

青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定*

张波¹ 曾令兵^{1,2,*} 罗晓松² 徐进² 肖艺¹ 周勇¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000

摘要 从患典型肠道出血症的青鱼肝脏中分离到1株致病菌BCB01, 人工腹腔注射感染试验可复制出与自然发病相似的症状。单克隆菌落的Biolog系统鉴定结果表明, 菌株BCB01为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。进一步的16S rRNA基因测序与系统进化树分析结果表明, 菌株BCB01与嗜水气单胞菌(EF645799)的亲缘关系最近, 其相似性为99%。药物敏感性试验结果显示, 该菌株对大多数试验药物敏感, 其中对复达欣、头孢西丁、先锋必等11种药物高度敏感。

关键词 青鱼; 肠道出血症; 嗜水气单胞菌; 分离鉴定; 药物敏感性试验

中图分类号 S 941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0607-06

青鱼(*Mylopharyngodon piceus*), 属于鲤科鱼类, 主要分布于我国长江以南的平原地区, 为我国淡水养殖的“四大家鱼”之一^[1]。近年来, 青鱼养殖业发展十分迅速, 由于高密度养殖、天然饲料缺乏以及水环境恶化等原因, 青鱼的病害问题不断发生, 造成重大经济损失, 严重制约了青鱼养殖业的健康发展。早在20世纪50年代, 王德铭曾对青鱼出血病作过研究, 认为青鱼出血病主要是由细菌引起的^[2]。已报道的青鱼病原菌主要有嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata* f. *intestinalis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等^[3-4]。

2009年7月, 湖北省荆州市某青鱼养殖示范区爆发严重的肠道出血症。笔者从病症典型濒死鱼体的肝脏中分离到1株优势细菌, 对健康青鱼进行人工腹腔注射感染试验, 确定其具有致病性。在Biolog系统鉴定的基础上, 结合16S rRNA基因序列分析比对以及进化树分析结构, 确定了该致病菌的种类和分类地位, 旨在为青鱼肠道出血症的发病机理、流行规律、药物与免疫预防技术等研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料和仪器

1) 试验鱼。患典型肠道出血病的青鱼取自湖北

省荆州市某青鱼养殖示范区域。健康青鱼取自长江水产研究所窑湾试验基地, 平均质量20 g, 平均体长10 cm, 在实验室于充氧、水温20~22℃的水族箱内饲养1周后进行试验。

2) 主要试剂和仪器。细菌分离用LB培养基的酵母提取物、胰蛋白胨、PBS、琼脂糖、Tris碱等试剂购自Sigma公司。药敏试剂盒为杭州天和微生物试剂有限公司的新药敏试纸。PCR扩增试剂盒用Promaga公司PCR Core System II。PCR产物纯化采用OMEGA公司Gel Extraction Kit。全自动细菌鉴定仪(美国Biolog Omilog GEN III); PCR仪(美国Biometra); II级生物安全柜(新加坡ESCO); 离心机(德国3K-15)。

1.2 方 法

1) 病原菌的分离。取病症典型的濒死鱼, 无菌条件下从肝脏分离细菌, 划线接种于LB固体培养基平板上, 32℃培养24 h, 挑取形态一致的优势菌落进行纯化培养, 获得1株纯培养菌(编号为BCB01), 菌液于50%甘油, -80℃保存备用。

2) 人工感染试验。纯培养菌株BCB01于32℃培养24 h后, 用PBS洗脱得菌悬液, 根据McFarland比浊法与LB固体涂板计数法的结果, 分别制备3个浓度梯度菌悬液: 8×10^8 、 8×10^7 和 8×10^6 cfu/mL。健康试验鱼于室内暂养1周后随机分组,

收稿日期: 2010-03-26; 修回日期: 2010-06-30

* 国家大宗淡水鱼产业技术体系专项资金(nycytx-49-16)和农业部公益性行业科研专项(200803013)资助

** 通讯作者. E-mail: zenglingbing@gmail.com

张波, 男, 1985年生, 硕士研究生. 研究方向: 鱼病防治技术. E-mail: zhangbo-24@163.com

每组 30 尾试验鱼,用不同浓度梯度的分离菌纯培养菌悬液以每尾 0.2 mL 剂量腹鳍基部注射感染健康鱼,设置注射 PBS 的对照组与空白对照组。养殖水温为 25~26 °C,充氧,投饵,定时换水,逐日观察记录死亡情况。

