

罗非鱼(*Tilapia nilotica*)简达气单胞菌病的病原 分离鉴定及药敏试验*

杨宁¹ 姜芳燕² 黄海^{1①} 焦健³

(1. 三亚市南繁科学技术研究院 三亚 572000; 2. 琼州学院 三亚 572022;
3. 邯郸市永年县农牧局水产技术服务站 邯郸 057150)

摘要 从患病罗非鱼(*Tilapia nilotica*)体内分离得到细菌 NL05, 通过回归感染试验确定 NL05 为致病菌, 并测出 NL05 对罗非鱼的半致死量(LD₅₀)为 1×10^3 CFU/g。结合细菌形态学特征、生理生化指标和 16S rRNA 基因同源分析, 鉴定 NL05 为简达气单胞菌(*Aeromonas jandaei*)。形态学观察发现, NL05 为革兰氏阴性、短杆状; 生理生化试验中麦芽糖、甘露醇、葡萄糖、水杨素、硫化氢等 13 种指标为阳性, 蔗糖、阿拉伯糖、木糖、肌醇、卫矛醇等 10 种指标为阴性。药敏试验显示, NL05 对奥复星、丙氟哌酸、丁胺卡那霉素、多粘菌素 B、氟哌酸、利福平、洁霉素等 13 种抗生素敏感, 对阿奇霉素、菌必治、卡那霉素、链霉素、美满霉素 5 种抗生素中介, 对氨苄青霉素、阿莫西林、恩诺沙星、复方新诺明、甲氧苄啶等 13 种抗生素耐药。

关键词 罗非鱼; 简达气单胞菌; 致病性; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0083-06

罗非鱼(*Tilapia nilotica*)因生长快、肌间刺少、肉质好等优点, 已成为我国重要的水产养殖品种之一。随着罗非鱼养殖规模的不断扩大, 病害时有发生, 给养殖户造成巨大经济损失, 特别是细菌性疾病尤为严重。其中, 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是罗非鱼常见致病菌之一(郭玉娟等, 2012; 柴家前等, 2002; 邓恒为, 2013¹⁾)。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)也是常见的罗非鱼致病菌(刘加波等, 2006; 杨宁等, 2014)。除以上两种常见致病菌外, 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)也是致病菌之一(王忠敏等, 2012)。2011年海南省三亚市某罗非鱼养殖场发生细菌性疾病, 罗非鱼死亡率达 30%, 本研究针对这次罗非鱼病的病原进行分离、纯化, 同时进行药敏试验, 为罗非鱼简达气单胞菌病的病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

发病罗非鱼和健康罗非鱼于 2011 年 10 月取自海南省某水产养殖场, 体长为(11.22±0.74) cm, 体重为(22.03±1.30) g。细菌分离试验中的琼脂培养基配方: 牛肉膏 3 g、酵母浸膏 1 g、蛋白胨 5 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g, 定容至 1000 ml, pH 为 7.2。细菌鉴定微量生化发酵管购自广东环凯微生物科技有限公司; 16S rRNA 试验试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; 抗生素药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离 选择患病个体, 用 75%酒精

* 三亚市院地科技合作项目(2011YD115; 2012YD73)和三亚市重点实验室建设项目(L1209)共同资助。杨宁, E-mail: dayangning@163.com

① 通讯作者: 黄海, 研究员, E-mail: huanghai74@126.com

收稿日期: 2014-06-23, 收修改稿日期: 2014-08-26

1) 邓恒为. 海南罗非鱼链球菌病原分离鉴定及防治中草药筛选. 海南大学硕士研究生学位论文, 2013, 18-25

严格消毒,剪开腹部,在无菌操作台内用接种环分别从腹水、肝脏、肠道、脾脏等器官取样,接种于琼脂培养基上。恒温 30℃ 培养 24 h,挑取优势菌落二次纯化培养,挑取单菌落划线于营养琼脂斜面,4℃ 短期储存备用,15%甘油、-80℃ 长期保种。

