

黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌的鉴定及生物学特性研究

周冬仁 叶雪平 罗毅志 施伟达 杭小英

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *EDWARDSIELLA ICTALURI* ISOLATED FROM *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

ZHOU Dong-Ren, YE Xue-Ping, LUO Yi-Zhi, SHI Wei-Da and HANG Xiao-Ying

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

关键词: 黄颡鱼; 鲇鱼爱德华氏菌; 16S rRNA

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; *Edwardsiella ictaluri*; 16S rRNA

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)04-0862-04

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*), 又称黄嘎、昂刺、黄腊丁等, 隶属鲇形目(Siluriformes), 鲇科(Bagridae), 黄颡鱼属(*Pelteobagrus*), 是我国重要的小型底层经济鱼类, 在我国各大水系均有分布, 特别在长江中下游的湖泊更为集中, 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, 黄颡鱼的人工养殖几年前在全国各地悄然兴起。近年来由于养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 黄颡鱼出现了各种疾病, 如病毒病、细菌病和寄生虫病, 导致严重的经济损失。其中有一种病症近年来在养殖过程中常有发生, 主要症状为: 在发病初期病鱼无明显临床表现, 随着病程发展, 病鱼食欲减退, 离群缓游、反应迟钝, 垂直挂在池壁。后期一部分病鱼鱼嘴周边及各鳍充血斑, 下颌皮肤破损出血呈圆形孔洞。笔者从患病黄颡鱼的肝肾组织中分离到一株有强致病力的鲇鱼爱德华氏菌, 对该菌株的主要生物学性状、16S rRNA 基因序列进行了研究, 并对分离株进行了生理生化特性分析和药物敏感性试验, 为有效防治提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌株分离

浙江省湖州某养殖户提供的患病黄颡鱼, 典型症状

为下颌皮肤破损出血呈圆形孔洞, 4 月末到 10 月都有发病。无菌条件下取肝脏、脑、肾脏组织在营养琼脂平板上划线, 30℃下培养, 48h 后取单菌落作纯培养。

1.2 病原形态观察

挑取纯化后的单菌落, 30℃培养 48h 后, 经涂片、固定和染色, 显微镜观察。

1.3 分离菌对黄颡鱼的攻毒试验

挑取菌落到脑心浸液培养液中震荡培养 48h, 用无菌生理盐水制成细菌悬液, 调整菌液浓度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 。以各浓度组菌液对健康黄颡鱼采用肌肉注射(背鳍基部)方式进行攻毒, 各试验组用健康黄颡鱼 7 尾, 规格为 8—12 cm。同时设注射生理盐水的对照组。饲养于水族缸中, 直径 80 cm、水深 50 cm、水温控制在 25℃左右, 观察发病情况, 对照组注射生理盐水, 注射剂量为 0.2 mL/尾, 并设空白对照组。观察、记录鱼的发病症状及死亡情况, 利用寇氏法计算 LD_{50} , 并从濒死鱼的病灶进行细菌再分离。

1.4 生化特性鉴定

将纯化后的菌株利用梅里埃公司的 BIOMERIEUX 肠杆菌科细菌和非苛养革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒进行生化鉴定。

收稿日期: 2009-04-24; 修订日期: 2010-02-01

基金项目: 科技部星火计划项目(国科发计字 2006377); 宁波市渔业专项资金(渔业科技 7-13)资助

作者简介: 周冬仁(1980—), 男, 江苏江阴人; 工程师; 主要从事水产病害防治。E-mail: zdr2zdr@126.com

通讯作者: 叶雪平, 高级工程师, E-mail: yxp900@sina.com

1.5 分离株的 PCR 鉴定

引物设计 以细菌分类学上具有重大意义的 16S rRNA 为靶基因, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列如下: N1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; N2: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'。

PCR 反应 采取煮沸法提取 DNA, *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 分子量标准购自 Takara 公司。PCR 反应条件: 50 μ L 反应体系, 每管依次加入 10 \times PCR-Buffer 5.0 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 4.0 μ L、2.5 mmol/L dNTP 4.0 μ L、5 U/ μ L *Taq* polymerase 0.3 μ L、10 pmol/L 上下游引物各 1.0 μ L, 加超纯水 33.7 μ L、模板 1 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 3min 后, 以下条件 PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 溴化乙锭染色。PCR 产物测序由上海英骏生物技术有限公司完成, 之后进行 Blast 分析。

1.6 药物敏感性试验

药敏纸片琼脂平板扩散法, 购于杭州天和微生物试剂有限公司。将震荡培养的细菌取 15 μ L 均匀涂布于药敏琼脂平板上, 再将药敏纸片贴在平板表面, 方法参照纸片法抗菌药物敏感试验标准(SAST)。