3) Biolog 系统鉴定方法。将单菌落纯培养的 BCB01 划线接种到 BUG 培养平板上,33 °C 在恒温培养箱培养 24 h,用无菌棉签蘸取一定量的单菌落细菌至无菌 IF-A 接种液中,制成菌悬液,利用浊度仪调整浊度范围在 92%~98% 之间,用八孔排枪将菌悬液转移至 Biolog GN3 培养板中,每孔接种菌悬液 100 μ L,加盖 30 °C 有氧培养 24 h 后,Microstation 仪自动读取细菌鉴定结果。

4) 药敏试验。采用药敏纸片琼脂平板扩散法,挑取 BCB01 单菌落,接种于 LB 液体培养瓶,32 °C,200 r/min 培养 18 h 后,测 560 nm 处 OD 值,根据公式:菌浓度=(18.758 7 \times D_{560} - 0.733 4) \times 稀释倍数,计算菌浓度。用 PBS 缓冲液将菌液稀释成 2×10^6 ,取 0.1 mL 于 LB 平板,用玻棒均匀涂布,将药敏纸片贴于平板上,32 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径大小。

5) 16S rRNA 基因扩增与测序。参照 Sigma 公司的 GenElute Bacterial Genomic DNA kit 试剂盒方法提取细菌总基因组。用于嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增的特异性上游引物为:5'-GAAAGTTGATGCCTAATACGTA-3',下游引物为:5'-CGTGCTGGCAACAAAGGACAG-3'^[5]。PCR 扩增采用 50 μ L 反应体系,其中含有:10 μ L $5 \times$ PCR 缓冲液,1 μ L 10 μ mol/mL dNTPs,20 μ mol/mL 的上下游引物各 1 μ L,0.5 μ L 5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶,2 μ L 模板 DNA,31.5 μ L ddH₂O。反应条件为:94 °C 预变性 5 min;接着 94 °C

变性 1 min,54 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1.5 min,35 个循环;72 °C 温育 10 min,4 °C 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳确定特异性条带后,对目的片段进行回收纯化后由北京天一辉远生物科技有限公司进行序列测定。

6) 序列分析与系统发育树的构建。通过 Blast 从 GenBank 数据库中检索与其同源性较高的细菌基因序列,从中选取与所分析的细菌基因序列同源性较高的已知菌株,采用 Mega4.1 软件进行邻位相连法(Neighbor-joining method)分析获得系统发育树,通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测,自举数集 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 患鱼症状及细菌分离

患病鱼体表无症状,鳃内显微镜检查无寄生虫感染,但有出血点。解剖发现病鱼肠道出血,肠系膜出血,肠道内壁有严重炎症,出现糜烂。肝脏和脾脏等内脏器官充血或出血,腹腔内有少许腹水或无腹水。

用被检病鱼的肝脏、脾脏、肾脏等材料于 LB 固体平板上划线培养分离细菌,32 °C 培养 48 h 的菌落特征:圆形光滑、边缘整齐、乳白色、直径 0.5 mm 左右。

2.2 人工感染试验

菌株 BCB01 制成菌悬液,人工腹腔注射感染健康青鱼,感染的青鱼复制出自然发病的相似症状,感染后 6 h 出现死亡(表 1)。人工感染鱼解剖发现肠道出血,肝脏和脾脏等内脏器官充血或出血,腹腔内有少许腹水。取感染死亡的青鱼的肝脏做细菌分离,均再次分离到原感染菌。注射 PBS 对照组与空白对照组观察期(10 d)内均正常存活。表明菌株 BCB01 是青鱼肠道出血症的致病菌。

表 1 人工感染试验结果¹⁾

Table 1 Results of artificial infection experiment

| 分组 Group | 菌液浓度/(cfu/mL) Concentration | 试验鱼数 Number of tested fish | 剂量/mL Dose | 不同时间的死亡尾数 No. of death at different time | | | | | | | 死亡率/% Mortality |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|
| | | | | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d | 6 d | 7 d | |
| 1 | 8.0×10^8 | 30 | 0.2 | 27 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 2 | 8.0×10^7 | 30 | 0.2 | 0 | 3 | 6 | 3 | 3 | 0 | 0 | 50 |
| 3 | 8.0×10^6 | 30 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| PBS 对照 PBS control | PBS | 30 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 空白对照 Control | — | 30 | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

1) 1~3 号试验组分别用不同浓度的 BCB01 菌悬液对实验鱼进行腹腔注射感染。Group 1 to 3 infected with bacterial strain BCB01.