1.2.2 致病菌的筛选 将试验用健康罗非鱼在室内暂养 7 d 后,选取健康个体用于感染试验。分设试验组和对照组,每组两个平行组,每个平行组用鱼 10 尾。将分离到的细菌用生理盐水配成 10^7 CFU/ml 菌液,采用腹腔注射方式感染,每尾注射量为 0.2 ml,对照组注射同剂量的灭菌生理盐水。试验期间正常投饵,气石充气,每 2 d 更换 1/2 体积的水,水温为 28–30℃,溶氧保持在 5.0 mg/L 以上。观察记录 10 d 内各组的死亡情况,及时捞出死亡个体,减少死鱼对水质的恶化。观察病死罗非鱼特征,分离内脏细菌,比较分离到的细菌与原病原菌形态和理化特性是否一致。

1.2.3 病原菌对罗非鱼半致死量的测定 半致死量的测定参考沈建忠(2002)和徐叔云等(2002)的方法,采用腹腔注射感染罗非鱼测定病原菌的半致死量(LD_{50}),试验方法同 1.2.2,试验组分为 6 组,每组病原菌浓度分别为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 和 1×10^3 CFU/ml,对照组注射无菌生理盐水,观察记录 10 d 内的死亡情况,用 SPSS 19 计算 LD_{50} 。

1.2.4 致病菌的形态观察和生理生化反应 对细菌革兰氏染色,显微镜下观察形态特征,并观察培养 24 h 的固体培养基上的菌落特征。根据生化鉴定管说明书来判断细菌生化反应阴阳性,参照《伯杰细菌鉴定手册》(布坎南,1994)、《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等,2001)中的标准菌株对致病菌进行物种鉴定。

1.2.5 致病菌 16S rRNA 扩增 通过煮沸法获得细菌模板 DNA:将细菌用液体培养基 30℃ 培养 24 h,取 150 μ l 菌液和等体积水,100℃ 煮沸 10 min,然后 12000 r/min 离心 10 min,所得上清液即为模板 DNA。上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',下游引物 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 采用 50 μ l 反应体系:模板 DNA 1 μ l, dNTP Mixture 3 μ l, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l, 10 \times Buffer (Mg^{2+}) 5 μ l, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l) 0.5 μ l, ddH₂O 38.5 μ l。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。将 PCR 产物用 2% 琼脂糖在 100 V 电泳约 40 min,在凝胶成像系统中观察记录,并切胶回收目的片段,送至深圳华大基因有限公司测序。将测序结果提交 NCBI,获取登录号,并用 BLAST 软件进行比对,构建系统发育树。

1.2.6 病原菌的药敏试验 采用药敏纸片扩散法,先将菌悬液用生理盐水稀释至 1.0×10^8 CFU/ml,取 100 μ l 均匀涂布于琼脂培养基上,用无菌镊子将药敏纸片贴在培养基表面,28℃ 恒温培养 24 h 后,测定抑菌圈直径,根据药敏纸片生产厂家的抑菌圈判断标准来判断药物敏感性。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与鉴定

2.1.1 患病鱼体症状和细菌的分离 患病鱼体侧部分鳞片脱落,鳍条腐烂,部分鱼体肛门处红肿,解剖后发现腹腔有大量积水,胆囊肿大,空肠。从胆囊、肝脏、脾脏中未分离到细菌,肠道和腹腔积水中分离到大量细菌,从菌落形态初步判断分离到的细菌菌种较复杂,挑取其中形态特征明显的 6 个菌落纯化培养,其中从肠道分离的细菌编号为 NL03、NL04 和 NL05,从腹腔积水中分离到的细菌编号为 NL06、NL07 和 NL08。

2.1.2 细菌感染试验 将分离到的 6 个菌株扩大培养,对健康罗非鱼进行腹腔注射感染试验,注射浓度为 1.0×10^7 CFU/ml。试验组 NL03、NL04、NL06、NL07 和 NL08 及对照组死亡率均为 0。试验组 NL05 死亡率为 100%,罗非鱼病症与原发病罗非鱼相似,说明 NL05 是引起这次罗非鱼死亡的病原菌。

2.1.3 病原菌对罗非鱼的半致死量 当病原菌 NL05 浓度为 1.0×10^7 CFU/ml 时,罗非鱼死亡率为 100%,当病原菌浓度为 1.0×10^3 CFU/ml 时,罗非鱼死亡率为 0 (表 1)。当菌液浓度为 $1 \times 10^{5.14}$ CFU/ml 时,出现半致死量,经换算 LD_{50} 为 1×10^3 CFU/g。

