

DOI:10.14184/j.cnki.issn1004-843x.2018.02.036

鱼源维氏气单胞菌的分离鉴定和药敏研究

宋彦仪¹ 何宏轩² 杜迎春³

(1.北京市第一七一中学,北京 100000; 2.中国科学院动物研究所,北京 100000; 3.北京市水生野生动植物救护中心,北京 100000)

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)隶属于弧菌科、气单胞菌属,具有高致死率,广泛存在于自然界水域、土壤和水生动物体中,是一种新型的人一畜一鱼共患病病原菌。该菌可引起鲤、鲫、鳊、罗非鱼、鲟鱼和河蟹等多种水生动物发病,患病鱼多表现为出血和腹水;也有狐狸带菌的报道,还可感染人,引起腹泻、脑膜炎和败血症等。

近几年,维氏气单胞菌在我国呈现零星散发,尚未出现大范围流行。由于维氏气单胞菌对人和多种水产动物具有较强感染性和致病力,故该菌对水产养殖业和人类健康具有一定危害性,需要警惕其暴发和蔓延。

本研究通过对病死鲫鱼的诊断,从病死鲫鱼肝脏中分离细菌,进行染色镜检、生理生化分析和16S rDNA基因序列比对,并比较维氏气单胞菌的系统发育,采用K-B法研究了该菌株对23种抗生素的敏感性,根据结果筛选药物进行治疗,短时间内有效地控制了该疫情,为进一步研究鱼源维氏气单胞菌奠定了基础,也为水产品检疫、鱼病诊断等方面提供了参考依据。

一、材料与方法

1. 材料

(1) 试验动物。患病的鲫鱼采自河北省某养殖场。

(2) 主要试剂。营养琼脂培养基、生化鉴定试剂和药敏纸片均购自北京赛为思生物技术开发中心;细菌DNA提取试剂盒(DP302)、2×Pfu PCR MasterMix(KP201)购自天根生化科技(北京)有限公司,pEASY®-T1 Cloning Vector CT101-01及Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell购自北京全式金生物公司。

2. 方法

(1) 细菌的分离。将患病的鲫鱼在超净工作台内采集肝脏,划线接种于营养琼脂培养基上,28℃细菌培养箱内培养20小时,观察形成菌落的形态、颜色和大小等。将分离菌进行革兰氏染色,在显微镜下进行观察。

(2) 生理生化鉴定。将菌株分别在无菌条件下穿刺接种于细菌生化鉴定管中,根据细菌鉴定手册对该菌株进行系统的理化特性测定。

(3) 16S rDNA基因的扩增和序列分析。采用16S rDNA通用引物,引物序列为:上游16SF: 5'-CTAAGCCAGGATCAAACCTCT-3';下游16SR: 5'-AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3'。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取分离菌的DNA作为模板,按常规PCR方法进行扩增,阴性对照以水为模板,其他条件同上。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带大小,将阳性的目的片段连入pEASY®-T1 Cloning Vector,转化Trans1-T1 Competent Cell,挑选阳性克隆,提取质粒,送华大基因公司测序,序列比对,构建系统进化树。

(4) 药敏试验。采用K-B法对分离菌株的药物敏感性进行检测。将培养20小时的该菌菌液涂布在检测平板上,平板于室温中放置4分钟等待干燥,在合适区域贴上药敏纸片,室温放置10分钟后,倒置于28℃细菌培养箱内培养18小时,在黑色无反光的背景下测量包括纸片直径在内的抑菌圈直径,判定该菌的药物敏感性。

二、结果

1. 临床症状

病死的鲫鱼鳞片脱落,身体表面存在多处充血、出血,肛门红肿。

2. 细菌形态

营养琼脂培养基上的菌落为白色、圆形、光滑、不透明、表面湿润的小菌落,革兰氏染色均呈阴性,短杆形,细菌单个或成对分布,无芽孢。

3. 细菌理化特性

由分离菌的生化鉴定结果可知,该菌株37℃可以生长,生化特性见表1。参照细菌系统鉴定手册,可初步判断该菌为维氏气单胞菌。

4. 16S rDNA的扩增结果及序列分析

以分离细菌的DNA为模板,用16S rDNA通用引物进行PCR扩增得到约1500 bp的核酸片段,阴性对照无条带。将构建的阳性质粒的测序,用Gen-

表1 分离菌的生化鉴定结果

项目	结果	项目	结果
37℃生长	+	赖氨酸	+
产硫化氢	-	鸟氨酸	+
葡萄糖产气	+	葡萄糖酸盐	-
棉籽糖	-	枸橼酸盐	-
木糖	-	侧金盏花醇	-
麦芽糖	+	肌醇	-
果糖	+	蛋白酶	+
甲基红	+	淀粉酶	+
氧化酶	+	山梨醇	-
蛋白质胨水	-	苯丙氨酸脱氨酶	+
尿素	-	β-半乳糖苷酶	+
吡啶	+	乳糖	+

