

· 研究简报 ·

## 患病细鳞鱼杀鲑气单胞菌的分离与鉴定

刘宁<sup>1</sup>, 时晓<sup>3</sup>, 杜迎春<sup>3</sup>, 周杰珑<sup>1</sup>, 刘建宏<sup>2</sup>, 何宏轩<sup>4</sup>

(1. 西南林业大学生命科学学院, 昆明 650224;

2. 西南林业大学林学院, 昆明 650224;

3. 北京市水生野生动植物救护中心, 北京 102100;

4. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

**摘要:** 从患病细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)的病变组织处分离到1株致病菌, 经过分离培养, 生化鉴定, 16S rRNA序列分析和人工感染实验确定该病原菌为杀鲑气单胞菌无色亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*)。采用20种药物进行药敏分析, 结果显示: 分离菌株对阿米卡星、哌拉西林、恩诺沙星等9种抗生素敏感; 对环丙沙星、诺氟沙星等4种抗生素中度敏感; 对卡那霉素、青霉素、氨苄西林等7种抗生素耐药。

**关键词:** 细鳞鱼(*Brachymystax lenok*); 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*); 分离; 鉴定

中图分类号: S943.121

文献标识码: A

文章编号: 1000-6907-(2015)01-0088-05

DOI:10.13721/j.cnki.dsyy.2015.01.016

### Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* from diseased *Brachymystax lenok*

LIU Ning<sup>1</sup>, SHI Xiao<sup>3</sup>, DU Ying-chun<sup>3</sup>, ZHOU Jie-long<sup>1</sup>, LIU Jian-hong<sup>2</sup>, HE Hong-xuan<sup>4</sup>

(1. College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

3. The Aquatic Wildlife Rescue and Conservation Center, Beijing 102100, China;

4. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** The pathogenic strain was isolated from diseased *Brachymystax Lenok*. Diagnosis was based on staining microscopy, biochemical identification, 16SrRNA sequence analysis and animal experiment. The isolated bacteria was identified as *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. The drug sensitivity test of a total of 20 antimicrobial drugs showed that the isolated strain was sensitive to 9 kinds of drugs including amikacin, piperacillin, enrofloxacin, etc., and moderately sensitive to ciprofloxacin, norfloxacin etc. The strain was resistant to 7 kinds of antibiotics including kanamycin, penicillin and ampicillin etc.

**Key words:** *Brachymystax lenok*; *Aeromonas salmonicida*; isolation; identification

细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)又称细鳞鲑, 属鲑形目(*Salmoniformes*) 鲑科(*Salmonidae*) 细鳞鱼属(*Brachymystax*), 该鱼是生活在亚洲东北部的一种冷水鱼, 中国仅1属1种, 是一种名贵的鲑科陆封型冷水鱼<sup>[1]</sup>。我国的细鳞鱼主要分布于西北、东北和华北某些河流中<sup>[2]</sup>。1988年, 细鳞鱼就已被

国务院批准列入《国家重点保护野生动物名录》, 保护级别为二级。为了保护这一名贵的鱼类资源, 我国最早于1953年在哈尔滨水产试验场进行细鳞鱼的人工驯养工作, 目前黑龙江省牡丹江流域、吉林省图们江流域和陕西省秦岭地区均建立了细鳞鱼的规模化养殖。

收稿日期: 2014-04-20; 修订日期: 2014-08-27

资助项目: 北京市农业局科技项目(PXM2014\_036332\_000003\_00130031\_FCG); 云南省优势特色重点学科生物学一级学科资助

第一作者简介: 刘宁(1986-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水生野生动物的驯养繁殖研究。E-mail: annening@163.com

通讯作者: 刘建宏。E-mail: liujh@swfu.edu.cn; 何宏轩。E-mail: hehx@ioz.ac.cn

在细鳞鱼的驯养繁育过程中,各种疫病灾害成为制约其发展的瓶颈问题。目前已经报道的细鳞鱼疾病有三代虫病<sup>[3]</sup>、肠炎病<sup>[4]</sup>、气单胞菌病<sup>[5]</sup>、细菌性烂鳃/鳍病<sup>[6]</sup>、水霉病<sup>[4]</sup>、小瓜虫病<sup>[7]</sup>等。2013年11月,北京市水生野生动植物救护中心驯养的细鳞鱼开始出现背鳍基部出血、局部体表溃烂的临床症状,并伴有部分的死亡。本研究采用细菌学检测方法对发病死亡的细鳞鱼进行了细菌分离、纯化培养等鉴定分析,并根据药敏试验结果进行选择用药后,有效地控制了疫情的蔓延。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验用鱼

