

左 跃, 易 弋, 夏 杰, 等. 2 株黄颡鱼源类志贺邻单胞菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 199–201.

2 株黄颡鱼源类志贺邻单胞菌的分离与鉴定

左 跃¹, 易 弋¹, 夏 杰¹, 罗福广², 杨 军^{2,3}, 冯 丹¹, 伍时华¹

(1. 广西工学院生物与化学工程系, 广西柳州 545006; 2. 广西壮族自治区柳州市渔业技术推广站, 广西柳州 545006;

3. 国家罗非鱼产业技术体系柳州综合试验站, 广西柳州 545006)

摘要:广西壮族自洽区柳州市某黄颡鱼养殖场 2 次出现暴发性疾病, 分别从患病黄颡鱼的肝、肾、脾组织中单一分离到 2 株革兰氏阴性杆菌。通过生化特性测定和 16S rDNA 序列分析可知, 2 株细菌均为类志贺邻单胞菌, 但参照药敏试验结果用药, 病情未得到有效控制, 人工感染试验也未见黄颡鱼发病。笔者认为非细菌性病原体可能会导致疾病暴发, 进而引起类志贺邻单胞菌继发感染。本研究首次报道了非致病性类志贺邻单胞菌感染患病黄颡鱼的现象, 在黄颡鱼的养殖过程中若出现此类病征, 应及时按照非细菌性疾病处理, 以免延误病情。

关键词:黄颡鱼; 类志贺邻单胞菌; 继发感染; 分离鉴定

中图分类号: S941.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)09–0199–03

黄颡鱼别称黄腊丁、黄嘎等, 隶属于鲶形目鲶科黄颡鱼属, 以肉质鲜嫩、生长周期短、经济效益高、适温性广、营养价值高等特点倍受养殖户青睐^[1]。但随着养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 黄颡鱼细菌性疾病和非细菌性疾病的暴发也越来越频繁。细菌性疾病的主要致病菌为迟钝爱德华氏菌^[2]、嗜水气单胞菌^[3]等, 非细菌性疾病的病原体主要为病毒、寄生虫等^[4]。类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 在水产养殖中会感染斑点叉尾鲷^[5]、温泉鱼^[6]、异育银鲫^[7]等鱼类, 但尚未发现其感染黄颡鱼的报道。2012 年 8 月、11 月, 广西壮族自治区柳州市某黄颡鱼养殖场 2 次出现暴发性疾病, 笔者分别从患病黄颡鱼的肝、肾、脾组织中单一分离到 2 株非致病性类志贺邻单胞菌。本研究首次报道了非致病性类志贺邻单胞菌感染黄颡鱼的现象, 黄颡鱼养殖生产中若出现相同病征, 应及时按照非细菌性疾病处理, 以免延误病情。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发病黄颡鱼样本分别于 2012 年 8 月、11 月采自柳州市某黄颡鱼养殖场; 血平板购自广东环凯微生物科技有限公司; BHI 培养基、革兰氏阴性杆菌药敏试剂盒购自浙江杭州天和微生物试剂有限公司; 预混 DNA 聚合酶购自北京康为世纪生物科技有限公司; pMD18–T Vector 购自宝生物工程有限公可 (TaKaRa); 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化 (北京) 有限公司。

1.2 病原菌的分离与培养

无菌采取患病黄颡鱼的肝、肾、脾组织, 划线接种于血平

板上, 30 ℃ 恒温培养 24 h, 取单菌落进行纯培养。2012 年 8 月、11 月采取到 2 株细菌, 分别命名为 hs0823、hs1109。

1.3 形态学观察

将菌株接种于血平板上, 30 ℃ 培养 24 h, 观察溶血情况及菌落形态。挑取菌体, 经革兰氏染色后于显微镜下观察菌体形态。

1.4 生化特性测定

参照文献[8]的方法进行相应的生理生化指标测定。

1.5 16S rDNA 序列分析

以 27F(5′–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3′) 和 1492R(5′–GGTACCTTGTTACGACTT–3′) 为引物^[9], 采用 30 ℃ 培养 24 h 后的菌液作为 PCR 模板, 对分离菌的 16S rDNA 进行扩增。反应体系 (50 μL): 2 × Es Taq MasterMix 25 μL, 10 μmol/L 引物各 2 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 稳定 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 采用胶回收试剂盒进行胶回收, 回收产物通过 pMD18–T Vector 进行 TA 克隆后转化到 JM109 大肠杆菌感受态细胞中, 之后涂布于含有 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 于 37 ℃ 下培养 12 h。所得阳性克隆采用质粒提取试剂盒进行质粒提取后, 送至上海英俊生物技术有限公司进行测序。将测序结果提交至 GenBank 数据库进行 BLAST 分析, 采用 MEGA5 软件构建系统发育树^[10]。

