

一例异育银鲫病源细菌的分离、鉴定及药敏试验

张荧荧,刘张淮,朱春艳,王晓英,管杰,王宇哲,王家军
(宝应县水生动物疫病与预防控制中心,江苏 宝应 225800)

摘要:该试验从异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)病灶部位分离出 3 种病菌,使用细菌学方法分析它们的形态特征,进行 16 S rRNA 基因扩增和测序,并结合生理生化特性鉴定细菌种类。同时对 3 种病菌进行药敏试验。结果显示 3 种病菌分别为栖稻黄色单胞菌(*Pseudomonas oryzae*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。栖稻黄色单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、盐酸多西环素和磺胺甲恶唑+甲氧苄啶高度敏感。嗜水气单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和盐酸多西环素五种抗生素高度敏感。恶臭假单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、盐酸多西环素高度敏感。

关键词:异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*);细菌分离鉴定;药敏试验

中图分类号:S941 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2091(2020)10-0001-04

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是中国科学院水生生物研究所于 1970 年代中后期至 1980 年代初,利用天然雌核发育的方正银鲫为母本,以兴国红鲤为父本,经人工繁育的一个异精雌核发育鲫鱼养殖品种,由于异育银鲫具有多种养殖优势,在 1986 年就已经作为淡水养殖的优良品种而在全国 23 个省市得到推广。近年来中科院水生所选育的异育银鲫“中科 3 号”、“中科 5 号”加快了鲫鱼养殖品种更新的速度,即便如此,异育银鲫养殖过程中病害问题一直存在,近年来渐趋严重,极大影响了养殖异育银鲫的经济效益^[1]。

该试验对一养殖塘发病严重的鲫鱼样品进行了病源细菌的分离鉴定,并进行药敏试验,以期防治鲫鱼常见细菌性疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

患病鲫鱼采自宝应县广洋湖镇,平均体质量 125 g 左右。发病塘口放养鲫鱼密度为每 667 m² 放养 1 600 尾,混养少量花白鲢,4 月初鲫鱼开始发病,出现赤皮、红鳃、水霉病等症状。

1.2 试剂

营养琼脂培养基、营养肉汤培养基;DNA 提取

试剂盒;Protease K、DNA Marker2K、ddH₂O 和 2×EasyTay PCR SuperMix;动物用药敏分析试剂板。

1.3 仪器

洁净工作台、干式恒温器、SHP-160 型生化培养箱、THZ-82B 型空气摇床、MIKRO200R 型台式高速冷冻离心机、S1000 型 PCR 仪、BG-Power 600 型电泳仪、INFINITY-3026 型凝胶成像系统、细菌自动鉴定系统。

1.4 病原菌分离

在无菌条件下使用无菌接种针蘸取鲫鱼病灶部位位于营养琼脂培养基上,在 28 ℃培养箱中培养 24 h,进行 3 次分离纯化,最终选取 3 株优势菌。同时,将分离出的菌落接种于营养肉汤培养基上,于 28 ℃空气摇床中过夜培养,保存菌液。

1.5 细菌初步鉴定

观察分离纯化出来的 3 株菌株形态,使用细菌自动鉴定系统对分离出的 3 株细菌进行初步鉴定。

1.6 DNA 提取

分离菌震荡培养 24 h 后,提取细菌 DNA,按照 DNA 提取试剂盒操作说明。

1.7 16 S rRNA 基因测序和分析

利用细菌 16 S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增。

资助项目:江苏省水生动物病害测报项目

作者简介:张荧荧(1994—),女,助理工程师,从事水产养殖工作. E-mail:1149330091@qq.com

通信作者:王家军(1965—),男,研究员,高级工程师. E-mail:bywjiajun@163.com

16 S rDNA 引物序列:F(5'-AAACTCAAAGGAATTGA CCG-3')和 R(5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3'), 参考彭宣宪等人方法^[2]。PCR 反应体系 25 μL:Su-perMix 12.5 μL,ddH₂O 9.5 μL,正反向引物各 1 μL, 模板 1 μL。PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min;94 ℃ 变性 3 s、56 ℃退火 15 s、72 ℃延伸 10 s,35 次循 环;72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。取一部分扩增产物 进行凝胶成像,观察一下片段大小。剩下的 PCR 扩 增产物送往上海生工生物股份有限公司进行 16 S

rRNA 基因测序。
1.8 药敏试验
使用动物用药敏分析试剂板检测两种细菌对 8 种常见抗生素的药物敏感性,药敏结果判定参照 《抗微生物敏感试验的执行标准》(CLSI)^[3]。
2 结果
2.1 细菌分离
从患病鲫鱼分离出 3 株优势菌(图 1),菌株在 营养琼脂培养基上生长优势良好,分别编号 GY-1-



