

柏爱旭,张科,张敬友,等. 黄颡鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):175-178.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.043

黄颡鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定及致病性研究

柏爱旭¹, 张科¹, 张敬友¹, 童明龙², 段宏安³

(1. 淮安出入境检验检疫局,江苏淮安 223001; 2. 宜兴出入境检验检疫局,江苏无锡 214200;
3. 连云港出入境检验检疫局,江苏连云港 222000)

摘要:2015 年江苏淮安地区养殖黄颡鱼暴发出血性肠炎。从濒死鱼肠组织和腹水中分离纯化出 2 株细菌,通过 16S rRNA 进化树分析显示,这 2 株菌与气单胞菌属的嗜水气单胞菌亲缘关系较近。致病性试验显示,2 株菌对健康黄颡鱼具有较强的致病性,病原菌浓度达到 5×10^4 CFU/mL 时,死亡率在 40% ~ 50%,病原菌浓度达到 5×10^8 CFU/mL 时,死亡率在 90% ~ 100%。药敏试验显示,分离到的 2 株菌都对依诺沙星、头孢曲松、舒巴坦、恩诺沙星敏感。确定了淮安地区暴发的黄颡鱼出血性肠炎病原为嗜水气单胞菌,对黄颡鱼健康养殖和疾病防控具有重要意义。

关键词:黄颡鱼;嗜水气单胞菌;致病性;药敏试验

中图分类号: S941.42⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)07-0175-03

黄颡鱼 (*Pseudobagrus fulvidraco* Richardson), 别称黄腊丁、黄骨鱼,在鱼类分类学中属鲇形目 (Siluriformes) 鲇科 (Bagridae), 主要分布在东亚国家。黄颡鱼在我国分布广泛,在各大水系均有分布,特别在长江中下游的湖北、安徽、江苏更为集中^[1],是一种营养价值和药用价值都较高的优质淡水鱼类,也是出口创汇的优良品种。随着市场需求的增大,黄颡鱼的人工养殖在全国各地兴起。过去的几十年中,以繁育技术、养殖工艺以及饲料营养等为主的养殖技术也迅速发展。养殖技术的发展降低了养殖成本,创造了更多的经济效益。

但是由于养殖密度的增加、养殖环境恶化,加之对于传染性疾病预防的重视度不够,黄颡鱼出现了各种疾病,如病毒病、细菌病和寄生虫病,导致产生严重的经济损失。目前,许多中国学者对黄颡鱼的红头病^[2-4]、腹水病^[5-6]、败血症病以及水霉病^[7-8]等进行了报道。除此之外,肠道出血病也是困扰黄颡鱼养殖业的一大问题,但是目前对于黄颡鱼肠道出血病原的报道较少。

2015 年 6 月江苏淮安某黄颡鱼养殖场的黄颡鱼出现大量死亡,病鱼主要症状为腹部肿大,肠道充血,并且部分濒死鱼腹腔内有淡黄色黏稠积液。为查明该病因,经细菌性病原的分离和鉴定,取患病鱼的肠道和积液分离优势菌,最终确定病原为气单胞菌属 (*Aeromonas*)。气单胞菌属普遍存在于自然环境中,经常从人体、鱼体、两栖类以及人的食物中分离到。气单胞菌属为条件性致病菌,在密度过大、水体污染以及缺氧等恶劣环境下,能导致多种鱼类发病和死亡。国内外学者报道了嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*)、温和气单胞菌 (*A. sobria*) 以及维氏气单胞菌属 (*A.*

veronii) 等菌属引起鱼类产生严重疾病^[9-17]。本研究从患病养殖黄颡鱼肠道和腹水中分离出 2 株优势致病菌 (JSHA-01 与 JSHA-02),采用 16S rDNA 序列测定和系统发育分析的方法对 2 株菌进行分类鉴定。嗜水气单胞菌自 20 世纪 80 年代以来在多种淡水鱼类上分离到,造成了巨大的经济损失。通过对病鱼的病理切片观察以及病原菌的回感试验,可分析该病原菌对黄颡鱼致病的病理特征。在此基础上,进行药物敏感性试验,为养殖生产中有效防治该病提供依据。