1.6 药物敏感试验

使用革兰氏阴性杆菌药敏试剂盒, 按常规纸片法进行药敏试验, 并按照说明书给出的标准判定菌株对药物的敏感度。

1.7 人工感染试验

将 2 个分离菌株分别接种到 BHI 培养基中, 30 ℃ 培养 24 h 后按常规方法计数, 并均稀释为 4 亿 CFU/mL。选取 30 g/尾的健康黄颡鱼 45 尾, 随机分为 3 组, 每组 15 尾。第 1 组, 腹腔注射 hs0823BHI 培养物 0.1 mL/尾; 第 2 组, 腹腔注射 hs1109BHI 培养物 0.1 mL/尾; 第 3 组, 腹腔注射无菌 BHI 培养基 0.1 mL/尾。水温 25 ℃ 隔离饲养, 连续观察 7 d。

收稿日期: 2013–03–21

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (编号: CARS–49); 广西壮族自治区科技重大专项 (编号: 桂科攻 1123006–3)。

作者简介: 左 跃 (1986–), 男, 河北沧州人, 硕士研究生, 研究方向为鱼类病原微生物学。E–mail: zuo–yue@163.com。

通信作者: 易 弋 (1979–), 博士, 副教授, 主要从事微生物学领域的研究。E–mail: yiyi_shx@gxut.edu.cn。

2 结果与分析

2.1 发病黄颡鱼症状

发病黄颡鱼主要症状为:闭口不食、运动失调、头顶出血(图 1-A)、肛门红肿(图 1-B)、腹部肿大(图 1-C)。

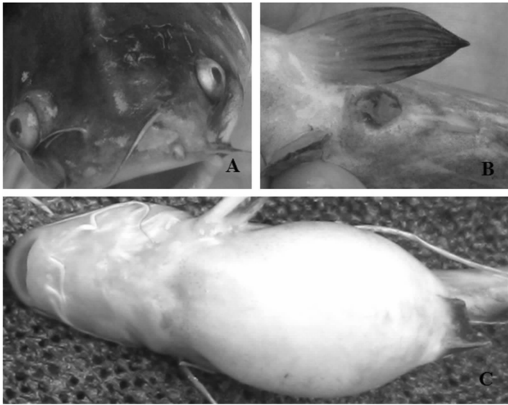


图1 发病黄颡鱼症状

2.2 菌株形态

hs0823、hs1109 形态特征一致,该菌株在血平板上生长,呈 γ 溶血、圆润、灰白色、光滑、边缘整齐的菌落,培养 24 h 后直径 2~3 mm。革兰氏染色阴性,短杆菌,菌体两端钝圆,单个或者成对排列。