发病细鳞鱼取自北京市水生野生动植物救护中心,共36条。

#### 1.1.2 试剂及仪器

普通营养琼脂、麦康凯培养基等按常规方法制备;生化分析使用凤凰细菌鉴定系统(BD Phoenix™ 100, USA);标准药敏试纸购自北京陆桥技术有限责任公司;DNA Marker DL2000购自宝生物工程(大连)有限公司;2×Taq PCR Master Mix和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。

#### 1.1.3 引物

合成细菌16S rRNA V3区的通用引物F341和R518。引物序列:F341:5'-CCTACGGGAGGCAG-CAG-3',R518:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3',送北京华大科技有限公司合成,按照说明将引物稀释至10 μmol/L,-20℃冻存备用。

#### 1.1.4 感染用鱼

健康的细鳞鱼(幼鱼)20尾,体长8~10 cm,体重10~15 g,由北京市水生野生动植物救护中心提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病原菌分离

无菌采取发病细鳞鱼体表溃烂处、背鳍基部、肝脏、脾脏、肾脏等组织分别接种于普通营养琼脂平板、麦康凯琼脂和TSA(胰蛋白胨大豆琼脂)平板上,28℃培养24 h,挑取单个优势菌落再次划线,将获得的纯培养菌株4℃保存备用。

#### 1.2.2 细菌生化分析

将分离菌株的纯培养物进行革兰氏染色镜检,确定是革兰氏阴性菌或阳性菌,然后根据革兰氏染色结果确定使用阳性板(PID)或阴性板(NID)。首

先在Phoenix鉴定肉汤管上标记好样本号,然后用无菌棉拭子(不用聚酯拭子)从纯培养的培养基上挑取菌落形态相同的几个菌落,在Phoenix肉汤管中混悬菌落,盖上试管盖,轻轻地颠倒混匀,避免产生气泡。使用PhoenixSpec比浊仪测试浊度,调至浊度在0.5~0.6为宜。

#### 1.2.3 16S rRNA序列分析

用分离菌株纯培养物为模板,按照如下体系和程序进行16S rRNA序列的克隆分析。PCR:2×Taq PCR Master Mix 25 μL,上下游引物各1 μL,纯化菌液1 μL,无菌水22 μL。扩增程序如下:95℃5 min,95℃30 s,55℃30 s,72℃45 s,30个循环,72℃7 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR纯化产物送往华大科技有限公司进行序列测定,将序列提交NCBI进行BLAST比对分析。

#### 1.2.4 人工感染实验

将20尾细鳞鱼随机分成实验组和对照组,10尾/组。实验组每尾浸泡25℃培养18 h的细菌培养物( $1.5 \times 10^8$  CFU),浸泡时间10 min;对照组浸泡无菌肉汤,浸泡时间为10 min。分别饲养在水温25℃左右的水族箱内,实验期间提供足够氧气,观察鱼的发病死亡情况,并进行死亡细鳞鱼的病变组织涂片镜检和细菌分离培养。

#### 1.2.5 药敏实验

对分离菌株的药物敏感性进行检测,采用涂布法将培养24 h的菌液接种于检测平板上,贴上20种药敏纸片,将检测平板放置28℃培养24 h,测量抑菌圈直径,并根据药敏试验抑菌圈直径判断标准(WS/T125-1999)进行敏感性的判定。

## 2 结果

### 2.1 细菌的分离培养

28℃培养24 h后,在普通营养琼脂上长出圆形光滑、边缘整齐、隆起、不透明、灰白色中等大小的菌落。在麦康凯琼脂上仅划线起始部见微弱生长、薄层的菌苔及无色小菌落。在TSA上菌落圆形光滑、边缘整齐、浅灰白色,未见水溶性褐色色素产生。革兰氏染色可见大量的革兰氏阴性菌,细菌形态呈球杆菌,成双、短链或成丛排列,无鞭毛,无荚膜。