1 材料与方法

1.1 病料样品、试验鱼及主要试剂

病黄颡鱼样品取自江苏淮安某养殖场;回感试验在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心进行,健康黄颡鱼购自江苏无锡某养殖场,体长 15 ~ 20 cm,体质量 (60 ± 5) g,暂养于实验室玻璃鱼缸中。药敏纸片,购自杭州天和微生物试剂有限公司;细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、琼脂糖凝胶纯化试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司(简称上海生工)。

1.2 细菌的分离纯化

患病黄颡鱼用灭菌生理盐水冲洗 2 ~ 3 次,用经过 70% 乙醇灭菌消毒的解剖工具解剖,取新鲜病灶组织(肠组织以及肠道液),滴加少许灭菌生理盐水,在经过灭菌的研磨器中进行组织匀浆,平板划线法接种于 LB 平板培养基上,37 °C 培养 18 h 后,选取单个、优势菌落划线纯化培养。

1.3 细菌 16S rRNA 分子鉴定

用上海生工的细菌基因组 DNA 抽提试剂盒抽提上述 2 株菌基因组 DNA。在气单胞菌属 16S rRNA 保守区域设计引物扩增 16S rDNA 序列。

正向引物:5' - GAGGTAATGGCTCACCAAGGC - 3';反向引物:5' - CGCTCGTTGCGGGACTTA - 3'。PCR 反应条件:94 °C 2 min;94 °C 15 s,54 °C 30 s,68 °C 1 min,30 个循环;68 °C 10 min。扩增产物进行胶回收,并将其克隆到全式金 pEASY-Blunt Simple 克隆载体上,然后送至上海生工测序,用 MEGA5 软件采用邻接法构建系统发育树进行同源性分析。

收稿日期:2016-11-11

基金项目:江苏出入境检验检疫局科研专项(编号:2015KJ003)。

作者简介:柏爱旭(1987—),男,江苏盐城人,硕士,从事水生动物检验检疫研究。E-mail:baiax@jseciq.gov.cn。

通信作者:段宏安,博士,研究员,从事水生动物检疫技术研究。

E-mail:duanha@jseciq.gov.cn。

1.4 人工感染试验

将分离得到的 JSHA -01 接种于 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养 16 h,离心菌体然后用灭菌生理盐水分别稀释至 5×10^8 、 5×10^6 、 5×10^4 CFU/mL。将暂养 1 周的健康黄颡鱼随机分组,每个梯度的菌悬液接种 10 尾鱼,每尾接种 0.2 mL;对照组黄颡鱼注射等量灭菌生理盐水,记录发病与死亡情况,同时对接种后的发病鱼的肠道及腹腔积液进行细菌再分离纯化培养。对刚刚死亡病鱼进行解剖观察,并固定肠道组织用于病理切片。

1.5 药物敏感试验

按照常规纸片法对经过鉴定的菌株进行 16 种常用抗生素耐药性检测。将 JSHA -01 接种于 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养 16 h,离心菌体,然后用灭菌生理盐水重悬,制成浓度约为 10^8 CFU/mL 的菌悬液。取 0.1 mL 菌悬液涂布于平板培

养基上,将药敏纸片贴于该平板上,37 ℃ 培养 24 h,测量抗生素抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离

从肠组织和腹水中 1 共分离到 5 株优势菌,笔者选取其中 2 株进行后续试验。其菌落直径为 0.5 mm 左右、边缘整齐、圆形,表面光滑、中央凸起、灰白色、不透明。同时用 30% 甘油保存至 -80 ℃ 冰箱。

2.2 16S rRNA 基因同源性分析

JSHA -01 与 JSHA -02 的 16S rRNA 基因序列长度分别为 1 450、1 452 bp,通过 NCBI 检索系统 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列同源性分析。图 1 结果显示,这 2 株菌属于嗜水气单胞菌。

