拉霉素、哌拉西林、卡那霉素等药耐受, 对水产常用药氟苯尼考、左氧氟沙星、恩诺沙星等药呈中度耐受。本结果与梁利国等(2013)和胡琳琳等(2008)的研究结果相似, 但与杨移斌等(2017)的研究结果有所不同。2 株迟缓爱德华菌对庆大霉素、氨

表3 人工回感实验  
Tab.3 Artificial experimental infection

菌株 Strain	浓度组 Group	注射浓度 Injection concentration (CFU/ml)	注射量 Injection volume (ml)	注射尾数 Injection mantissa	实验鱼死亡数量 Deaths of test fish (ind.)							死亡率 Mortality rate (%)	半数致死量 Half lethal dose (CFU/ml)
					1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
ZL1	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	$8.91 \times 10^5$
		$1 \times 10^5$		10	0	0	0	1	0	0	0	10	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	0	0	1	0	0	0	1	20	
		$1 \times 10^7$		10	1	0	1	2	0	1	0	50	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	1	2	3	2	1	0	0	90	
		$1 \times 10^9$		10	1	3	3	2	0	0	0	100	
ZL3	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	$4.47 \times 10^4$
		$1 \times 10^5$		10	0	0	0	0	0	1	0	10	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	0	0	0	1	0	0	1	20	
		$1 \times 10^7$		10	0	0	1	1	1	0	0	30	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	0	2	2	2	0	0	1	70	
		$1 \times 10^9$		10	2	2	3	2	0	0	0	90	
ZL5	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	1	0	0	0	0	0	0	10	$1.12 \times 10^6$
		$1 \times 10^5$		10	0	1	0	0	0	0	0	10	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	0	0	0	1	1	0	1	30	
		$1 \times 10^7$		10	0	1	2	1	1	0	1	60	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	1	3	2	2	1	1	0	100	
		$1 \times 10^9$		10	3	3	2	2	0	0	0	100	
混合 Mixture	低 Low	$1 \times 10^4$	0.1	10	2	1	0	1	0	0	0	40	$0.32 \times 10^4$
		$1 \times 10^5$		10	2	1	1	1	0	0	0	50	
	中 Middle	$1 \times 10^6$		10	3	2	1	1	0	0	0	70	
		$1 \times 10^7$		10	4	3	1	1	1	0	0	100	
	高 High	$1 \times 10^8$		10	7	2	1	0	0	0	0	100	
		$1 \times 10^9$		10	9	1	0	0	0	0	0	100	
无菌生理盐水 Sterile saline			0.1	10	0	0	0	0	0	0	0		

苄西林、青霉素、复方新诺明耐药，对氟苯尼考、卡那霉素、阿米卡星中度耐受，与刘韬等(2014)的研究结果相似，实验结果不同可能是和渔场日常使用抗生素的不同有关，重复的使用一种抗生素，是造成细菌耐药的主要原因之一。据报道，使用中草药治疗鱼类细菌病具有安全、绿色、环保、减少耐药性、降低生产成本、提高鱼体抵抗力的优点，使其在防控鱼类细菌病中有一定的优势。陈晓利(2010)报道，五倍子、黄芩和杨树花对温和气单胞菌抑菌效果较好。梁利国等(2010)、高桂生等(2016)和金洁南(2016)也对温和气单胞菌进行过中草药抗菌研究，结果表明，使用中草药治疗气单胞菌引起的水产病害是可行的。陈言峰等

(2011)和刘春等(2013)使用五倍子和石榴皮对迟缓爱德华菌进行体外抑菌实验，证明二者抑菌作用明显。张文青等(2012)实验证明五倍子、五味子和乌梅对嗜水气单胞菌有明显抑菌作用。这些结果均可为温和气单胞菌、迟缓爱德华菌感染引起的水生动物细菌病的中草药治疗提供科学、安全的用药依据。

