

文章编号: 1004 - 7271(2008)03 - 0285 - 06

金鱼温和气单胞菌的分离鉴定及药敏试验

胡琳琳^{1,2}, 房文红², 梁思成^{1,2}, 汪开毓¹, 何利军²

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 雅安 625014;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 2006 年 7 月从上海奉贤某一养殖基地的发病金鱼中分离出一株细菌, 对它的形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列进行了研究。结果表明, 该菌为革兰氏阴性杆菌, 具极生单鞭毛, 发酵葡萄糖产酸不产气, 氧化酶、接触酶阳性, VP 阳性, 生长无需 NaCl, 在 TCBS 平板上生长缓慢, 对 O/129 弧菌抑制剂不敏感。结合 16S rRNA 基因序列分析结果, 该菌与温和气单胞菌的亲缘关系最近, 因此将该菌鉴定为温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)。同时, 用 20 种药物对该菌进行了药物纸片扩散法抑菌试验, 其中, 庆大霉素、氟派酸、氯霉素、妥布霉素、卡拉霉素、壮观霉素、菌必治的抑菌效果最佳。

关键词: 温和气单胞菌; 金鱼; 16S rRNA 基因; 药敏试验

中图分类号: S 942 文献标识码: A

Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas sobria* from goldfish

HU Lin-lin^{1,2}, FANG Wen-hong², LIANG Si-cheng^{1,2}, WANG Kai-yu¹, HE Li-jun²

(1. Animal Medical College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China)

Abstract: A pathogenic bacterium (3-1-3) was isolated from the diseased goldfish. Its morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis were studied. The isolated strain is gram-negative, with polar single-flagella, glucose fermented without gas production, oxidase-positive, catalase-positive, unrequired sodium ions for growth, no pigment, non-luminescence; It grew slowly on TCBS-plate and insensitive to the vibriostatic agent O/129. The sequence analysis of 16S rRNA gene of 3-1-3 isolation and comparison with that of other related aeromonas showed that 3-1-3 was very close to *Aeromonas sobria*. According to morphological, physiological, biochemical characteristics and phylogenetic analysis, the isolated strain(3-1-3) is identified as *A. sobria*. The testing results by paper extension methods for drug sensitive show that, among 20 antibiotics, gentamicin, norfloxacin, chloromycotin, tobramycin, kalamycin, spectinomycin and ceftriaxone have the most inhibitive effect on the strain.

Key words: *Aeromonas sobria*; goldfish; 16S rRNA gene; drug test

收稿日期: 2007-08-16

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(中国水产科学研究院东海水产研究所 2007M06)

作者简介: 胡琳琳(1984-), 女, 江西婺源人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物病害学。E-mail: linlinshanshan2@yahoo.com.cn

通讯作者: 汪开毓, Tel: 0835-2885910, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*), 又称威隆气单胞菌温和生物型(*A. veronii* bv. *sobria*), 是危害我国淡水养殖业的重要病原菌之一, 能引起鱼类、爬行类、两栖类等冷血动物的出血性败血症^[1]。同时, 该菌也是重要的人畜共患病的病原菌, 能引发腹泻、伤口感染和败血症等症状。上海奉贤某一养殖基地的观赏金鱼陆续发病, 病鱼表现为行动迟缓, 腹部膨大, 鱼鳍基部充血, 尤其下腹部明显, 肛门红肿。剖检可见肠系膜充血, 腹腔内有大量血性腹水, 肝肿大、充血, 肠水肿, 内有黄色黏液样物质。本研究从发病金鱼体内分离到一株致病性病原菌, 采用测定生理生化特征以及 16S rRNA 序列分析构建系统发育树等方法, 对该菌进行了分类鉴定。同时采用纸片扩散法进行药敏试验, 以进一步探讨该菌引发疾病的药物防治方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源和分离方法