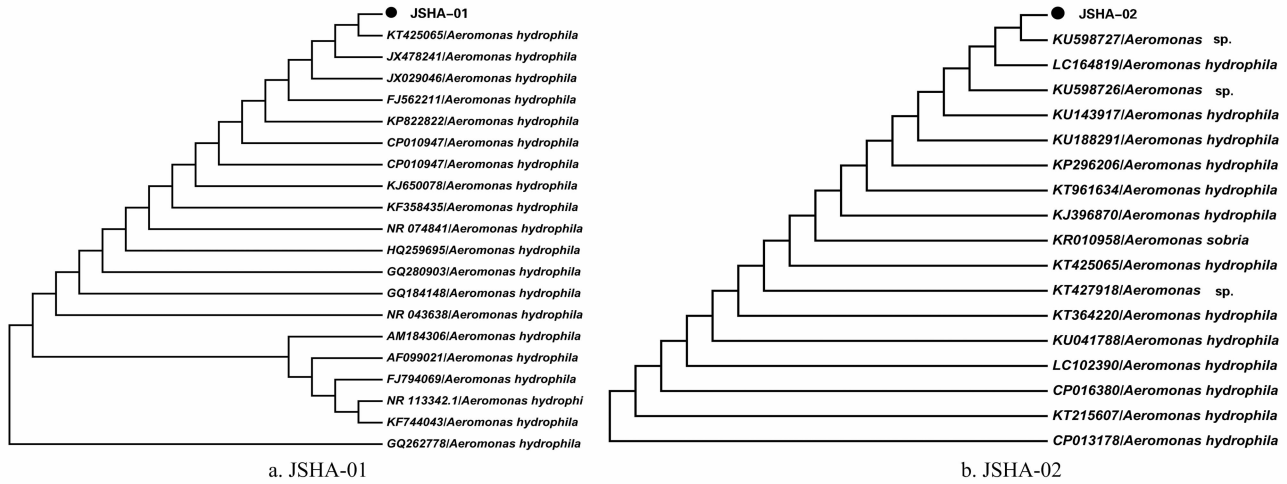


图1 分离菌 JSHA-01、JSHA-02 基于 16S rRNA 基因序列发育进化树

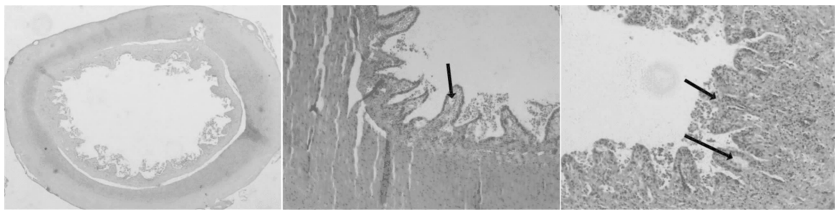
2.3 分离菌的致病性

由表 1 可知,健康黄颡鱼在接种不同梯度的病原菌菌液后死亡情况不一,病原菌浓度达到 5×10^4 CFU/mL 时,死亡率在 40% ~ 50%,病原菌浓度达到 5×10^8 CFU/mL 时,死亡率在 90% ~ 100%,而对照组在试验观察期内未见死亡。死亡黄颡鱼体表正常,解剖发现肠道充血发红,腹腔内有少量黄

色积液,与最初分离病原的病鱼症状类似。取肠道组织及腹腔积液进行细菌分离,经鉴定分离到的病原菌为原菌株。该病原主要引起黄颡鱼肠组织病变,观察肠组织切片(图 2)可知,感染鱼肠绒毛变短变少,肠绒毛顶端开始出现“溶解”,有的开始出现脱落。

表 1 JSHA -01 和 JSHA -02 对健康黄颡鱼的感染试验

组别	病原菌浓度 (CFU/mL)	数量 (尾)	JSHA -01 死亡数(尾)					JSHA -01 死亡率(%)	JSHA -02 死亡数(尾)					JSHA -02 死亡率(%)
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	
处理组	5×10^8	10	2	5	3	0	0	100	1	4	3	1	0	90
处理组	5×10^6	10	1	2	3	1	0	70	1	3	2	2	0	80
处理组	5×10^4	10	2	1	0	1	0	40	0	2	1	2	0	50
对照组	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