2 结 果

2.1 菌体形态显微观察

在普通营养琼脂培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 48h, 能形成圆形、隆起、湿润并带有光泽、呈半透明状的菌落, 菌落大

小为 0.5 mm 左右。革兰氏染色呈阴性, 镜检细菌为短杆状, 大小多在 1—2 μ m, 无荚膜, 不形成芽孢。

2.2 生理生化鉴定

试条经接种, 孵育 24h 后, 用 ATB Expression 仪判读结果, 其生化谱(表 1)。

2.3 分离菌株的 PCR 鉴定

PCR 扩增出菌株的 16S rRNA 基因片段约为 1500 bp, 对此片段进行回收测序。对序列进行同源性分析发现与鲇鱼爱德华氏菌 *Edwardsiella ictaluri* 标准菌株 (AB453281.1、AB050826.1、EF015475.1) 的保守性片段有 100% 的同源性。结合形态学和生理生化特性, 因此可以将所分离得到的菌株鉴定为鲇鱼爱德华氏菌。

2.4 药物敏感性试验

结果表明, 妥布霉素、罗红霉素、庆大霉素、林可霉素、壮观霉素、卡那霉素、链霉素等 7 种抗生素对两株菌完全无抑制效果, 但分离株对呋喃妥因、氟哌酸、先锋 IV、强力霉素、青霉素、依诺沙星、环丙沙星、菌必治、新霉素、呋喃唑酮敏感, 几种抗菌药物对两株菌的抑菌圈数据(表 2)。

2.5 病鱼的临床症状及人工感染试验

患病黄颡鱼的主要症状为: 在发病初期病鱼无明显临床表现, 病鱼食欲减退, 离群缓游、反应迟钝, 垂直挂在池壁。攻毒后第 3 天, 开始有鱼死亡。后期一部分病鱼鱼嘴周边及各鳍充血, 下颌皮肤破损出血呈圆形孔洞。整个试验持续 10d(表 3)。

表 1 ATB 微生物自动鉴定系统鉴定菌株 HN004 和 HN005 的结果
Tab. 1 The identification results of Strain by ATB Microbiology Identification System

测定项目 Test items	结果 Result	测定项目 Test items	结果 Result
鸟氨酸脱羧酶	ODC -	吡啶产生	IND -
精氨酸双解酶	ADH -	N-乙酰- β -葡萄糖苷	β NAG -
赖氨酸脱羧酶	LDC -	β 半乳糖苷酶	β GAL -
脲酶	URE -	D-葡萄糖	GLU -
L-阿拉伯醇	LARL -	D-蔗糖	SAC -
半乳糖酸盐	GAT -	L-阿拉伯糖	LARA -
5 酮基-葡萄糖酸	5KG -	D-阿拉伯醇	DARL -
胍酶	LIP -	α 葡萄糖苷酶	α GLU -
丙酮酸钠	RP +	α 半乳糖苷酶	α GAL -
β 葡萄糖苷	β GLU -	D-海藻糖	TRE -
D-甘露醇	MAN -	L-鼠李糖	RHA -
D-麦芽糖	MAL -	肌醇	INO -
侧金盏花醇	ADO -	D-纤维二糖	CEL -
古老糖	PLE -	D-山梨醇	SOR -
β 葡萄糖苷酶	β GUR -	麦芽糖苷酶	α MAL -
丙二酸	MNT -	L-天冬氨酸芳胺酶	AspA -

表 2 几种抗菌药物对菌株的抑菌圈直径
Tab. 2 The sensitivity of the isolate to antibiotics

抗生素 Antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)		结果 Result	抗生素 Antibiotics	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)		结果 Result
妥布霉素	Tobramycin	9	R	氯霉素	Chloramphenicol	14	M
罗红霉素	Roxithromycin	0	R	依诺沙星	Enoxacin	29	S
庆大霉素	Gentamicin	8	R	环丙沙星	Ciprofloxacin	34	S
呋喃妥因	Nitrofurantoin	25	S	壮观霉素	Spectinomycin	10	R
林可霉素	Lincomycin	0	R	卡那霉素	Kanamycin	10	R
氟哌酸	Norfloxacin	27	S	菌必治	Rocephin	33	S
先锋IV	Cefalexi	32	S	新霉素	Neomycin	16	S
强力霉素	Doxycycline	18	S	呋喃唑酮	Furazolidone	26	S
青霉素	Penicillin	20	S	链霉素	Streptomycin	8	R