发病金鱼(*Tancho kohaku*)采自奉贤某一养殖基地, 体重 15 ~ 25 g, 健康金鱼购自上海市杨浦区本溪路花鸟市场, 体重 20 g 左右。

在无菌操作下取濒死病鱼鳃、腹水划线接种于普通营养琼脂平板、羊血营养琼脂平板置于 28 °C 培养 24 h, 挑取单个优势菌落在营养琼脂平板上再次划线, 获得纯培养的菌株 3-1-3, 转接营养琼脂斜面于 4 °C 保存备用。

1.1.2 主要试剂

普通营养琼脂平板和 TCBS 平板按常规方法自制; 羊血营养琼脂平板、细菌生化微量鉴定管及抗生素药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司, 批号分别为 20060715, 20060905, 20060928; PCR 扩增试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 批号: 2491560179。

1.2 细菌形态观察和生理生化测定

将菌株 3-1-3 接种普通营养琼脂平板、羊血平板和 TCBS 平板, 28 °C 培养 24 h 后观察菌落的大小、形态, 同时革兰氏染色光学显微镜和磷钨酸染色电子显微镜观察细菌形态特征; 各项生理生化指标的测定参照文献[2]的方法。

1.3 人工感染试验

将上述分离到的菌株接种于营养琼脂斜面上, 28 °C 培养 16 ~ 18 h, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 制成菌悬液。用血球计数法测得菌液的浓度为 1.2×10^8 CFU/mL, 腹腔注射健康试验鱼, 每试验组的鱼各 10 尾, 注射剂量为每尾 0.1 mL, 对照组鱼同时注射无菌生理盐水, 注射剂量同试验组。各组试验鱼分置于不同水族箱中, 在 26 ~ 28 °C 下饲养。接种后观察鱼的发病死亡情况, 并对死亡鱼及时剖检和致病菌的再次分离和鉴定。

1.4 药敏试验

采用纸片扩散法, 在无菌操作下, 将药敏纸片分别置于接种了菌株 3-1-3 的营养琼脂平板上, 每种药 2 个重复, 28 °C 培养 16 ~ 18 h, 根据药敏试验判断标准书, 确定病原菌对不同药物的敏感程度。

1.5 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

1.5.1 PCR 模板 DNA 制备

按照文献[3]所示方法提取细菌 DNA。

1.5.2 16S rRNA 序列扩增与测序

扩增 16S rRNA 基因所用引物(通用引物)由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 其上、下游引物序列分别为: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 5'-TACGGTTACCTTGTTACCGACTT-3'。PCR 反应体系(50 μ L): 1 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 2 mmol/L d NTPs 4 μ L, 5 U/L 的 *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L, 0.1 mmol/L

的引物各 1 μL ,模板 DNA 1 μL ,dd H₂O 37 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,36 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 5 μL 反应液在含 0.5 $\mu\text{g/L}$ EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察结果。PCR 扩增产物交由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。

1.5.3 序列分析及系统发育树的构建

将菌株 3-1-3 的 16S rRNA 基因序列与从 GenBank 中已知核酸序列进行 Blast 分析,调出与该序列相关性较高的核酸序列,在 cluster X 完成序列比对,之后使用 Modeltest 软件得到序列替代模型 TrN + I + G,模型参数为:不变位点比例 I=0.692 8,形状参数 G=0.599 0,碱基频率为 A=0.241 1、C=0.228 9、G=0.330 5,并构建系统发育树。

2 结果

2.1 人工感染试验

将分离到的菌株 3-1-3 接种健康金鱼,感染后 6 h 试验鱼表现为游动迟缓,腹部膨大,鳍基充血,呼吸缓慢,接种后 12 h 内死亡率为 90%,对照组未见异常。剖解发现腮上有白色坏死灶,泄殖腔红肿、充血,腹腔内有血性腹水,肝脏充血,肠道水肿无内容物,充满了黄色黏液样物质,发病症状同自然感染金鱼基本相似。从感染死亡鱼肝、鳃和腹水中分离到与 3-1-3 形态与生理生化一致的细菌,表明 3-1-3 是金鱼发病的病原菌。