2.3 生化特性测定

hs0823、hs1109 的生理生化特性测定结果均与类志贺邻单胞菌参考菌株^[8]一致(表 1),初步鉴定 hs0823、hs1109 为类志贺邻单胞菌。

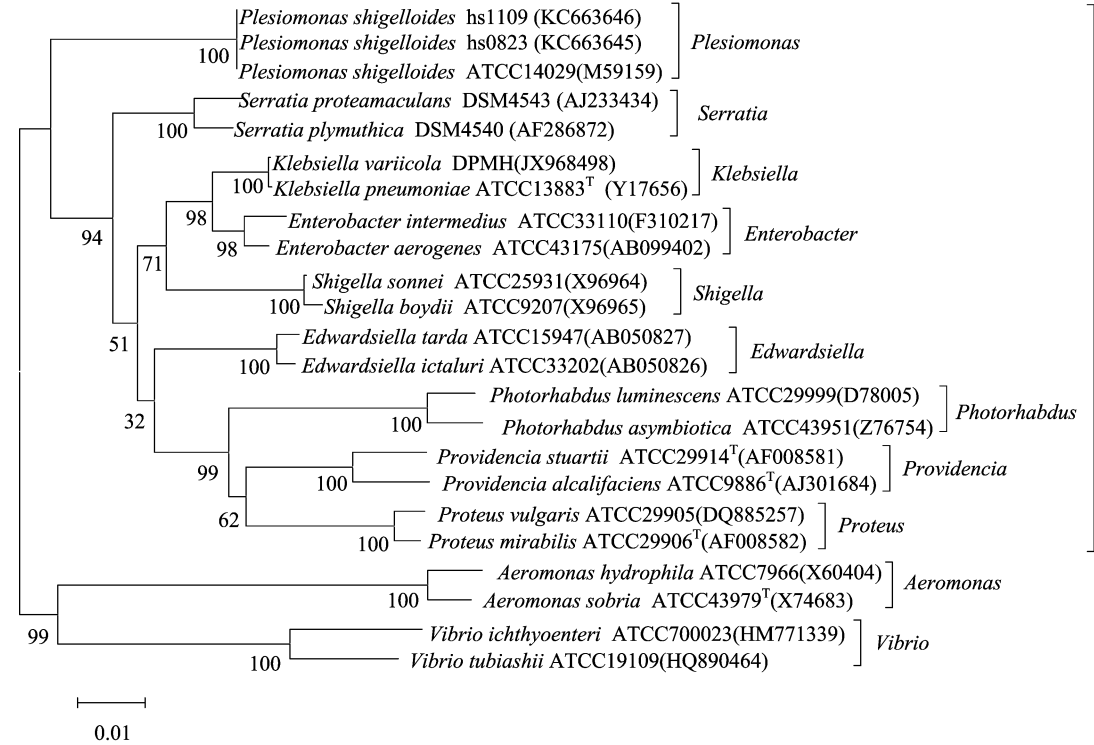


图2 依据 16S rDNA 序列构建的 hs0823 和 hs1109 系统发育树

2.5 药物敏感试验

药物敏感试验结果(表 2)显示,hs0823、hs1109 对头孢类

2.4 16S rDNA 序列分析

以 27F、1492R 为引物,菌株 hs0823、hs1109 的 16S rDNA 序列 PCR 扩增产物测序结果均为 1 417 bp,已登陆 GenBank,登录号分别为 KC663645 和 KC663646。BLAST 分析结果显示,hs0823、hs1109 的 16S rDNA 序列与类志贺邻单胞菌的 16S rDNA 序列同源性 > 99%。系统发育树表明,hs0823、hs1109 与肠杆菌科(Enterobacteriaceae)邻单胞菌属(Plesiomonas)类志贺邻单胞菌聚为一类(图 2)。通过生化特性测定和 16S rDNA 序列分析可知,hs0823、hs1109 为类志贺邻单胞菌。

表 1 hs0823、hs1109 和类志贺邻单胞菌参考菌株生理生化特性

测定项目	测定结果		
	hs0823	hs1109	类志贺邻单胞菌
运动性	+	+	+
氧化酶	+	+	+
吡嗪产生	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+
精氨酸双水解酶	+	+	+
葡萄糖	+	+	+
海藻糖	+	+	+
麦芽糖	+	+	+
乳糖	-	-	-
阿拉伯糖	-	-	-
甘露醇	-	-	-
尿素	-	-	-
七叶苷	-	-	-
VP 试验	-	-	-

药物表现出很强的敏感性,而对氨苄西林等药物表现出不同程度的中介或耐药性。因此,头孢类药物是治疗该菌疾病的

表 2 hs0823、hs1109 的药物敏感试验结果

药物名称	药物浓度 (μg/片)	hs0823		hs1109	
		抑菌直径 (mm)	敏感性	抑菌直径 (mm)	敏感性
头孢唑啉	30	19	敏感	25	敏感
头孢噻吩	30	21	敏感	26	敏感
头孢呋辛	30	22	敏感	30	敏感
头孢哌酮	75	24	敏感	30	敏感
头孢噻亏	30	29	敏感	33	敏感
头孢曲松	30	31	敏感	34	敏感
头孢吡肟	30	25	敏感	26	敏感
头孢他啶	30	27	敏感	26	敏感
头孢西丁	30	25	敏感	25	敏感
氨基曲南	30	30	敏感	34	敏感
氨苄西林	10	14	中介	11	耐药
氧氟沙星	5	15	中介	13	中介
链霉素	10	13	中介	10	耐药
妥布霉素	10	14	中介	11	耐药
卡那霉素	30	13	耐药	12	耐药
哌拉西啉	100	20	中介	20	中介
麦迪霉素	30	15	中介	17	中介

首选。但使用头孢类药物后,病情并未得到有效控制。

2.6 人工感染试验

人工感染 7 d 后,各组黄颡鱼均未出现死亡现象,而且鱼体无病征。将攻毒后未死黄颡鱼的肝、脾、肾组织划线接种于血平板上,30℃下恒温培养 24 h,无任何菌落检出。这与自然条件下,hs0823、hs1109 富集在患病黄颡鱼的肝、肾、脾组织中不符。