### 2.2 生化特性

生化鉴定结果表明,分离菌在TSA培养基上不产生水溶性褐色色素,可产生吡啶,不产生H<sub>2</sub>S、可分解蔗糖等(见表1)。分离菌的各项生理

生化指标与《伯杰氏细菌学手册》中所列的杀鲑气单胞菌无色亚种基本吻合，仅在丁二醇脱氢酶、甘露醇、阿拉伯糖的利用上存在差异，初步可将分离菌鉴定为杀鲑气单胞菌无色亚种。

表1 分离菌株的生理生化鉴定

Tab.1 The biochemical identification of the isolated strain

伯杰氏标准		分离菌	
项目	结果	项目	结果
37℃(水浴) 营养液中生长	-	37℃生长试验	-
在 TSA 培养基上有褐色色素	-	TSA 培养基产生褐色色素	-
铵离子和葡萄糖为唯一氮源和碳源	-	铵离子和葡萄糖为唯一氮源和碳源	-
L-精氨酸	-	L-精氨酸	-
L-天门冬素	-	L-天冬酰胺	-
L-组氨酸	-	L-组氨酸	-
L-谷氨酸	-	L-谷氨酸	-
L-丝氨酸	-	L-丝氨酸	+
L-丙氨酸	-	L-丙氨酸	-
7.5% NaCl 营养液	-	7.5% NaCl 肉汤中	-
丁二醇脱氢酶	+	丁二醇脱氢酶	-
0.1% 色氨酸的胰液液中产生吲哚	+	吲哚产生	+
由 2.5% 胺水中产生 H <sub>2</sub> S	-	H <sub>2</sub> S	-
V. P. 反应	-	V. P. 反应	-
葡糖酸盐氧化酶测定	-	N-乙酰-葡糖胺	-
分解半乳糖	+	半乳糖醛	-
分解蔗糖	+	蔗糖	+
分解甘露醇	-	D-甘露醇	+
分解阿拉伯糖	-	L-阿拉伯糖	+

注: + 为阳性反应, - 为阴性反应。

### 2.3 16 S rRNA 序列分析

用分离细菌的纯培养物为模板, 进行 PCR 扩增得到 194 bp 的核酸片段(图 1)。将分离菌(11-25-4)的测序序列与 GenBank 中的弧菌科气单胞菌属的嗜冷无动力气单胞菌的序列进行比对, 利用 Mega5 软件构建遗传发育系统进化树(图 2)。结果表明: 分离菌株(11-25-4)与 HQ283362(无色亚种)、AY910844(无色亚种)的亲缘关系较近, 处于同一进化枝上。

### 2.4 人工感染实验结果

实验组 10 尾细鳞鱼发病 6 尾, 发病症状主要为体表溃烂、脓肿。后期病变与死亡细鳞鱼症状极为相似(图 3)。对照组无异常反应, 动物实验显示杀鲑气单胞菌是引起细鳞鱼发病的主要病原菌。

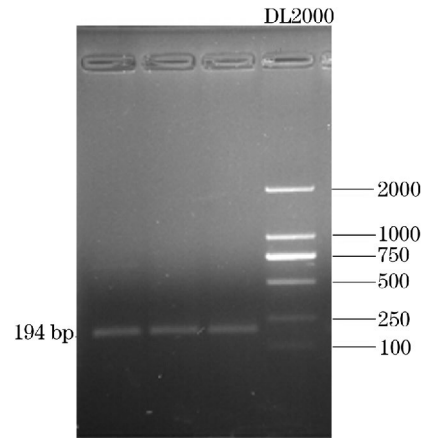


图1 分离菌 16 S rRNA V3 区基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification result of the 16 S rRNA V3 region of isolated strain

### 2.5 药物敏感性

用 20 种常用抗菌药物做敏感性试验, 结果显示分离菌株对阿米卡星、哌拉西林、恩诺沙星等 9 种抗生素敏感。细菌对环丙沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星、新霉素 4 种抗生素中度敏感。菌株对卡那霉素、青霉素、氨苄西林等 7 种药物耐受(表 2)。

表2 分离菌株对药物的敏感性  
Tab.2 Antibiotic sensitivities of the isolated strain

抗菌药物	药物含量 /μg	抑菌圈 /mm	药物敏感性
阿米卡星	30	28	S
哌拉西林	100	17	S
卡那霉素	30	0	R
恩诺沙星	5	31	S
青霉素	10	0	R
头孢噻肟	30	25	S
环丙沙星	5	10	I
氨曲南	30	33	S
诺氟沙星	10	8	I
左氧氟沙星	5	9	I
氟苯尼考	30	17	S
头孢噻吩	30	0	R
庆大霉素	10	23	S
氨苄西林	10	0	R
强力霉素	30	26	S
阿莫西林/克拉维酸	20/10	0	R
新霉素	30	7	I
呋喃妥因	300	0	R
链霉素	10	19	S
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶	23.75/1.25	0	R