2.2 形态特征

菌株 3-1-3 为革兰氏阴性杆菌,菌体呈短杆状,长 0.5~1.0 μm ,两端钝圆,极生单鞭毛,无荚膜,无芽孢;在普通营养琼脂平板上于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,菌落呈圆形,边缘整齐,表面光滑、湿润,无水溶性色素;在 TCBS 平板上生长缓慢,菌落小;在羊血平板上呈 β 型溶血。

2.3 生理生化特征

菌株 3-1-3 为发酵葡萄糖产酸不产气,具有运动性的 G-杆菌,无色素,不发光。其主要生理生化特征见表 1。



图 1 菌株 3-1-3 的电镜照片(14 000 \times)

Fig.1 Electron micrograph of strain 3-1-3(14 000 \times)

表 1 菌株 3-1-3 的生理生化特征

Tab.1 Biochemical and physiological characteristics of strain 3-1-3

项目	菌株 3-1-3	<i>A. sobria</i> **	项目	菌株 3-1-3	<i>A. sobria</i> **
氧化酶	+	+	KCN	-	-
触酶	+	+	赖氨酸脱羧酶	+	+
吲哚	+	+	鸟氨酸脱羧酶	-	-
V-P	+	d	苯丙氨酸脱氨酶	-	-
葡萄糖产气	-	-	精氨酸双水解酶	+	+
葡萄糖产酸	+	+	果糖	+	+
阿拉伯糖	-	-	水解脲素	-	-
甘露醇	+	d	乳糖	-	-
蔗糖	+	+	D-半乳糖	+	+
七叶灵	-	-	麦芽糖	+	+
水杨苷	-	-	硝酸盐还原	+	+
纤维二糖	-	d	D-山梨醇	-	d
枸橼酸盐	-	-	明胶液化	+	+
肌醇	-	-	脂酶	+	-
H ₂ S 产生	-	-	1% NaCl	+	+
0% NaCl	+	+	对 O/129 敏感	-	-

注: +. 阳性; -. 阴性; d. 种间不同反应; ** 引自参考文献[2]

2.4 药敏试验结果

用 20 种药物对菌株 3-1-3 进行药物抑菌试验,测量抑菌圈直径,计算平均值。将其对照“上海卫生防疫站中国腹泻病控制上海试验研究中心”的药敏试验判断标准书,得到该菌株药敏试验结果见表 2。

表 2 菌株 3-1-3 药敏试验结果
Tab.2 Drug sensitive test of strain 3-1-3

药物	抑菌圈直径(mm)	敏感性	药物	抑菌圈直径(mm)	敏感性
庆大霉素	23	S	洛美沙星	15	M
卡拉霉素	24	S	氧氟沙星	14	M
妥布霉素	23	S	环丙沙星	18	M
壮观霉素	26	S	青霉素	0	R
氟派酸	27	S	四环素	8	R
氯霉素	22	S	利福平	2	R
菌必治	23	S	复方新诺明	0	R
链霉素	12	M	杆菌肽	5	R
新霉素	15	M	万古霉素	6	R
红霉素	19	M	乙酰螺旋霉素	12	R

注: R - 耐药; M - 中间; S - 敏感

2.5 16S rRNA 基因序列和系统发育学分析

PCR 扩增出菌株 3-1-3(表中为 E10)的 16S rRNA 片段长度约为 1 500 bp,测序结果表明该片段有 1 338 bp,在 GenBank 中的登陆序号为 EU069415。3-1-3 与一气单胞菌属未命名物种 EF433549-*Aeromonas* sp 及 AY987762-*A. veronii* bv. *sobria* 共享单倍型(序列相同),而且在系统发育分析中,3-1-3 嵌套于以 *A. veronii* bv. *sobria* 为主形成的分支,该分支所包含的 DQ837028-*A. jandaei*,极可能是序列提交中物种识别的错误,因此可以推测我们本次扩增得到的病原菌最可能是温和气单胞菌(*A. veronii* bv. *sobria*)。