河鲈是我国仅分布于额尔齐斯河和乌伦古湖的一种名贵冷水性鱼类，本研究首次对人工养殖的河鲈进行了细菌病的研究，从其体内分离并鉴定出2种致病菌，且均具有较高的致病性及致死性。目前，以河鲈等为代表的额尔齐斯河土著鱼类的养殖较为活跃，其细菌病的防控不容小觑。

## 参 考 文 献

- Cai WQ, Sun PF, *et al.* A pathogen study on disease caused by *Aeromonas sobria* in tilapia and drug sensitive test. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3): 243–246 [蔡完其, 孙佩芳. 罗非鱼温和气单胞菌病的病原研究和药敏试验. *中国水产科学*, 2002, 9(3): 243–246]
- Chen XL. Study on preventive measures for *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in rice field eel (*Monopterus albus*). Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2010, 48–56 [陈晓利. 黄鳝嗜水气单胞菌病和温和气单胞菌病的防治研究. *四川农业大学硕士研究生学位论文*, 2010, 48–56]
- Chen YF, Zou JX. *In vitro* antibacterial activity of 20 Chinese herbs to pathogenic *Edwardsiella tarda*. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(5): 110–113 [陈言峰, 邹记兴. 20 种中草药对迟缓爱德华氏菌的体外抑菌试验. *水生态学杂志*, 2011, 32(5): 110–113]
- Cui XF, Liu Z, Sun D, *et al.* Complex bacterial liver abscess 1 case report. *Chinese Journal of Infection Control*, 2006, 5(4): 372, 324 [崔新风, 刘真, 孙丹, 等. 复数菌肝脓肿 1 例报告. *中国感染控制杂志*, 2006, 5(4): 372, 324]
- Deng XW, Xie ZX, Liu JB, *et al.* Isolation and identification of *Edwardsiella tarda* in *Tilapia nilotica*. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(1): 114–117 [邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟缓爱德华氏菌的分离与鉴定. *水生态学杂志*, 2009, 2(1): 114–117]
- Dong CF, Lin TL, Chen RS, *et al.* Studies on pathogenicities and biochemical characteristics of pathogens which caused *Anguilla japonica* bacterial septicaemia and ascites. *Fisheries Science*, 2002, 21(1): 5–8 [董传甫, 林天龙, 陈日升, 等. 日本鳗鲡败血腹水病病原研究. *水产科学*, 2002, 21(1): 5–8]
- Dong L. Identification and aethionological of pathogenic bacteria of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2009, 15–29 [董丽. 养殖大菱鲆几种重要细菌性疾病病原菌的鉴定及其病原学初步研究. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2009, 15–29]
- Duan CL, Liu XM, Wang XD, *et al.* Separation of *Edwardsiella hoshinae* and histopathological changes of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(3): 89–92 [段翠兰, 刘训猛, 王习达, 等. 斑点叉尾鲷保科爱德华氏菌的分离鉴定和组织病理观察. *广东海洋大学学报*, 2013, 33(3): 89–92]
- Fang H, Chen CZ, Zhang XJ. *Aquaculture animal pathogenic bacteriology*. Beijing: China Agriculture Press, 2010, 170–173, 410–412 [房海, 陈翠珍, 张晓君. *水产养殖动物病原细菌学*. 北京: 中国农业出版社, 2010, 170–173, 410–412]