a. 肠组织横切面
b. 肠绒毛横切面 1
c. 肠绒毛横切面 2
箭头所示为出现溶解脱落的绒毛

图2 感染鱼肠组织切片

2.4 药敏试验

采用 16 种常用抗生素对致病菌进行耐药性试验,由表 2 可知,分离菌 JSHA-01 对供试的复方新诺明、氯霉素、依诺沙星等 6 种抗生素敏感,对红霉素、新霉素、氨苄西林等 7 种抗生素敏感中介,对新生霉素、青霉素、链霉素等 3 种药物耐药;分离菌 JSHA-02 对供试的头孢曲松、依诺沙星、恩诺沙星等 6 种药物敏感,对红霉素、诺氟沙星、头孢他啶等 7 种药物中介,对复方新诺明、青霉素、链霉素等 3 种药物耐药。

表 2 JSHA-01 和 JSHA-02 的药物敏感试验结果

药物名称	药物浓度 (μg/片)	敏感性	
		JSHA-01	JSHA-02
依诺沙星	10	敏感	敏感
头孢曲松	30	敏感	敏感
氯霉素	30	敏感	中介
头孢唑啉	30	中介	敏感
氨苄西林	10	中介	中介
青霉素	10	耐药	耐药
舒巴坦	75	敏感	敏感
恩诺沙星	5	敏感	敏感
诺氟沙星	10	中介	中介
庆大霉素	10	中介	中介
新霉素	30	中介	敏感
复方新诺明	25	敏感	耐药
头孢他啶	30	中介	中介
链霉素	10	耐药	耐药
红霉素	15	中介	中介
新生霉素	30	耐药	中介

3 讨论

近年来,由于繁殖技术、养殖工艺以及营养饲料等方面的技术不断提升,黄颡鱼养殖规模不断增加。但是疾病频频暴发的问题也随之而来,这给黄颡鱼养殖产业带来了巨大的损失。到目前为止,对于黄颡鱼疾病的防控主要集中在细菌性病原。目前,已经成功分离出细菌性黄颡鱼红头病^[2-4]、腹水病^[5-6]、败血症病^[7]等疾病病原,并在此基础上对病原生物特性以及防控措施进行了研究。但是近年来,国内很多养殖场暴发黄颡鱼肠道出血病,主要症状为病鱼摄食减少,活力下降,体表偶尔有出血,肠黏膜出血严重,腹腔及肠道内有黄色积液。该病死亡率较高,成为困扰黄颡鱼养殖业的一大问题,但到目前为止,对于黄颡鱼肠道出血病病原的报道较少。笔者从江苏淮安某发病养殖场病鱼肠组织和腹水中分离到了 2 株嗜水气单胞菌,证实了该菌为这一疾病的病原。病原菌浓度达到 5×10^4 CFU/mL 时,死亡率在 40% ~ 50%,病原菌浓度达到 5×10^8 CFU/mL 时,死亡率在 90% ~ 100%。梁正生等从广西患有腹水症黄颡鱼上分离到嗜水气单胞菌,引起的病症主要表现为体表、鳍条和鳍基发红,肛门红肿,体表多处溃烂^[6,13]。蒋自立等从患有败血症的黄颡鱼肝脏组织中分离到了嗜水气单胞菌,认为其能引起黄颡鱼败血症,其主要症状为腹部充血膨大,腹腔大量积水,肝略显黄褐色,肠黏膜充血^[7]。上述 2 个案例症状均与本试验观察到的症状有所不同。嗜水气单胞菌引起不同鱼病的原因在于以下几个方面:(1)目前对于黄颡鱼乃至很多鱼的疾病名称都是根据观察到

的症状进行命名,不同的研究者命名有所不同。笔者认为,目前国内报道的部分腹水症、败血症的病例应属同一种病。(2)不同的嗜水气单胞菌菌株基因组结构有差异。细菌的致病性与其所携带的毒力因子密切相关,感染不同宿主的嗜水气单胞菌所携带的毒力因子有所不同,强毒株与弱毒株之间也存在差异,从而表现出的症状也不同。有学者发现感染鲢、鳊鱼的嗜水气单胞菌能交叉感染^[15,17-19],因此在养殖过程中应该引起重视。药敏试验显示,本试验分离到的 2 株菌都对依诺沙星、头孢曲松、舒巴坦、恩诺沙星敏感,但是对抗生素药敏性不完全一致,类似现象在其他病原菌上也有报道^[6,20]。这可能是由这 2 株菌的毒力基因差异性、养殖环境以及用药习惯等多方面因素造成的。