注: R - 耐药, I - 中度敏感, S - 敏感。

### 2.6 药物疗效

根据药敏实验结果, 选择阿米卡星拌药治疗, 每 1 kg 饵料加硫酸阿米卡星 0.20 ~ 0.35 g ,

每天投喂 2 次, 连喂 5 ~ 7 d。同时发病鱼池用聚维酮碘泼洒消毒, 有效地控制了疫病的蔓延传播。

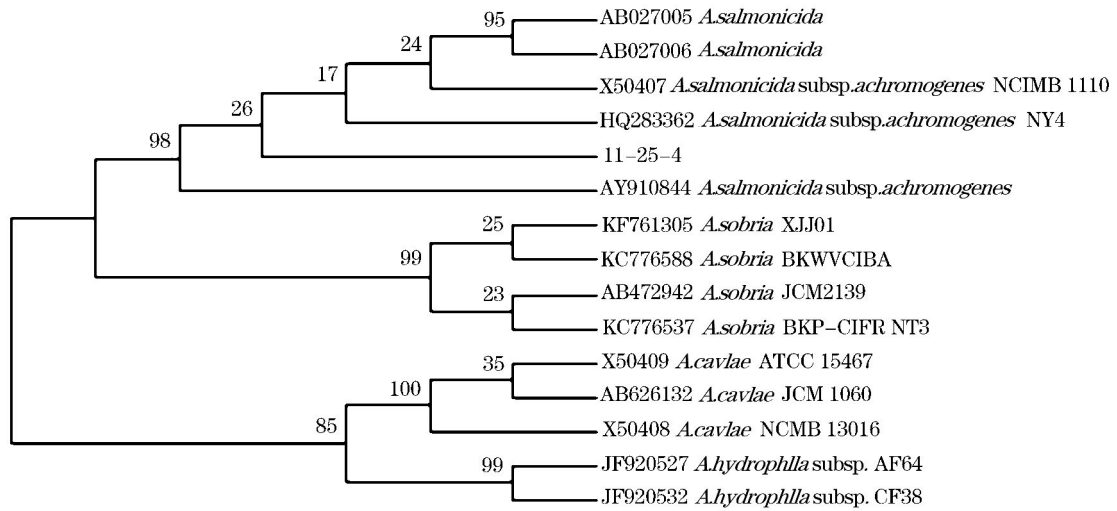


图 2 分离菌株与参考菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on isolated strain and reference strains