3 结论与讨论

类志贺邻单胞菌为邻单胞菌属中的唯一一种,曾在黄颡鱼肠道内被检出^[11],但尚未见感染黄颡鱼其他组织被检出的报道。本研究在患病黄颡鱼的肝、肾、脾组织中单一分离到类志贺邻单胞菌,首次报道了类志贺邻单胞菌感染黄颡鱼的现象。

朱越雄等曾报道,在患病的中华绒螯蟹组织中分离到非致病性类志贺邻单胞菌,但其同时分离到 3 株嗜水气单胞菌,并确认为致病菌株^[12]。而本研究是单一性地分离到类志贺邻单胞菌,没有分离到其他细菌,因此没有其他致病菌共同感染。参照药敏试验结果用药,病情并未得到有效控制。人工感染试验也未见黄颡鱼发病,而且攻毒 7 d 后,肝、肾、脾组织中没有类志贺邻单胞菌检出,与自然条件下 hs0823、hs1109 富集在患病黄颡鱼的肝、肾、脾组织中不符。由此推测,类志贺邻单胞菌感染并不是引起黄颡鱼暴发性疾病的真正原因。

本研究中黄颡鱼的发病症状和近年来频发的黄颡鱼细菌性“红头病”^[2]和“腹水病”^[3]以及非细菌性“裂头病”^[4]的发病症状相似。其中“红头病”典型病原菌是爱德华氏菌,而“腹水病”典型病原菌是嗜水气单胞菌,在 2 次患病黄颡鱼病原菌分离中,没有发现这 2 种致病菌,除类志贺邻单胞菌外也没有分离出其他细菌。非细菌性“裂头病”的病原体为病毒、支原体、衣原体等,能引起黄颡鱼头顶穿孔、腹部膨大、肛门充血等症状。综合以上分析及试验结果推测,类志贺邻单胞菌

自身并不能感染黄颡鱼,本研究中暴发性疾病很可能是由非细菌性病原体引起黄颡鱼暴发“裂头病”,鱼体患病后,抵抗力降低,从而引起类志贺邻单胞菌的继发性感染。

非致病性类志贺邻单胞菌的检出对黄颡鱼疾病治疗方法的选用很具有迷惑性。若针对该菌采用细菌性疾病的诊治方法,不但不能有效控制疾病暴发,而且还会延误病情,给养殖户带来更大的经济损失。因此,黄颡鱼养殖中若出现相同病症,应及时采用非细菌性“裂头病”的治疗方法,合理有效地控制病情。

虽然本研究中类志贺邻单胞菌不是黄颡鱼的致病菌,但该菌是一种重要的人畜共患病原菌,可引起人类急性感染性腹泻^[13]。因此,在黄颡鱼养殖过程中应加强对该菌的防控力度。若发现养殖鱼感染类志贺邻单胞菌,无论是否致病,都应妥善处理,绝不可进入销售市场。

参考文献:

[1] 黄 钧,陈 琴,陈意明,等. 黄颡鱼的含肉率及肌肉营养价值研究[J]. 广西农业生物科学,2001,20(1):45-50.

[2] 邓先余,罗 文,谭树华,等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)“红头病”病原菌迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的分离及鉴定[J]. 海洋与湖沼,2008,39(5):511-516.

[3] 梁正生,黄 钧,施金谷,等. 黄颡鱼腹水病病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报,2012,43(9):1400-1404.

[4] 陈飞鹏,宋青春,陈秀敏,等. 黄颡鱼“裂头病”的病因及预防[J]. 科学养鱼,2009(2):50.

[5] 陈 林,谭爱萍,邹为民. 斑点叉尾鲷致病菌株的鉴定及特性[J]. 大连水产学院学报,2009,24(3):200-205.

[6] 余 华,何 智,严玉宝,等. 温泉鱼致病性类志贺邻单胞菌和舒氏气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国动物检疫,2009,26(7):37-39.

[7] 陆文浩,杨家新,陈 辉,等. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定[J]. 淡水渔业,2009,39(2):48-53.

[8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:364-398.

[9] Hongoh Y, Yuzawa H, Ohkuma M, et al. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 221(2):299-304.

[10] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.

[11] Wu S G, Gao T H, Zheng Y Z, et al. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Aquaculture, 2010, 303(1/2/3/4):1-7.

[12] 朱越雄,贡成良,薛仁宇,等. 中华绒螯蟹组织中一株类志贺邻单胞菌的分离与特性分析[J]. 中国微生物学杂志,2001,13(5):263-264.

[13] González - Rey C, Siitonen A, Pavlova A, et al. Molecular evidence of *Plesiomonas shigelloides* as a possible zoonotic agent [J]. Folia Microbiologica, 2011, 56(2):178-184.