嗜水气单胞菌属普遍存在于自然环境中,经常从人体、鱼体、两栖类以及人的食物中分离到。气单胞菌属是一种条件性致病菌,存在于黄颡鱼以及其他鱼类肠道与水体中^[11,21-22]。鱼肠道中微生物是一把双刃剑,当宿主利用各种防御机制将细菌的种类和数量控制在一定水平时,肠道微生物与宿主相互作用,但是当这一平衡被打破时,往往能导致宿主疾病暴发。养殖环境恶化以及养殖生物自身免疫系统紊乱时,嗜水气单胞菌大量繁殖,从而导致微生态的不平衡,这是细菌性疾病暴发的根源。徐伯玄等的研究证实气单胞菌大量繁殖与肠机能的紊乱有关,从而导致疾病发生^[23-24]。因而从生产上建议,养殖者应该适当严格做好清塘工作、控制放养密度,保持良好水质,提升黄颡鱼养殖的生态环境。

参考文献:

[1] Wang, Z., Wu Q., et al. Geographic distribution of *pelteobagrus fulvidraco* and *pelteobagrus vachelli* in the Yangtze River based on mitochondrial DNA markers[J]. *Biochem Genet* 42,2004(11/12): 391-400.

[2] 耿毅,汪开毓,范方玲,等. 养殖黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)的分离鉴定与生物学特性研究[J]. *海洋与湖沼*,2010,41(1):61-67.

[3] 周冬仁,叶雪平,罗毅志,等. 黄颡鱼鲈鱼爱德华氏菌的鉴定及生物学特性研究[J]. *水生生物学报*,2010,34(4):862-865.

[4] 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.

[5] 丁正峰,薛晖,边文冀,等. 养殖黄颡鱼腹水症病原研究[J]. *华中农业大学学报*,2008,27(5):639-643.

[6] 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.

[7] 蒋自立,李春涛,张其中,等. 黄颡鱼败血症病原菌的分离鉴定与病理组织学观察[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*,2012,37(6):77-82.

[8] 欧仁建,曹海鹏,郑卫东,等. 黄颡鱼卵致病性绵霉的分离鉴定与药敏特性[J]. *微生物学通报*,2012,39(9):1280-1289.

[9] Turska-Szewczuk T, A, Duda K A, et al. Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen *Aeromonas veronii* strain Bs19, serotype O16[J]. *Marine Drugs*,2014,12(3):1298-1316.

[10] Beaz-Hidalgo B, R, Agueria D, et al. Molecular characterization of shewanella and aeromonas isolates associated with spoilage of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *FEMS Microbiology Letters*,

刘欢,黄明珠,陈晓燕,等. 凡纳滨对虾 P53 亲水肽段原核表达及抗体制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(7):178-180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.07.044

凡纳滨对虾 P53 亲水肽段原核表达及抗体制备

刘欢,黄明珠,陈晓燕,房春娟,姜雯雯,朱芳芳,熊志伟

(江西科技学院护理学院,江西南昌 330098)

摘要:在哺乳动物细胞中,肿瘤抑制基因 P53 是目前研究最为广泛和系统的抑癌基因之一。P53 参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程,在甲壳动物中研究较少。对 LvP53 的蛋白质全序列进行抗原性分析,将编码亲水肽段 DNA 连接到 Pet32a 表达载体上,转化原核表达菌株 BL21,利用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside,简称 IPTG)诱导融合蛋白质表达,经蛋白电泳分析表明,融合蛋白主要以包涵体形式存在。利用 Ni 柱亲和纯化发酵产物,得到较单一的蛋白,以制备多克隆抗体。