3 讨论

本研究从发病金鱼体内分离到一株 G-杆菌 3-1-3,通过人工接种试验证实为该病的病原菌。根据该菌的形态学特征和生理生化特征初步鉴定为温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)。结合该菌 16S rRNA 基因序列在系统发育树中的位置并与 GenBank 数据库中温和气单胞菌的 16S rRNA 基因序列比较,两者具最高的同源性(100%),从而在分子生物水平进一步鉴定该菌为温和气单胞菌。

温和气单胞菌广泛存在于淡水、土壤、污水和水生动物中,能引发罗非鱼、团头鲂、斑点叉尾鲷的出血性败血症、日本鳗鲡败血腹水病、异育银鲫溶血性腹水病^[4-8]。刘敏等^[9]报道了温和气单胞菌引起鲤体表大面积的溃烂。叶雪平等^[10]报道了由温和气单胞菌引起的牛蛙体表出现点状溃疡斑等症状。该菌在鳖类中能引起不同的病变,王永坤等^[11]报道了温和气单胞菌引起的鳖红底板病、红脖子病。陈晓风等^[12]报道了鳖肝水肿病。孙佩芳等^[13]报道了鳖腐皮病。此外,该菌亦可感染其他动物。刘金鹏等^[14]报道了黑天鹅感染温和气单胞菌发生急性败血症。潘秀文等^[15]从死亡野鸭中分离到温和气单胞菌,毒力试验显示该菌对小白鼠毒力很强。从观赏金鱼体内分离到该致病菌尚属首次。

近年来,由该菌引起人类胃肠感染和肠道外感染的大量报道使得温和气单胞菌成为人类重要的病原菌之一。除能引起感染性腹泻外,还可引起各种免疫力低下人群的肠道外感染,如创伤感染、胆管炎、肺炎、脑膜炎、脓毒性关节炎和败血症等^[16]。从腹泻病人肠道、术后感染及伤口中均有分离出该菌的报道^[17-19]。Yukio 等^[20]报道一例由温和气单胞菌感染引发的人类致死事件,该菌导致患者体内各处血管内产生大量气体。温和气单胞菌对人的致病机理研究国外有一些相关报道,主要是集中在腹泻方面。该菌的主要致病因子是一种称为温和气单胞菌溶血素(*A. sobria* hemolysin, ASH)的毒素。DNA 序列分

析(GenBank 登陆序号 AY157998)显示 ASH 与另一种气单胞菌溶素(嗜水气单胞菌溶血素)同源。这两种毒素在氨基酸水平上有 68.5% 的相似度^[21]。这类毒素对细胞的主要效应是形成孔洞,使质膜对小离子如 K^+ , Cl^- 和 Ca^{2+} 的通透性增加,并引发一系列的细胞反应^[22]。ASH 的主要靶细胞最有可能是肠道上皮细胞,但是关于溶血素和上皮细胞相互作用的报道却很少。Takahashi^[23] 等报道 ASH 能活化肠上皮细胞的 Ca^{2+} 依赖 Cl^- 分泌途径,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,并打开 Ca^{2+} 依赖 Cl^- 通道使 Cl^- 分泌增加,引发腹泻。同时, Tanoue 等^[24] 亦报道了 ASH 在温和气单胞菌引发的腹泻中与肠上皮细胞 cAMP 依赖 Cl^- 分泌途径有关。目前该菌已引起人类医学的高度重视。

图 2 反映了目前气单胞菌属内主要气单胞菌种类系统发育关系,各种类均未形成单系分支,造成这一模式的原因有以下几点:(1)暗示了气单胞菌分类还存在一定混乱,存在同物异名或者序列提交中错误划分种类现象;(2)第二种可能是单胞菌各种存在祖先多态性,在 16S rRNA 片段各个物种之间还存在共享谱系;(3)16S rRNA 片段在 mtDNA 基因中偏保守,导致该标记进化速率过慢,种间差异未得到体现(除 *A. sharmana* 与其它种类差异超过 5% 外,其余种类差异不到 3%),因此气单胞菌物种的鉴定,可以进一步通过扩增其它进化速率更快的基因片段,提供更多系统发育信息来完成。