2.3 Biolog 系统鉴定

Biolog 系统鉴定结果表明,菌株 BCB01 为嗜水

气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),其 SIM 值为 0.83;DIST 值为 4.39;PROB 值为 95.1%。SIM 和

DIS是2个重要的参数,表示测试结果与数据库相应的数据的匹配程度。当SIM>0.75、DIS<5.0时为良好的匹配;SIM值越接近于1,鉴定结果的可靠性越高^[6]。菌株BCB01对碳源的利用情况如表2所示。

表2 Biolog 鉴定结果¹⁾

Table 2 Results of Biolog identification

| 反应项目 Reaction item | 结果 Result | 反应项目 Reaction item | 结果 Result |
|--|--------------|---|--------------|
| A1:水 Water | 对照 CK | E1:p-羟基苯乙酸 p-hydroxy phenylacetic acid | P |
| A2:环糊精 α -cyclodextrin | P | E2:衣康酸 Itaconic acid | P |
| A3:糊精 Dextrin | P | E3: α -酮丁酸 α -keto butyric acid | P |
| A4:淀粉 Glycogen | P | E4: α -酮戊二酸 α -keto glutaric acid | P |
| A5:吐温 40 Tween 40 | P | E5: α -酮戊酸 α -keto valeric acid | P |
| A6:吐温 80 Tween 80 | B | E6:D,L-乳酸 D,L-lactic acid | P |
| A7:N-乙酰基-D半乳糖胺 N-acetyl-D-galactosamine | P | E7:丙二酸 Malonic acid | P |
| A8:N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine | P | E8:丙酸 Propionic acid | B |
| A9:侧金盏花醇 Adonitol | N | E9:奎尼酸 Quinic acid | P |
| A10:L-阿拉伯糖 L-arabinose | P | E10:D-葡萄糖二酸 D-saccharic acid | MN |
| A11:D-阿拉伯糖 D-arabitol | P | E11:癸二酸 Sebacic acid | P |
| A12:D-纤维二糖 D-cellobiose | N | E12:琥珀酸 Succinic acid | P |
| B1:赤藻糖醇 l-erythritol | P | F1:溴丁二酸 Bromo succinic acid | P |
| B2:D-果糖 D-fructose | L | F2:琥珀酰胺酸 Succinamic acid | P |
| B3:L-果糖 L-fructose | P | F3:葡萄糖醛酰胺 Glucuronamide | N |
| B4:D-半乳糖 D-galactose | P | F4:L-丙氨酸胺 L-alaninamide | P |
| B5:龙胆二糖 Gentiobiose | P | F5:D-丙氨酸 D-alanine | N |
| B6: α -D-葡萄糖 α -D-glucose | P | F6:L-丙氨酸 L-alanine | L |
| B7:m-肌醇 m-inositol | P | F7:L-丙氨酰甘氨酸 L-alanyl-glycine | N |
| B8: α -D-乳糖 α -D-lactose | L | F8:L-天冬酰胺酸 L-asparagine | N |
| B9:乳果糖 Lactulose | B | F9:L-天门冬氨酸 L-aspartic acid | P |
| B10:麦芽糖 Maltose | P | F10:L-谷氨酸 L-glutamic acid | P |
| B11:D-甘露醇 D-mannitol | B | F11:甘氨酸-L-天门冬氨酸 Glycyl-L-aspartic acid | MN |
| B12:D-甘露糖 D-mannose | N | F12:甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid | P |
| C1:D-蜜二糖 D-melibiose | P | G1:L-组氨酸 L-histidine | L |
| C2: β -甲基-D-葡萄糖苷 β -methyl-D-glucoside | P | G2:羟基-L-脯氨酸 Hydroxy-L-proline | MN |
| C3:D-阿洛酮糖 D-psicose | P | G3:L-亮氨酸 L-leucine | N |
| C4:D-棉子糖 D-raffinose | P | G4:L-鸟氨酸 L-ornithine | P |
| C5:L-棉子糖 L-rhamnose | P | G5:L-苯丙氨酸 L-phenylalanine | MP |
| C6:D-山梨醇 D-sorbitol | N | G6:L-脯氨酸 L-proline | N |
| C7:蔗糖 Sucrose | P | G7:L-焦谷氨酸 L-pyroglutamic acid | P |
| C8:D-海藻糖 D-trehalose | B | G8:D-丝氨酸 D-serine | P |
| C9:松二糖 Turanose | P | G9:L-丝氨酸 L-serine | P |
| C10:木糖醇 Xylitol | P | G10:L-苏氨酸 L-threonine | MP |
| C11:甲基丙酮酸 Methyl pyruvate | N | G11:D,L-肉碱 D,L-carnitine | B |
| C12:单甲基琥珀酸 Mono methyl succinate | P | G12: γ -氨基丁酸 γ -amino butyric acid | N |
| D1:乙酸 Acetic acid | P | H1:尿刊酸 Urocanic acid | P |
| D2:顺-乌头酸 Cis-aconitic acid | P | H2:肌苷 Inosine | P |
| D3:柠檬酸 Citric acid | P | H3:尿苷 Uridine | L |
| D4:甲酸 Formic acid | B | H4:胸腺嘧啶核苷 Thymidine | N |
| D5:D-乳糖酸内酯 D-galactonic acid lactone | P | H5:苯乙胺 Phenylethylamine | P |
| D6:D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid | P | H6:丁二胺 Putrescine | P |
| D7:D-葡萄糖酸 D-gluconic acid | P | H7:2-氨基乙醇 2-aminoethanol | P |
| D8:D-葡萄糖胺酸 D-glucosaminic acid | L | H8:2,3-丁二醇 2,3-butanediol | P |
| D9:D-葡萄糖酸 D-glucuronic acid | P | H9:丙三醇 Glycerol | N |
| D10: α -羟基丁酸 α -hydroxy butyric acid | P | H10:D,L- α -磷酸甘油 D,L- α -glycerol phosphate | N |
| D11: β -羟基丁酸 β -hydroxy butyric acid | P | H11:1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-phosphate | B |
| D12: γ -羟基丁酸 γ -hydroxy butyric acid | P | H12:6-磷酸葡萄糖 Glucose-6-phosphate | N |