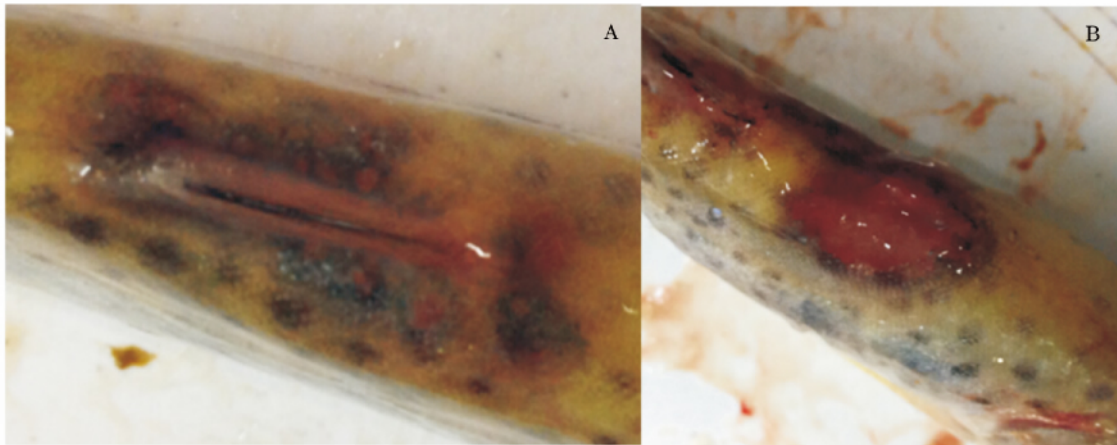


图 3 细鳞鱼的临床症状

Fig. 3 Clinical symptoms of *Brachymystax lenok*

A: 死鱼症状; B: 人工感染症状

## 3 讨论

杀鲑气单胞菌宿主范围很广, 是多种水生动物的原发性病原菌, 每年对鲑鳟鱼类造成十分严重的损失<sup>[8]</sup>。杀鲑气单胞菌是一种条件致病菌, 可经鳃、皮肤、口等途径感染, 主要危害鲑鳟鱼类, 也有引起养殖鱼类皮肤溃疡病的报道<sup>[9-10]</sup>。杀鲑气单胞菌是引起疥疮病和溃疡病的主要病原菌, 国内有该菌引起虹鳟、大西洋鲑、北极红点鲑溃烂病的报道<sup>[8, 10-11]</sup>。在国外杀鲑气单胞菌曾流行于欧洲、美国、加拿大和日本等地, 国外现在已经有一些预

防和治疗该病的措施和药物<sup>[12]</sup>。挪威和英国还开发出了预防这种病原菌感染的灭活疫苗<sup>[13]</sup>。

从发病细鳞鱼体内分离到的杀鲑气单胞菌, 经人工感染试验确定是导致细鳞鱼体表溃烂、死亡的主要致病菌, 发病原因可能与鱼体受伤、水体环境、饲养管理等因素有关。鱼体携带许多环境菌, 在正常情况下不发病, 但是当环境改变时, 鱼体抵抗力下降便会发病。

抗生素类药物在水产疫病的防治中发挥着重要作用, 药敏实验结果显示, 菌株对阿米卡星、哌拉西林、恩诺沙星等药物敏感。据丁雷等<sup>[8]</sup>的研究

报道,环丙沙星、卡那霉素对杀鲑气单胞菌有很好的抑菌作用,但在本研究中,致病菌株对环丙沙星中度敏感、对卡那霉素表现出耐受,出现差异的原因可能与菌株的来源、变异、环境变化有关。根据药敏试验的结果,选择阿米卡星进行治疗,及时控制了疫情的蔓延传播。

#### 参考文献:

- [1] 刘希泰,曹杰英,张予珍,等.野生细鳞鱼池塘驯养及人工繁殖技术研究[J].河北渔业,2000,(5):6-8.
- [2] 王所安.细鳞鱼的研究—细鳞鱼在我国的分布及在河北省分布范围的变化[J].河北渔业,1989,(4):12-14.
- [3] 白桂芝.冷水细鳞鱼患三代虫并发肠炎病的防治[J].中国水产,2002,(6):51.
- [4] 李海波,李壮.细鳞鱼几种常见病的诊断与防治[J].科学养鱼,2013,(3):60.
- [5] 刘洋,徐革锋,陈玉春,等.细鳞鱼气单胞菌的分离、鉴定及药敏试验[J].大连海洋大学学报,2011,26(3):277-280.
- [6] 徐革锋,张澜澜,张蕾,等.人工养殖细鳞鱼常见疾病及其防治[J].黑龙江水产,2009,(3):18-21.
- [7] 刘霞,崔存河,吕延玲.细鳞幼鱼小瓜虫病的防治[J].科学养鱼,2011,(2):56.
- [8] 丁雷,岳永生,宋憬愚.虹鳟皮肤溃烂病的病原研究[J].淡水渔业,2002,32(3):28-30.
- [9] 陈翠珍,房海,张晓君,等.石鲈细菌性败血感染症及其病原细菌研究[J].水生生物学报,2006,30(5):515-523.
- [10] 史秀杰,刘荭,高隆英,等.患病北极红点鲑的病原分离与鉴定[J].华中农业大学学报,2007,26(2):223-227.
- [11] 曹成易,汪开毓,王玲,等.大西洋鲑杀鲑气单胞菌的分离鉴定[J].淡水渔业,2009,39(1):54-57.
- [12] 刘艳辉,孙晓雨,张雅斌,等.美洲红点鲑溃烂病的病原菌研究[J].淡水渔业,2010,40(4):62-65.
- [13] Noonan B, Trust T J. The molecular biology of *Aeromonas salmonicida* [J]. Annu Rev Fish Dis, 1995, 5: 95-111.

(责任编辑:张潇岨)