- Gao GS, Zhang YY, Gao GP, *et al.* Isolation, identification of pathogenic bacteria of rotten skin disease in *Tilapia mossambica* and sensitivity test to Chinese herbal medicine. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2016, 45(5): 148–151 [高桂生, 张艳英, 高光平, 等. 罗非鱼腐皮病原菌分离鉴定及其对中草药敏感性试验. *河南农业科学*. 2016, 45(5): 148–151]
- Granum PE, O'Sullivan K, Tomás JM, *et al.* Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1998, 21(2): 131–137
- Heuzenroeder MW, Wong CYF, Flower RLP. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp: Correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(1): 131–136
- Hu LL, Fang WH, Liang SC, *et al.* Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas sobria* from goldfish. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(3): 285–290 [胡琳琳, 房文红, 梁思成, 等. 金鱼温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验. *上海水产大学学报*, 2008, 17(3): 285–290]
- Jin JN. Isolation and identification of pathogenic bacteria from hybrid snakehead (*Channa maculate*♀×*Channa argus*♂) with ulcer disease and screening of Chinese herbal medicine for prevention and treatment. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016, 42–44 [金洁南. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)溃疡病原菌的分离、鉴定及其防治中草药的筛选. *华中农业大学硕士研究生学位论文*, 2016, 42–44]
- Li Y, Liu J, Wei DD, *et al.* Study on the improvement of histopathological tissue slicing method. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014(8): 154–157 [李钰, 刘佳, 韦丹丹, 等. 动物病理组织切片制作方法改良的探讨. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(8): 154–157]
- Liang LG, Bing XW, Zhang XJ, *et al.* The antimicrobial effects of 18 kinds of Chinese herbs decoction to pathogenic *Aeromonas sobria* *in vitro*. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(1): 66–69 [梁利国, 邴旭文, 张晓君, 等. 18 种中草药煎液对温和气单胞菌的抑、杀菌效果. *淡水渔业*, 2010, 40(1): 66–69]
- Liang LG, Ma XY, Xie J. Isolation, identification and detection of hemolysin of *Aeromonas sobria* from *Carassius auratus auratus*. *Journal of Hydroecology*, 2013, 34(5): 76–81 [梁利国, 马昕羽, 谢骏. 黄金鲫温和气单胞菌鉴定及溶血素基因检测. *水生态学杂志*, 2013, 34(5): 76–81]
- Liu C, Li KB, Wang Q, *et al.* Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(3): 105–111 [刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性. *华中农业大学学报*, 2013, 32(3): 105–111]
- Liu M, Han Y. Isolation and identification of *Aeromonas sobria* from infected carps and sensitivity to drugs. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2005, 36(4): 486–489 [刘敏, 韩英. 鲤鱼温和气单胞菌的分离鉴定和药敏试验. *东北农业大学学报*, 2005, 36(4): 486–489]