参考文献:

- [1] Janda J M, Abbott S L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions[J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(2): 332 - 344.
- [2] 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: 106 - 119.
- [3] 奥斯伯. F, 布伦特. R, 金斯顿. R. E. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 39 - 40.
- [4] 蔡完其, 孙佩芳. 罗非鱼温和气单胞菌病的病原研究和药敏试验[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 243 - 246.
- [5] 苏应兵, 邹桂伟, 袁科平. 斑点叉尾鮰爆发性败血症病原的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 37 - 41.
- [6] 张满隆, 冯丽芝. 武昌鱼败血症及其防治[J]. 齐鲁渔业, 2003, 20(4): 35 - 36.
- [7] 孙其焕, 孙佩芳, 金丽华. 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究[J]. 水产学报, 1991, 15(2): 130 - 139.
- [8] 董传蕾, 林天龙, 陈日升. 日本鳊鲷败血症病原研究[J]. 水产科学, 2002, 21(1): 5 - 9.
- [9] 刘敏, 韩英. 鲤鱼温和气单胞菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 486 - 489.
- [10] 叶雪平, 顾金华, 杨广智. 牛蛙温和气单胞菌病原及防治[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(1): 78 - 80.
- [11] 王永坤, 李智健, 朱国强. 甲鱼爆发性传染病的病原研究[J]. 鱼类病害研究, 1997, 19(1 - 2): 18 - 24.
- [12] 陈晓风, 周常义. 稚鳖“肝水腫症”病原及防治研究[J]. 鱼类病害研究, 1997, 19(1 - 2): 40 - 46.
- [13] 孙佩芳, 蔡完其. 中华鳖温和气单胞菌病的病原研究[J]. 淡水渔业, 1998, 2(4): 3 - 5.
- [14] 刘金鹏, 陈永林, 胥哲. 黑天鹅温和气单胞菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(5): 56 - 57.
- [15] 潘秀文, 桂剑峰, 张琼. 野鸭温和气单胞菌及产假单胞菌的分离与鉴定[J]. 中国家禽, 2001, 23(11): 11 - 12.
- [16] Robert M T M, Enoch D A, Harris K A. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55: 241 - 243.
- [17] 廖远全, 王后伟, 章新智. 温和气单胞菌致医院感染 1 例[J]. 中国检验医学与临床, 2002, 3(2): 92.
- [18] 崔文丽, 霍卫池. 温和气单胞菌引起的痢疾样腹泻 1 例[J]. 中华当代医学, 2005, 3(2): 87.
- [19] 赵建强. 从眼角膜溃疡分泌物中分离出温和气单胞菌 1 例[J]. 潍坊医学院学报, 2006, 28(6): 448.
- [20] Yukio S, Kunio I, Masaaki I. An *Aeromonas veronii* biovar *sobria* infection with disseminated intravascular gas production[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2003, 10(1): 37 - 41.
- [21] Gabriel S E, Brigman K N, Koller B H, et al. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model[J]. Science, 1994, 266: 107 - 9.
- [22] Abrami L, Fivaz M, van der Goot F G. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface[J]. Trends Microbiol, 2000, 8: 168 - 72.
- [23] Takahashi A, Tanoue N, Nakano M, et al. A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates Ca^{2+} dependent Cl^- secretion[J]. Microbial Pathogenesis, 2005, 38: 173 - 180.
- [24] Tanoue N, Takahashi A, Okamoto K, et al. A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates cAMP-dependent Cl^- secretory pathways to cause diarrhea[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 242(2): 195 - 201.