1) P:阳性; N:阴性; MP:正失配; MN:负失配; B:临界值; L:少于对照组 A1。P: Positive; N: Negative; MP: Mismatched pos; MN: Mismatched neg; B: Bordline; L: Less than A1 well.

2.4 药敏试验

采用药敏纸片琼脂平板扩散法对菌株 BCB01 进行药敏试验(药敏纸片直径为 6 mm),结果显示:该菌株 BCB01 对大多数试验药物敏感,对复达欣、头孢西丁、先锋必等 11 种药物高度敏感,对克拉霉

素、氟哌酸、阿米卡星等 13 种药物中度敏感;对氧氟沙星、万古霉素、克林霉素等 6 种药物低度敏感;对氧哌嗪青霉素、复方新诺明、苯唑青霉素等 5 种药物不敏感(表 3)。

表 3 BCB01 对药物敏感性试验结果¹⁾

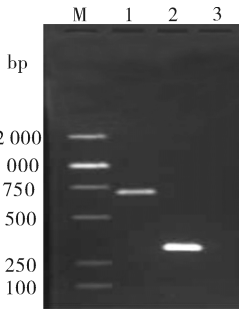
Table 3 Antibiotic susceptibility test of BCB01

| 抗生素药物 Antibiotics | 抑菌圈直径/mm Diameter of inhibited halo | 敏感性 Susceptibility | 抗生素药物 Antibiotics | 抑菌圈直径/mm Diameter of inhibited halo | 敏感性 Susceptibility |
|------------------------|--|-----------------------|----------------------|--|-----------------------|
| 氧氟沙星 Ofloxacin | 8 | L | 头孢吡肟 Cefepime | 30 | H |
| 克拉霉素 Clarithromycin | 12 | M | 左氟沙星 Levofloxacin | 14 | M |
| 复达欣 Fortum | 25 | H | 克林霉素 Clindamycin | 6 | L |
| 头孢呋肟 Zinacef | 24 | H | 米诺环素 Minocycline | 20 | H |
| 氧哌嗪青霉素 Piperacillin | — | N | 红霉素 Erythromycin | 12 | M |
| 万古霉素 Vancomycin | 8 | L | 苯唑青霉素 Oxacillin | — | N |
| 氟哌酸 Norfloxacin | 13 | M | 壮观霉素 Spectinomycin | 14 | M |
| 复方新诺明 Sulfamethoxazole | — | N | 环丙沙星 Ciprofloxacin | 10 | L |
| 阿米卡星 Amikacin | 12 | M | 妥布霉素 Tobramycin | 6 | L |
| 先锋必 Cefobid | 25 | H | 青霉素 G Penicillin G | — | N |
| 庆大霉素 Gentamycin | 15 | M | 氨苄青霉素 Ampicillin | — | N |
| 先锋噻肟 Cefotamine | 28 | H | 卡那霉素 Kanamycin | 6 | L |