关键词:P53;原核表达;纯化;多克隆抗体

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)07-0178-03

凡纳滨对虾(别称南美白对虾)是当今世界水产养殖业产量最高的三大虾类之一。随着养殖规模的扩大,对虾病害已经成为制约该产业发展的重要障碍。凡纳滨对虾为较低等的水生节肢动物,其生理特征表现为对病害的易感性。生长、发育的生命周期较短,各器官和系统形成迅速、构造简单,较高的新陈代谢水平和较低等的器官结构使得凡纳滨对虾对病原体抵抗能力较弱。凡纳滨对虾的鳃直接与水体接触,在进

行呼吸和排泄时,各种外界恶劣的环境条件直接接触鳃结构,因此病原体较易感染或通过鳃部而影响全身。凡纳滨对虾的生命周期中有蜕壳的生理特点,蜕壳前凡纳滨对虾停止进食,蜕壳之后虾体又非常脆弱,在此期间虾体的防御能力减弱,对病原体和敌害的抵抗力极差,因而极易被病原体感染^[1]。随着养殖水域受到严重污染,水质的富营养化,水体的酸碱化,重金属污染等都是目前非常严重的问题^[2],养殖强度的扩大和养殖环境恶化将给对虾病害的控制带来更大的挑战。

机体在对抗病害、重金属、环境等因素胁迫时,会导致负氧离子等活性氧(ROS)的产生^[3-4],高浓度的氧化自由基会导致细胞损伤甚至细胞死亡^[5]。P53 与 DNA 的完整性、细胞周期、呼吸暴发都有密切联系^[6-7]。亚硝酸盐应激诱导对虾血细胞产生了过量的 NO 和 ROS,造成氧化胁迫作用,诱导凋亡 P53 基因的表达^[8]。在重金属和低 pH 值环境的应激下,凡纳滨对虾 P53 基因表达与 LvMnSOD 和 LvGPx 有着密切的

收稿日期:2016-11-19

基金项目:江西科技学院青年基金(编号:ZR15QN06);江西省教育厅科技研究项目(编号:GJJ151148)。

作者简介:刘欢(1985—),女,江西宜春人,硕士,主要从事动物分子免疫学研究。Tel:(0791)88136682;E-mail:373740643@qq.com。

通信作者:黄明珠,硕士,主要从事动物分子免疫学研究。Tel:(0791)88136684;E-mail:huangmingzhu12@163.com。

2015,362(1):1-8.

[11] Hu M, Wang N, Pan Z H, et al. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(3): 224-233.

[12] Hossain M J, Sun D W, McGarey D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States - farmed catfish[J]. mBio, 2014, 5(3): e00814-e00848.

[13] 刘杰,龙宜楠,黄钧,等. 黄颡鱼暴发性流行病原的分离鉴定及其 3 种毒力基因检测[J]. 淡水渔业, 2015(2): 56-61.

[14] 朱成科,向桢,叶华,等. 黄颡鱼致病性维氏气单胞菌的分离鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(5): 37-42.

[15] 夏飞,梁利国,谢骏. 团头鲂病原嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 606-610.

[16] 梁利国,谢骏,叶诗尧. 鲢病原嗜水气单胞菌分离鉴定及检测方法建立[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(5): 374-378.

[17] 王亚冰,梁利国,高金伟,等. 异育银鲫源杀鲑气单胞菌杀鲑亚

种的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2016(7): 1532-1539.

[18] 隗黎丽,吴华东,阮记明. 黄颡鱼鲷爱德华氏菌的分离及鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2014(1): 187-192.

[19] 廖雨婷. 鲷爱德华氏菌感染黄颡鱼的病理形态学及病原分布研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2012.

[20] 黄钧,彭民毅,罗华平,等. 黄颡鱼源温和气单胞菌对氟苯尼考耐药性获得与消失速率研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(3): 1278-1281.

[21] Wu, S, Tian J, et al. Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(5): 2165-2174.

[22] Quinn R A, Stevenson R M. Denaturing gradient gel electrophoresis for nonlethal detection of *Aeromonas salmonicida* in salmonid mucus and its potential for other bacterial fish pathogens[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(5): 563-571.

[23] 徐伯玄,葛蕊芳,熊木林. 二龄草鱼肠炎病发病机理[J]. 水生生物学报, 1988, 12(4): 8.

[24] 周金敏,吴志新,曾令兵,等. 黄颡鱼肠道及养殖水体中菌群的分析[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 613-617.