2.1.4 病原菌形态特征和生理生化鉴定 NL05 在琼脂培养基上经 28℃ 恒温培养 24 h 后,菌落呈圆形、淡黄色、透明,周围整齐、光滑,直径约 1 mm,革兰氏阴性,短杆状。生理生化结果显示, NL05 能分解利用麦芽糖、甘露醇、葡萄糖、水杨素、硫化氢等,不发酵蔗糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖、肌醇、卫矛醇等,VP、氧化酶和接触酶阳性(表 2)。所测 23 项指标与简达气单胞菌的生理生化特性完全一致。

2.1.5 病原菌 16S rRNA 鉴定结果 病原菌 NL05 的 16S rRNA 扩增产物测序结果提交 GenBank,获得登录号为 KC916744。在 MEGA 5.1 软件中构建系统发育树,采用 Neighbor-joining 法,自举分析(Bootstrap) 1000 次,从系统进化树可见(图 1),NL05 和简达气单胞菌属同一分支,同源性和接触酶阳性(表 2)。所测 23 项指标与简达气单胞菌的生理生化特性完全一致。

2.2 药敏试验

病原菌 NL05 对 31 种抗生素的药敏试验结果见表 3。该病原菌对奥复星、丙氟哌酸、丁胺卡那霉素、多粘菌素 B、氟哌酸、利福平、洁霉素等 13 种抗生素敏感;对阿奇霉素、茵必治、卡那霉素、链霉素、美满霉素 5 种抗生素中介;对氨苄青霉素、阿莫西林、恩诺沙星、复方新诺明、甲氧苄啶等 13 种抗生素耐药。

3 讨论

3.1 简达气单胞菌的分离和鉴定

简达气单胞菌在分类地位上属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*),在 1984 年的《伯

杰细菌鉴定手册》中,气单胞菌属还未收录简达气单胞菌,Carnahan 等(1991)确定了简达气单胞菌的最终分类定位。

本研究从患病罗非鱼腹腔积水和肠道中分离得到细菌,通过人工回归感染试验确定 NL05 为病原菌。经过形态学观察、生理生化测定和 16S rRNA 同源性分析等,确定 NL05 为简达气单胞菌。在细菌鉴定方法中,16S rRNA 基因序列分析法现广泛应用于细菌鉴定中,可将大部分细菌鉴定到属,再结合细菌生理生化和形态学特征可将细菌进一步鉴定至种,较传统细菌鉴定方法,此方法具有省时、准确、高效等特点。

3.2 简达气单胞菌的危害性

简达气单胞菌生存范围较广,在淡水和海水中均

表 1 病原菌 NL05 对罗非鱼腹腔注射感染结果
Tab.1 Effects of pathogenic bacteria NL05 on tilapia via intraperitoneal infection

菌液浓度 Bacteria concentration (CFU/ml)	组别 Batch	感染后每天死亡数 Mortality on each day (ind.)										死亡总数 Total mortality	平均死亡率 Average mortality rate (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1.0×10 ⁷	1	0	2	4	4	0	0	0	0	0	0	10	100
	2	1	2	5	1	1	0	0	0	0	0	10	
1.0×10 ⁶	1	0	1	4	2	0	0	0	0	0	0	7	75
	2	0	2	2	3	1	0	0	0	0	0	8	
1.0×10 ⁵	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	4	40
	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4	
1.0×10 ⁴	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	20
	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	
1.0×10 ³	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
对照 Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 病原菌 NL05 的生理生化指标
Tab.2 Physiological and biochemical indexes of pathogen NL05

项目 Items	NL05	简达气单胞菌 <i>A. jandaei</i>	项目 Items	NL05	简达气单胞菌 <i>A. jandaei</i>
蔗糖 Sac	-	-	硫化氢 H ₂ S	+	+
麦芽糖 Mal	+	+	VP	+	+
甘露醇 Man	+	+	七叶苷 Esc	-	-
阿拉伯糖 Ara	-	-	鸟氨酸 Orn	-	-
木糖 Xyl	-	-	赖氨酸 Lys	+	+
乳糖 Lac	-	-	精氨酸 Arg	+	+
葡萄糖 Glu	+	+	赖氨酸脱羧酶 Ldc	+	+
肌醇 Ino	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Odc	-	-
卫矛醇 Dul	-	-	氧化酶 Ox	+	+
吡啶 Ind	+	+	接触酶 Cat	+	+
水杨素 Sal	+	+	葡萄糖产气	+	+
纤维二糖 Cel	-	-	Gas from glucose		