| 头孢三嗪 Ceftriaxone | 24 | H | 链霉素 Streptomycin | 11 | M |
| 头孢西丁 Cefoxitin | 30 | H | 麦迪霉素 Midecamycin | 14 | M |
| 呋喃妥因 Nitrofurantoin | 18 | H | 先锋 V Novaporin V | 14 | M |
| 安曲南 Aztreonam | 22 | H | 多粘霉素 B Polymyxin B | 13 | M |
| 氯霉素 Chloramphenicol | 23 | H | 四环素 Tetracycline | 12 | M |
| 头孢噻吩 Cefalotin | 15 | M | | | |

1) 敏感性判定: 6 mm 以下用“—”表示, 表明不敏感; 6~10 mm 用“L”表示, 表明低度敏感; 11~15 mm 用“M”表示, 表明中度敏感; 15 mm 以上, 用“H”表示, 表明高度敏感。Susceptibility: N: No susceptible; L: Low susceptible; M: Medium susceptible; H: Highly susceptible.

2.5 基因序列分析和系统发育树的构建

以总 DNA 为模板, 经 1 对 16S rRNA 特异性的引物 PCR 扩增反应, 获得 1 条约 700 bp 条带(图 1), 其结果与预期扩增的嗜水单胞菌 16S rRNA 目的片段大小一致, 为 669 bp。



M: Marker (DNA marker DL 2 000); 1: 菌株 BCB01 16S rRNA 基因; PCR 扩增产物 PCR product of 16S rRNA gene; 2: 阳性对照 (323 bp) Positive control; 3: 阴性对照 Negative control.

图 1 菌株 BCB01 16S rRNA 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of 16S rRNA gene of strain BCB01

将菌株 BCB01 的 16S rRNA 基因序列用 Blast 在 GenBank 中进行检索, 发现其与气单胞菌属的 16S rRNA 基因序列自然聚类, 在相近的 95 个序列

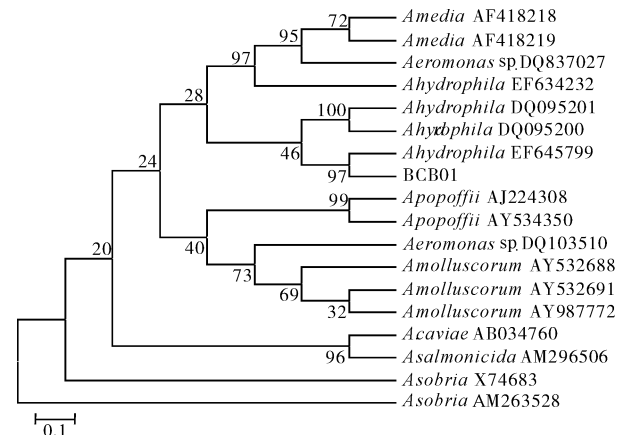


图 2 以菌株 BCB01 的 16S rRNA 基因序列构建的气单胞菌属系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of Aeromonas based on 16S rRNA gene sequence of strain

中,有66个为气单胞菌属的16S rRNA基因序列,菌株BCB01与它们的同源性为95%~99%。从这些序列中选取17个序列进行系统发育学分析,结果如图2所示,菌株BCB01与*Aeromonas hydrophila* (EF645799)聚合,且置信度很高,为97%。综合菌株BCB01的Biolog系统鉴定和16S rRNA基因序列分析结果,将青鱼肠道出血症的致病菌确定为嗜水气单胞菌。