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

Bank中的BLAST工具进行序列比对，结果表明该序列和维氏气单胞菌的相似性最高，前20位均为维氏气单胞菌，相似性均在99%以上，表明该菌株为维氏气单胞菌。然后下载常见水生动物致病菌16S rDNA序列，构建系统进化树，结果表明，该分离菌和 *Aeromonas veronii* (GenBank 登录号：KC776586.1)、*Aeromonas veronii* (GenBank 登录号：KU641116.1)、*Aeromonas veronii* (GenBank 登录号：NR_118947.1)、*Aeromonas veronii* bv. *veronii* (GenBank 登录号：X60414.2) 处于同一小分支，其中和 *Aeromonas veronii* (GenBank 登录号：KU641116.1) 相似度最高为99.8%。

5. 药敏试验结果

药敏试验表明该分离菌株对抗生素呋喃妥因、氯霉素(水产禁用药)、哌拉西林、头孢他啶敏感，见表2。

6. 用药结果

根据上述药敏实验结果，选择头孢他啶拌料治疗，同时在池水中加入抗菌中草药，对发病的鱼池采用聚维酮碘消毒，短时间内有效地控制了该疫情。

三、讨论

本研究从病死的鲫鱼肝脏中分离到致病菌，根据临床病变、细菌形态和理化特性，初步判断该菌为维氏气单胞菌，16S rDNA 测序结果表明，该菌株和维氏气单胞菌 *Aeromonas veronii* (登录号：KU641116.1) 相似度最高，为99.8%，构建系统进化树也显示该菌株与其他维氏气单胞菌聚为一类，综合培养特性、形态观察、理化特征及16S rDNA 序列分析结果，从而判定分离菌株为维氏气单胞菌。多种方法相互补充、相互印证，从而保证了细菌鉴定的准确性。

表2 分离菌株的药物敏感性

抗菌药物	每片药量(微克)	抑菌圈(毫米)	药物敏感性
头孢唑林	30	19	I
多黏菌素B	300	13	R
环丙沙星	5	17	I
利福平	5	11	R
氧氟沙星	5	15	I
庆大霉素	10	15	I
呋喃妥因	300	21	S
新霉素	30	13	R
阿米卡星	30	17	I
链霉素	10	15	I
四环素	30	10	R
氯霉素	30	28	S
诺氟沙星	10	15	I
氨苄西林	10	0	R
哌拉西林	100	24	S
头孢他啶	30	23	S
阿莫西林	10	0	R
左氧氟沙星	5	18	I
万古霉素	30	8	R
妥布霉素	10	14	R
磺胺甲噁唑	300	0	R
红霉素	15	16	I
卡那霉素	30	18	I

注：R-耐药；I-中度敏感；S-敏感。

抗生素类药物在水产养殖和疾病防治中发挥着重要作用。但由于抗生素的广泛使用，药物残留及细菌耐药现象日益严重，现已成为了一个世界关注的公共卫生问题。因此动物养殖过程中抗生素的选择和使用需要有科学性，长期不合理地使用一种药可诱导病原菌产生耐药性，药物会失去作用，动物体内也会有大量残留，因此在选择药物前需要做好药敏试验，合理慎重用药。

本研究药敏结果显示两菌株对呋喃妥因(水产禁用药)、氯霉素(水产禁用药)、哌拉西林、头孢他啶敏感，和之前研究也基本相符，选择头孢他啶治疗，短时间内有效地控制了该疫情。本研究可为进一步研究维氏气单胞菌的诊断和防治提供基础，也佐证了药敏试验结果，本试验为维氏气单胞菌感染的临床用药提供了参考，而且对鱼类疾病防治、公共卫生等研究具有重要意义。