图 1 3 株优势菌

2、GY-1-3、GY-2-1。
2.2 细菌生物系统初步鉴定结果
将 3 株菌株接种到生化反应板上,放置到 28 ℃ 的培养箱中培养 24 h,使用细菌自动鉴定系统进行 初步鉴定。结果如表 1,初步鉴定 GY-1-2 为栖稻黄 色单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*),GY-1-3 为嗜

水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),GY-2-1 为恶臭 假单胞菌(*P. putida*)。
2.3 16 S rDNA 鉴定
利用细菌 16 S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增产物的凝胶成像图(图 2),片段大小在 500 bp 左右。将测序获得的基因序列提交 BLAST 进行比

表 1 细菌生物系统初步鉴定结果

项目	GY-1-2	GY-1-3	GY-2-1	项目	GY-1-2	GY-1-3	GY-2-1
氧化酶	-	+	-	木糖苷	-	-	-
阿拉伯糖	-	+	+	阿拉伯糖苷	-	+	-
甘露糖	-	+	-	磷酸胆碱	-	-	-
蔗糖	-	+	-	葡萄糖苷酸	-	-	-
蜜二糖	-	-	-	NAG	-	+	-
鼠李糖	-	-	-	GGL	-	+	+
山梨醇	-	+	-	七叶苷	-	+	-
甘露醇	-	+	-	PHE	-	-	-
福寿苣醇	-	-	-	尿素	+	-	+
半乳糖	-	+	-	甘氨酸	+	-	+
肌醇	-	-	-	枸橼酸	-	-	+
磷酸盐	-	-	-	丙二酸	-	-	+
葡萄糖苷	-	+	-	TTC	-	-	+
半乳糖苷	-	+	-	精氨酸	-	+	+
PRO	+	+	+	赖氨酸	-	-	+
二磷酸盐	-	+	-				

对,如表 2 所示,GY-1-3 与嗜水气单胞菌的基因序列相似度最高,GY-1-2、GY-2-1 与假单胞菌的基因序列相似度最高。结合细菌自动鉴定系统的初步鉴定结果,确定 GY-1-2 为栖稻黄色单胞菌,GY-1-3 为嗜水气单胞菌,GY-2-1 为恶臭假单胞菌。

2.4 药敏试验

综合汇总 3 种菌的药敏程度(表 3),栖稻黄色单胞菌恶臭假单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、盐酸多西环素和磺胺甲恶唑+甲氧苄啶高度敏感。嗜水气单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、氟



图 2

表 2 基因序列相似度

菌株序列	菌种	菌株	登录号	最高相似度
GY-1-2	<i>Pseudomonas sp.</i>	13-19	MT255241.1	99.15%
GY-1-3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	NEB724	CP050994.1	98.95%
GY-2-1	<i>Pseudomonas sp.</i>	13-19	MT255241.1	99.15%

表 3 菌株药敏特性

抗生素	最低抑菌浓度			敏感性		
	GY-1-2	GY-1-3	GY-2-1	GY-1-2	GY-1-3	GY-2-1
恩诺沙星	<0.1	<0.1	<0.1	S	S	S
硫酸新霉素	0.39	0.39	0.78	S	S	S
甲砒霉素	12.5	3.13	>200	I	S	R
氟苯尼考	12.5	0.78	>200	I	S	R
盐酸多西环素	0.2	0.39	1.56	S	S	S
氟甲喹	6.25	>200	>200	R	R	R
磺胺间甲氧嘧啶钠	>512	>512	>512	R	R	R
磺胺甲恶唑+甲氧苄啶	4/0.8	128/25.6	256/51.2	S	R	R