3 讨论

自20世纪80年代末至今,嗜水气单胞菌都是中国、菲律宾、泰国、印度等传统池塘养殖大国鱼类暴发性疾病的最重要的病原。其致病范围极其广泛,可引起淡水鱼类、海水鱼类及鳖类等感染病症,包括四大家鱼、鲤、鲫、鳊、团头鲂、泥鳅、黄鳝、斑点叉尾鲴、施氏鲟、鳊鲈、卵形鲳鱼参、军曹鱼、大黄鱼、红鳍笛鲷、中华鳖等^[7-11]。欧美等国对鱼源气单胞菌的研究较多,而东南亚传统的水产养殖大国则更注重该菌对养殖鱼类的危害^[12-13]。

王德铭等^[2]在20世纪50年代通过革兰氏染色和常规生理生化鉴定的方法确定了青鱼肠炎病的致病菌是肠型点状极毛杆菌(即肠型点状气单胞菌),其患病鱼症状与本次研究的病鱼症状有些类似。阿哈提等也曾对青鱼暴发性疾病进行过研究,但阿哈提等^[14]描述的病鱼症状是青鱼的体表、内脏及肠道均充血或出血,与本次研究的病鱼症状有些不同。本次湖北省荆州市暴发的青鱼疾病其病鱼的体表并无症状,但是肠道出血,肠道内壁有严重炎症,出现糜烂;肝脏和脾脏等内脏器官也有不同程度的充血或出血,与卢新华等^[15]描述的青鱼出血病症状相似,但卢新华等没有进行病原菌分离鉴定工作。嗜水气单胞菌的血清型众多,毒力因子差异明显^[16],可能导致病鱼出现不同的表现症状。由于2009年7月湖北荆州暴发的青鱼疾病典型症状为肠道出血,故将疾病定名为青鱼肠道出血症。

随着仪器分析技术的进步和计算机的广泛应用,现代细菌鉴定进入了基于仪器自动化分析的鉴定系统阶段;同时随着分子生物学的发展,细菌分类也从传统的表型分类进入基因型分类水平,16S rRNA分析已成为研究生命系统进化及细菌分类鉴定最重要的方法^[17]。Biolog技术原理是微生物在利用碳源过程中产生的自由电子与四唑盐染料发生还原显色反应,而颜色的深浅反映了微生物对碳源

的利用程度^[18]。通过读数仪读取颜色变化,将目标微生物与数据库中的特征数据进行比对,然后进行最大限度的匹配。碳源利用分析的Biolog系统已经成为目前国际上细菌分类鉴定重要的技术手段^[19]。笔者利用Biolog系统快速、准确地鉴定出了菌株BCB01,证明了Biolog系统操作标准化、简便、省时、准确,具有常规微生物鉴定方法无法比拟的优势^[20]。同时以细菌16S rRNA基因序列构建的系统发育树,其置信度范围较宽,说明16S rRNA基因序列应用于鱼源气单胞菌系统演化研究的有效性和可靠性^[21-23],同时也证明了16S rRNA基因序列同源性分析适宜用于亲缘关系较近的气单胞菌属之间的鉴别^[24]。

药物敏感性试验结果表明,该菌株BCB01对大多数试验药物敏感,对复达欣、头孢西丁、先锋必等药物高度敏感,对克拉霉素、氟哌酸、阿米卡星等药物中度敏感;该结果可为青鱼养殖生产中对该病进行预防和治疗以及安全用药等提供科学依据。

有关青鱼出血病的研究报道大多见于20世纪八九十年代,普遍缺乏先进仪器和分子鉴定的结果。本试验从荆州患暴发性肠道出血症的青鱼肝脏中分离到的致病性病原菌,经Biolog全自动细菌鉴定仪与分子鉴定后,确认为嗜水气单胞菌,为青鱼肠道出血症等的进一步深入研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] LI S F, LU G Q, ZHOU B Y. Evaluation on the potential capacity of the swan oxbow for the conservation of the major Chinese carps[J]. *Aquaculture*, 1995, 137: 46-47.
- [2] 王德铭,葛蕊芳,吴兰彰,等. 鲢、青鱼传染性肠炎的研究[J]. *水生生物学集刊*, 1959(3): 241-254.
- [3] 蔡完其,孙佩芳. “四大家鱼”对暴发性鱼病的抗病力的中间差异[J]. *中国水产科学*, 1995, 2(2): 71-77.
- [4] WANG H R, HU Y H, ZHANG W W, et al. Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine[J]. *Vaccine*, 2009, 27(30): 4047-4055.
- [5] 储卫华,陆承平. PCR扩增特异性16S rDNA和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌[J]. *水产学报*, 2005, 29(1): 79-82.
- [6] 李运,盛慧,赵荣华. Biolog微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J]. *酿酒科技*, 2005(7): 84-85.
- [7] 秦国民,张晓君,陈翠珍,等. 鲤嗜水气单胞菌感染症及其病原生物学特性[J]. *水生态学杂志*, 2008, 1(2): 53-57.
- [8] 刘堂水,汪成竹,陈昌福. 斑点叉尾鲴细菌性病原的分离与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(5): 550-554.
- [9] 孟彦,肖汉兵,曾令兵,等. 施氏鲟出血性败血症病原菌的分离