- Liu T, Wang KY, Geng Y, *et al.* Identification of *Edwardsiella tarda* from infected *Schizothorax prenanti*. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(8): 636–640 [刘韬, 汪开毓, 耿毅, 等. 齐口裂腹鱼源致病性爱德华菌的鉴定及致病性研究. 中国预防兽医学报, 2014, 36(8): 636–640]
- Liu YT, Li L, Yang H, *et al.* The antibacterial effect of tilmicosin on aquatic pathogenic bacteria *in vitro* and *in vivo* and toxic effect of tilmicosin on *Carassius auratus gibelio*. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(4): 51–58 [刘永涛, 李乐, 杨红, 等. 替米考星对水产致病菌体内外抗菌和对异育银鲫毒性作用. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(4): 51–58]
- Mohanty BR, Sahoo PK. Edwardsiellosis in fish: A brief review. Journal of Biosciences, 2007, 32(Suppl3): 1331–1344
- Nong XW, Huang YH, Long S, *et al.* Isolation, identification and virulence gene detection of pathogenic *Aeromonas sobria* from *Truogx sinensis*. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1322–1328 [农新闻, 黄艳华, 龙苏, 等. 黄沙鳖致病性温和气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1322–1328]
- Peng XX, Chen Y, Wang SY, *et al.* Effect of passive immunization on Crucian carp against *Aeromonas sobria*. Journal of Fishery Sciences of China, 2001, 8(4): 41–45 [彭宣宪, 陈艳, 王三英, 等. 被动转移免疫在鲫感染温和气单胞菌中的作用. 中国水产科学, 2001, 8(4): 41–45]
- Ren HM, He Z, Yang DY, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity of causative pathogen for muscular ulcer in *Monopterus albus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(6): 1106–1112 [任红梅, 何智, 杨德英, 等. 黄鳝体表溃疡病原菌的分离与鉴定. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1106–1112]
- Ren ML, Guo Y, Zhang RM, *et al.* The Irtysh fish resources and fisheries of China. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health Press, 2002, 177–183 [任慕莲, 郭焱, 张人铭, 等. 中国额尔齐斯河鱼类资源及渔业. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 2002, 177–183]
- Schlenker C, Surawicz CM. Emerging infections of the gastrointestinal tract. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2009, 23(1): 89–99
- Shang H, Wang SS, Shen ZY. National clinical laboratory procedures. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015, 578–594 [尚红, 汪毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 北京: 人民卫生出版社, 2015, 578–594]
- Shao JC, Yuan JF, Shen YL *et al.* First isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from diseased Asian swamp eel, *Monopterus albus* (Zuiew). Aquaculture Research, 2016, 47(11): 3684–3688
- Singh V, Rathore G, Kapoor D, *et al.* Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(4): 453–458
- Tang FJ, Jiang ZF, Adakbek K, *et al.* Perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus) growth variation and inducing reasons of Lake Ulungur, Xinjiang Province in the last two decades. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(1): 117–122 [唐富江, 姜作发, 阿达可白克·可尔江, 等. 新疆乌伦古湖河鲈二十年来种群生长变化及原因. 湖泊科学, 2009, 21(1): 117–122]
- Tang FJ, Jiang ZF, Adakbek K, *et al.* Diet composition of Perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus) in Ulungur Lake. Chinese Journal of Fisheries, 2008, 21(1): 49–52 [唐富江, 姜作发, 阿达可白克·可尔江, 等. 新疆乌伦古湖河鲈食性变化的研究. 水产学杂志, 2008, 21(1): 49–52]
- Wang IK, Kuo HL, Chen YM, *et al.* Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. International Journal of Clinical Practice, 2010, 59(8): 917–921
- Xiao YY, Wang B, Xia YT, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *Aeromonas sobria* from sturgeon. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(10): 1909–1914 [肖艳翼, 王斌, 夏永涛, 等. 鲟病原性温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验. 南方农业学报, 2015, 46(10): 1909–1914]
- Xin J, Sun HC, Yan SH, *et al.* Isolation and identification of 1 pathogenic bacteria strain of juvenile grass carp and drug susceptibility test. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2011(5): 90–91 [辛静, 孙翰昌, 闫胜华, 等. 1株幼草鱼病原菌的分离鉴定及药敏试验. 黑龙江畜牧兽医, 2011(5): 90–91]
- Yang YB, Xu N, Dong J, *et al.* Isolation and identification of *Aeromonas sobria* from *Ictalurus punctatus* and its antimicrobial susceptibility. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(4): 45–50 [杨移斌, 胥宁, 董靖, 等. 斑点叉尾鲟病原中温和气单胞菌的分离鉴定及药敏特性分析. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(4): 45–50]
- Yao DR, Bing XW, Zhu M, *et al.* Molecular identification and drug resistance of pathogenic *Aeromonas sobria* isolated from *Misgurnus anguillicaudatus*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(5): 756–762 [姚东瑞, 邢旭文, 朱明, 等. 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)分子鉴定及耐药性研究. 海洋与湖沼, 2010, 41(5): 756–762]
- Zhang WQ, Gong YF, Jin S, *et al.* Antimicrobial tests of Chinese herbal medicines and their mixtures on *Aeromonas hydrophila*. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(1): 114–121 [张文青, 龚一富, 金思, 等. 中草药及其配伍对嗜水气单胞菌的抑菌作用. 渔业科学进展, 2012, 33(1): 114–121]
- Zhang XJ, Zhan WB, Chen CZ, *et al.* Studies on the infection and pathogen of *Edwardsiella tarda* in flounder *Paralichthys olivaceus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(1): 31–37 [张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究. 水生生物学报, 2005, 29(1): 31–37]
- Zhao J, Wang L, Zhong HM. Changes of serum antioxidant enzymes in *Schizothorax prenanti* artificially infected with