注:敏感性标准注:S:高度敏感;I:中度敏感;R:不敏感。

苯尼考和盐酸多西环素 5 种抗生素高度敏感。恶臭假单胞菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、盐酸多西环素高度敏感。

3 讨论

假单胞菌与嗜水气单胞菌广泛分布于自然环境中和水生动物体内,栖稻黄色单胞菌、恶臭假单胞菌属于革兰氏阴性菌,是一种条件性致病菌。恶臭假单胞菌在人体的呼吸道和肠道也有分布,引起人的败血症等。该菌除了感染人之外,对多种水生动物如两栖类、鱼类都有较强的感染性。对不同的水生动物感染恶臭假单胞菌引起的症状与病理变化也有较大的差异^[4-6]。该研究中感染的鲫鱼病理症状为肠炎,解剖后腹腔有恶臭的气味。嗜水气单胞菌

属于气单胞菌科,气单胞菌属。在池塘水质变化,养殖鱼体体质下降时往往诱发疾病,给水产经济造成损失。嗜水气单胞菌易致鲫鱼赤皮、皮肤溃烂、败血症急性死亡^[7-8]。所以如何有效的抑制嗜水气单胞菌与假单胞菌在养殖生产中尤为重要,该研究主要通过分离出的 3 组细菌做药敏试验,对比出抗菌效果较好的几种药物,指导养殖户解决了目前鲫鱼大批量死亡的问题。但在实际应用过程中,这些药物可能会受到温度、环境污染物等多方面影响,要因地制宜地使用。当然,长期滥用同一种抗生素药物在消灭细菌的同时也造成耐药性的问题也值得我们重点关注^[9],药物只是起到辅助作用,在养殖过程中,做好预防管理工作才能获得更好的经济效益。

参考文献:

- [1] 吴霆,朱春艳,王瑶,等. 我国鲫鱼养殖进展[C]. 首届江苏省水产中青年科学家学术论坛论文集,2015(11):315-318.
- [2] 彭宣宪,高华,王三英,等. 采用通用引物 PCR 配合 SSCP 和 RFLP 技术检测鱼病病原菌[J]. 水产学报,2000,24(4):345-348.
- [3] 美国临床和实验室标准化协会.《抗微生物敏感试验的执行标准》(CLSI)[S]. 2018.
- [4] 黄东,邵天波,何增品,等. 骨髓培养分离出栖稻黄色单胞菌 1 例[J]. 云南医药,2004(6):542-543.
- [5] 方振华,代小梅,丁利,等. 中华草龟恶臭假单胞菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 中国畜牧兽医,2019.
- [6] 陈诗宇,王利. 鲫鱼恶臭假单胞菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 水产养殖,2019(10):25-28.
- [7] 祭仲石,厉成新,王中清,等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼的免疫效果[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):168-171.
- [8] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报,1992(3):94-100.
- [9] 贾征. 抗生素耐药性防治措施[J]. 国外医药:抗生素分册,2019,40(1):9-12.

(收稿日期:2020-08-04)

Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic bacteria from a case of *Carassius auratus gibelio*

Zhang Yingying, Liu Zhanghuai, Zhu Chunyan, Wang Xiaoying, Guan Jie, Wang Yuzhe, Wang Jiajun
(Center for prevention and control of aquatic animal diseases, Baoying County, Jiangsu Province, 225800)

Abstract: In this study, three pathogenic bacterium, which were identified by morphological analysis and 16S rRNA sequencing technique, were isolated from the lesion of *Carassius auratus gibelio*. Furthermore, drug sensitivity tests were conducted on these pathogenic bacterium. The results showed that the three pathogenic bacterium were *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas oryzihabitans* and *P. putida*. *A. hydrophila* was highly sensitive to enrofloxacin, neomycin sulfate, thiamphenicol and florfenicol, as well as doxycycline hydrochloride. *P. oryzihabitans* was significantly sensitive to enrofloxacin, neomycin sulfate, doxycycline hydrochloride and sulfamethoxazole+trimethoprim. *P. putida* was highly sensitive to enrofloxacin, neomycin sulfate, and doxycycline hydrochloride.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; isolation and identification of bacteria; drug sensitivity test