+. 阳性 Positive; -. 阴性 Negative

续表 3

抗生素 Antibiotics	含量 Concentration ($\mu\text{g}/\text{piece}$)	抑菌圈直径 Diameter of the inhibitory zone (mm)	敏感度 Sensitivity
先锋必素 Cefoperazone	75	21	S
乙基西梭霉素 Netilmicin	30	21	S
链霉素 Streptomycin	10	12	I
美满霉素 Minocycline	30	15	I
青霉素 Penicillin	10 U	15	R
强力霉素 Doxycycline	30	12	R
庆大霉素 Gentamicin	10	17	S
四环素 Tetracyclin	30	10	R
妥布霉素 Tobramycin	10	18	S
头孢噻吩 Cefalotin	30	10	R
先锋霉素 V Cephazolin	30	8	R
先锋霉素 VI Cephalosporinum	30	8	R
万古霉素 Vancocin	30	8	R
新霉素 Neomycin	30	17	S

S. 敏感 Sensitive; I. 中介 Intermediate; R. 耐药 Resistant

有发现,为条件致病菌。王一娟(2010)¹⁾和胡萌(2012)²⁾在江苏省部分淡水鱼养殖池塘内检测出简达气单胞菌。简达气单胞菌还可以存活于部分水生生物体内, Siddall 等(2007)在北美水蛭(*Macrobodella decora*)体内检测到与该宿主有寄生关系的简达气单胞菌。李瑾年(1995)在田螺体内分离到4种气单胞菌,其中之一是简达气单胞菌。徐景野等(2002)检测8种市售海产品,其中5种海产品中检测到简达气单胞菌。杨求华(2012)³⁾采用 *cpn60* 和 *dnaJ* 两个功能基因对养殖鳗鲡(*Anguilla japonica*)体内分离到的病原菌进行聚类分析,鉴定为简达气单胞菌。温贵兰等(2012)采用 16S rRNA 基因检测方法,从患病瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)的肝脏中分离到简达气单胞菌。简达气单胞菌不仅可以感染水生生物,还可以感染牲畜,甚至感染人类,是一种人畜共患病原菌(王永贤等, 2003; Joseph *et al*, 1991; 王晓萍等, 1997; 李岷, 1999)。可见,简达气单胞菌感染对象较广、致病性较强,本研究注射感染试验中 NL05 在 4 d 内可将罗非鱼 100%致死,可见该菌的强致病性。气单胞菌属的大部分细菌是导致水产养殖动物病害的主要致病菌,其致病性与其产生的胞外酶类、胞外毒素和黏附因子等毒力因子密切相关,但有关各因子之间的作用

方式和机制研究较少,简达气单胞菌感染罗非鱼的致病机理有待进一步研究。

3.3 简达气单胞菌的防治

针对简达气单胞菌引起的疾病,目前主要以抗生素防治为主。本研究药敏试验结果表明,简达气单胞菌对奥复星等13种抗生素敏感,可为该菌引起的罗非鱼病害防治提供参考。同时发现对先锋霉素 V 和先锋霉素 VI 等13种抗生素耐药,要提倡科学合理使用抗生素,严禁滥用抗生素,减少病原菌耐药性的产生。

参 考 文 献

- 王永贤, 张文东, 张应国, 等. 水牛简达气单胞菌和拉氏普罗威登斯菌的分离与鉴定. 云南畜牧兽医, 2003(4): 1-3
- 王忠敏, 黄惠莉. 一株罗非鱼出血病致病菌的分离与鉴定及组织病理观察. 华侨大学学报(自然科学版), 2012, 33(6): 660-666
- 王晓萍, 陈拱立, 郭维植. 从腹泻患者中检出简达和舒伯特气单胞菌. 海峡预防医学杂志, 1997, 3(1): 26-27
- 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册(第九版). 北京: 科学出版社, 1994, 482-486
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册(第一版). 北京: 科学出版社, 2001, 117-119

1) 王一娟. 江苏地区大宗淡水鱼养殖池塘气单胞菌分离、鉴定和遗传多样性研究. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2010, 34-37