- Aeromonas sobria*. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2016, 42(6): 621–625 [赵静, 王利, 钟红梅. 温和气单胞菌对齐口裂腹鱼血浆中抗氧化酶的影响. 西南民族大学学报(自然科学版), 2016, 42(6): 621–625]
- Zhao JS, Yao WJ, Jiao L, *et al.* Monogeneans of Ergis River fishes III. A new record of the genus *Dactylogyrus* in China. Journal of Hydroecology, 2011, 32(2): 140–142 [赵江山, 姚卫建, 焦丽, 等. 额尔齐斯河鱼类单殖吸虫研究III. 指环虫属一新记录. 水生态学杂志, 2011, 32(2): 140–142]
- Zhu Y. The identification of bacterial pathogen of *Trionyx sinensis* and the clone of *Hermolysin actlvatorgene* of *Edwardsiella tarda*. Master's Thesis of Guangxi University, 2007, 17–19 [朱芸. 中华鳖“浮肿病”病原菌的鉴定及迟钝爱德华氏菌溶血活化基因的克隆. 广西大学硕士研究生学位论文, 2007, 17–19]

(编辑 马璀璨)

## Isolation, Identification, and Antibiotic Sensitivity of Bacillary Enteritis in *Perca fluviatilis* Linnaeus

YANG Kunming, GUO Aimin, MA Jiangxia, DUAN Chengren, XIE Zhisheng, YUE Cheng<sup>①</sup>  
(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

**Abstract** The current development of Xinjiang indigenous fish *via* large-scale farming has been listed for the positioning and development of aquaculture in Xinjiang. *Perca fluviatilis* Linnaeus is an indigenous fish and peculiar to the Ergis River in Xinjiang. *P. fluviatilis* is a cold-water fish, but very few studies have investigated cold-water fish diseases, including bacterial disease. Presently, artificial breeding of perch is being initiated. However, there have been few analyses of disease in perch. In 2016, a large number of perch in the Wujiaqu Fisheries Extension Station died suddenly. Diseased fish exhibited anal swelling, abdominal swelling, surface scale cast-off, rotten tail, and rotten gill symptoms. The dominant bacterial strain was isolated from the fish liver and intestines. After culturing for 24 h at 20°C, ZL1 formed neat edges with a slight uplift in the middle, a smooth surface, a light-yellow color, a special aromatic odor, and bacterial colonies 1.5~2 mm in size. It formed a clear  $\beta$ -hemolysis circle on blood agar. ZL3 and ZL5 formed a round, slightly uplifted, smooth, moist, off-white, translucent, colony of 0.5~1 mm in size, but did not form a hemolysis circle on blood agar. The isolated bacteria were cultured, the bacterial species were identified, and drug susceptibility and pathogenicity tests were performed. Pathogenicity tests and morphological observation showed that the isolates had obvious pathogenicity. Gram staining, physiological and biochemical characteristics, analysis of 16S rRNA gene sequences, and phylogenetic tree development identified ZL1 as *Aeromonas sobria*, and ZL3 and ZL5 as *Edwardisella tarda*. Drug sensitivity test showed that ZL1 was highly sensitive to gentamycin, minocycline, and ceftazidime, and resistant to streptomycin, penicillin, and clarithromycin. ZL3 and ZL5 were highly sensitive to levofloxacin, streptomycin, and enrofloxacin, and resistant to gentamicin, ampicillin, penicillin, and sulfamethoxazole.

**Key words** *Perca fluviatilis* Linnaeus; *Aeromonas sobria*; *Edwardisella tarda*; Identification; Drug sensitive test

① Corresponding author: YUE Cheng, E-mail: yuechengxnd@aliyun.com