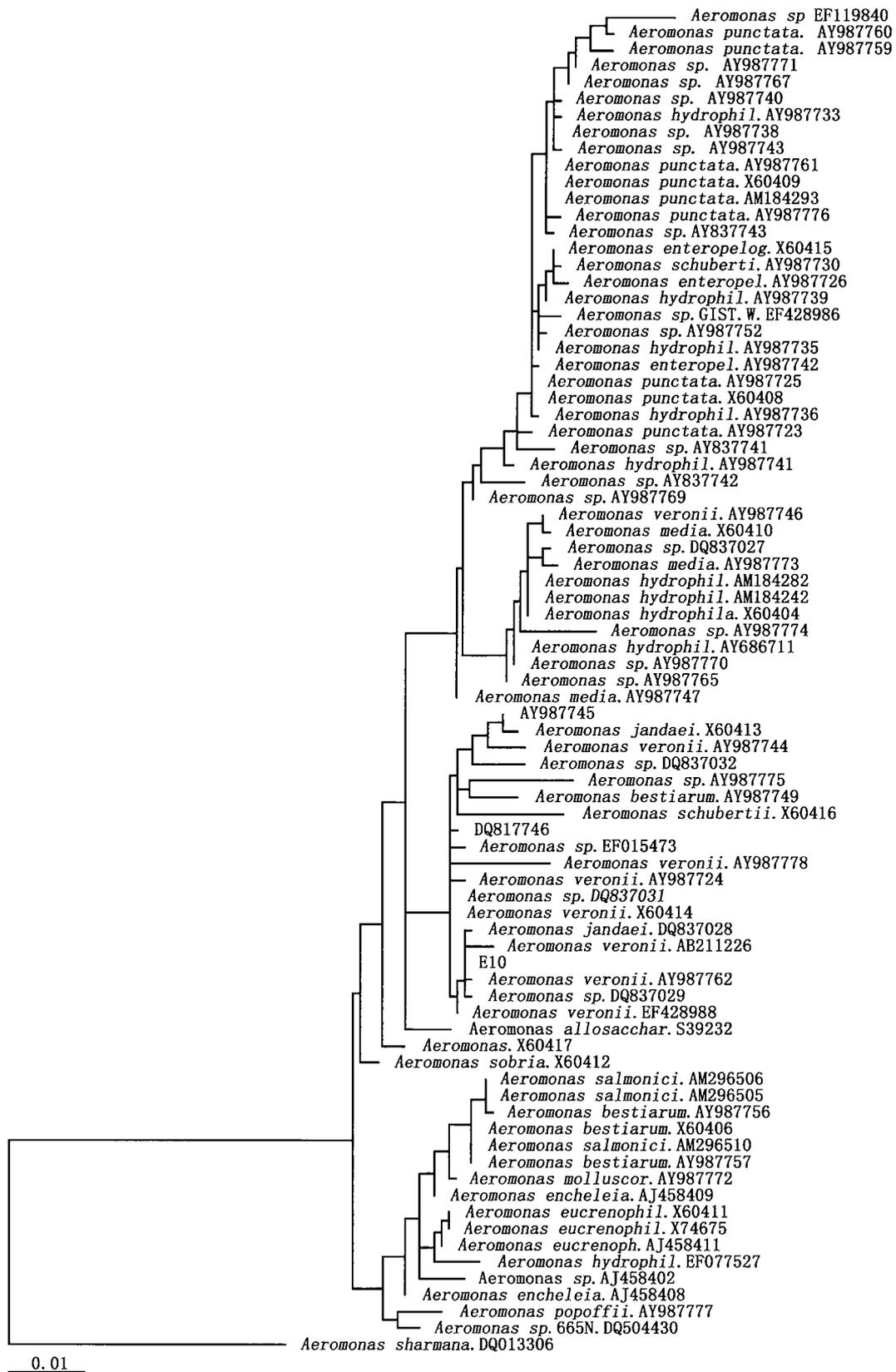


图2 气单胞菌属各种间 16S rRNA 序列似然 ML 树,模型:TrN + I + G
 Fig. 2 ML tree based on 16S rRNA sequence of *Aeromonas*, model: TrN + I + G