2) 胡萌. 江苏地区气单胞菌分离鉴定及强毒株生物学特性分析. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2012, 39-49

3) 杨求华. 养殖鳗鲡致病性气单胞菌的分离与鉴定. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012, 36-50

- 刘加波, 谢芝勋, 邓显文, 等. 罗非鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定. 水利渔业, 2006, 26(4): 100-103
- 李岷. 急性腹泻弧菌科细菌鉴定及药敏试验. 南通医学院学报, 1999, 19(2): 203
- 李槿年. 从田螺中分离出四种气单胞菌. 肉品卫生, 1995(7): 8-9
- 杨宁, 黄海, 张希, 等. 尼罗罗非鱼嗜水气单胞菌病的病原分离鉴定和药敏实验. 水产科学, 2014, 33(5): 306-610
- 沈建忠. 动物毒理学. 北京: 中国农业出版社, 2002, 84-95
- 郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究. 水产学报, 2012, 36(3): 399-406
- 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 1651-1654
- 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20
- 徐景野, 傅小红, 于梅, 等. 用直接分离法检测贝(甲)壳类海产品中的致病性气单胞菌. 海峡预防医学杂志, 2002, 8(1): 54-55
- 温贵兰, 袁子婵, 张毅, 等. 瓯江彩鲤简达气单胞菌的 16S rDNA 分子鉴定与药敏分析. 黑龙江畜牧兽医, 2012(12): 78-80
- Carnahan A, Fanning GR, Joseph SW. *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose negative species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol, 1991, 29: 560-564
- Joseph SW, Carnahan AM, Brayton PR, et al. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 565-569
- Siddall ME, Worthen PL, Johnson M, et al. Novel role for *Aeromonas jandaei* as digestive-tract symbiont of North American medicinal leech. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(2): 655-658

(编辑 冯小花)

Isolation, Identification and Drug Sensitive Test of *Aeromonas jandaei* from *Tilapia (Tilapia nilotica)*

YANG Ning¹, JIANG Fangyan², HUANG Hai^{1①}, JIAO Jian³

(1. Sanya Sci-Tech Academy of Hainan National Breeding and Multiplication, Sanya 572000; 2. Qiongzhou College, Sanya 572022; 3. Agricultural Technical Service Station of Agricultural and Animal Husbandry Bureau of Yongnian County, Handan 057150)

Abstract *Tilapia* is a very important freshwater aquacultural species in China; however, bacterial disease caused huge economic losses in recent years with the continuous expansion of *tilapia* aquaculture. The aim of this research was to isolate, identify, and test drug sensitivity of bacteria pathogen found in diseased *Tilapia nilotica*. Six bacteria were isolated from diseased *T. nilotica* as suspected pathogenic bacteria. The bacteria (NL05) isolated from intestine of diseased *T. nilotica* was determined as pathogenic bacteria by infection experiment. The LD_{50} was 1×10^3 CFU/g. Bacteria NL05 was identified as *Aeromonas jandaei*. Morphology observation indicated that NL05 was gram-negative, rod-shaped. Thirteen physiological and biochemical indexes were positive including maltose, mannitol, glucose, salicin, and hydrogen sulfide. Ten indexes were negative including saccharum, arabinose, xylose, inositol, and dulcitol. There was 1442 bp in the sequence of 16S rRNA, which was submitted into GenBank (Accession number: KC916744). The phylogenetic tree based on 16S rRNA showed that NL05 was *A. jandaei*. Drug sensitivity test indicated that NL05 was sensitive to 13 antibiotics including ofloxacin, ciprofloxacin, amikacin, polymyxin B, norfloxacin, rifampicin, and lincomycin, and intermediate sensitive to 5 antibiotics including azithromycin, ceftriaxone, kanamycin, streptomycin and minocycline, and resistant to 13 antibiotics including ampicillin, amoxicillin, enrofloxacin, sulfamethoxazole, and trimethoprim. The results will provide references for the prevention and treatment of diseases caused by *T. nilotica*.

Key words *Tilapia nilotica*; *Aeromonas jandaei*; Pathogenicity; Isolation and identification; Sensitivity test

① Corresponding author: HUANG Hai, E-mail: huanghai74@126.com