- 和鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 822-826.
- [10] 李楠, 田莉瑛, 赵宝华, 等. 嗜水气单胞菌的分离培养及鉴定[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2009, 33(2): 240-243.
- [11] 张林, 艾晓辉, 袁科平, 等. 中华鳖嗜水气单胞菌的生物学特性[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2009, 30(6): 75-78.
- [12] SIRITAT T, INTUSETH J, CHANPHONE J, et al. Characterisation of *Aeromonas hydrophila* extracellular products with reference to toxicity virulence protein profiles and antigenicity[J]. Asian Fisheries Science, 1999, 12: 371-378.
- [13] CHAKRABORTY T, HUHLE B. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas* demonstrate the role of aerolysin in *Aeromonas* associated systemic infections[J]. Infect and Immun, 2002, 55(9): 227-234.
- [14] 阿哈提, 黄嘉骊, 苏艳, 等. 青鱼暴发性疾病的病原分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 39.
- [15] 卢新华, 方爱萍, 张根芳. 青鱼出血病及其防治[J]. 内陆水产, 2002, 27(3): 36.
- [16] 于学辉, 王远微, 汤承, 等. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2007, 33(3): 507-514.
- [17] 龙雯, 陈存社. 16S rRNA 测序在细菌鉴定中的应用[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2006, 24(5): 10-12.
- [18] BOCHNER B R. Sleuthing out bacterial identities [J]. Nature, 1989, 339: 157-158.
- [19] 程池, 杨梅, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54.
- [20] 冯瑞华, 樊蕙, 李力, 等. Biolog 细菌自动鉴定系统应用初探[J]. 微生物学杂志, 2006, 20(2): 36-38.
- [21] RUDI K, SKANSENG B, DROMTORP S M. Explorative screening of complex microbial communities by real-time 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses[J]. Biotechniques, 2005, 39: 116-121.
- [22] WARD D M, WELLER R, BATESON M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345: 63-65.
- [23] OTO M, SUDA W, SHINOYAMA H. 16S rRNA gene-based analysis of microbial community by whole-genome amplification and minigel-single-strand conformation polymorphism technique[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 5(102): 482-484.
- [24] DORSCH M, ASHBOLT N J, COX P T, et al. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based screening of environmental isolates[J]. Appl Bacteriol, 1994, 77: 722-726.

Isolation and Identification of Pathogen from Enteric Septicemia of Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*)

ZHANG Bo ZENG Ling-bing LUO Xiao-song XU Jin XIAO Yi ZHOU Yong

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China

Abstract The dominant bacterial strain, designated as BCB01, was isolated from the kidney of enteric septicaemia of black carp *Mylopharyngodon piceus*. Artificial intraperitoneal injection with the bacterial suspensions to healthy black carp could reproduce the diseased symptoms as occurred in wild. Identification of the pathogen by Biolog system showed that the isolated causative pathogen BCB01 was *Aeromonas hydrophila*. According to their 16S rRNA gene sequence and molecular phylogenetic dendrogram, the strain BCB01 had close relationship to *Aeromonas hydrophila* with a similarity of 99%. The susceptibility test to antibiotics demonstrated that the isolate strain BCB01 was susceptible to most of the tested antibiotics, especially highly susceptible to 11 kinds of antibiotics, such as fortum, cefoxitin, cefobid and so on.

Key words black carp; enteric septicaemia; *Aeromonas hydrophila*; isolation and identification; antibiotic susceptibility test