注: S. 敏感 Sensitive; R. 耐药 Resistant; M. 中介度 Moderately sensitive

表 3 人工感染试验结果
Tab. 3 Results of artificial infection experiment

菌液浓度 Bacterial concentration (cfu)	攻毒剂量 Dose per fish (mL)	试验梭鱼数(尾) Number of tested fish	梭鱼死数(尾) Number of dead fish
1.0×10 ⁸	0.2	7	7
1.0×10 ⁷	0.2	7	7
1.0×10 ⁵	0.2	7	6
1.0×10 ⁵	0.2	7	4
1.0×10 ⁴	0.2	7	1
生理盐水 Normal saline	0.2	7	1
空白对照 Blank control	0.2	7	0

攻毒情况可以看出,该菌株对健康黄颡鱼具有较
强的毒力,LD₅₀达到 0.2×10^{4.7}。我们对攻毒后第 3 天死亡
的黄颡鱼的脑、肝和肾等组织进行细菌分离,通过形态和
生化鉴定证明,又能获得与菌株 HSY9 生长特性完全一
致的菌株,且分离平板上的菌落多而纯,无杂菌。生理盐
水组死亡鱼中未分离到菌株。

3 讨 论

经人工感染试验,从发病黄颡鱼中分离到菌株对健
黄颡鱼有较强的致病和致死作用,人工感染出现的症状
与自然发病症状相同。另外,人工感染发病和死亡的黄颡
鱼均能分离到单一菌株,其形态和生化特征与菌株完全
一致,而对照组黄颡鱼不发病,也未分离到任何细菌。以
上结果符合生物学柯赫法则^[1],证明菌株 HSY9 是黄颡鱼
发病的病原菌。通过病原菌的形态特征观察,发现革兰氏
染色阴性,镜检细菌为短杆状,大小多在 1—2 μm,无荚
膜,不形成芽孢,初步鉴定该菌为鲢鱼爱德华氏菌^[2]。为
了进一步确定该菌株的分类地位,采用通用引物扩增出
了该菌的 16S rRNA 基因片段,对该片段进行测序,并进

行了同源性分析。结果表明:该菌的 16S rRNA 基因序列
与鲢鱼爱德华氏菌的同源性最高,序列相似性达 100%,
从而在分子水平上鉴定该菌为鲢鱼爱德华氏菌。

1962 年由日本学者保科首次报道爱德华氏菌对鳊
(*Anguilla japonica*) 的感染,目前该菌已在 20 多种鱼类中
引起病害^[3,4]。由爱德华氏菌所引起的鱼类感染病症,常
统称为鱼类的爱德华氏菌病(*Edwardsiellasis*)^[5]。但早期一
般多指由迟钝爱德华氏菌所引起的鳊感染症,所以也
称为鳊爱德华氏菌病,还有鳊赤鳍病、鳊腹胀病、鳊溃
瘍病、鳊肝肾病、鳊肝肾综合征等的别称,实际上这些别
称当属于迟钝爱德华氏菌在鳊的不同感染类型;由鲢
鱼爱德华氏菌所引起的鱼类爱德华氏菌病主要是鲢鱼肠
道败血;保科爱德华氏菌的病原学意义不大,资料甚少,
有记述其主要为鳊的致病菌^[6,7]。

鲢鱼爱德华氏菌所引起的斑点叉尾鲷肠道败血症
(Enteric Septicaemia of Catfish ESC),是于 1976 年在美国
亚拉巴马州和佐治亚洲的河鲈(也称鲢鱼)中首次发现,
继之 ESC 成了美国南部鲈鱼养殖业危害最大的传染病,
世界卫生组织已将 ESC 列为重要的鱼病,同时将该病列

为进出口法定检测项目^[8]。

鲇鱼爱德华氏菌还可感染犀目鲃、黄鲃、黑鲃和云斑鲃、黑鲈、金体美鲃、鳊等也可被感染发病, 白鲇鱼和褐色鲇鱼中也曾分离到该菌^[9]。同时, 本菌在池水中可存活 8d, 在底泥中 18℃可存活 45d, 25℃时在池塘底泥中稳定, 可存活 90d 以上^[10]。因此, 该细菌可能是多种水生生物的病原菌, 对水产养殖可以产生较大危害, 应引起生产和科研工作者足够重视。

对 18 种药物的敏感试验结果表明, 分离株对呋喃妥因、氟哌酸、先锋Ⅳ、强力霉素、青霉素、依诺沙星、环丙沙星、菌必治、新霉素、呋喃唑酮敏感, 这对黄颡鱼的鲇鱼爱德华氏菌病的合理用药提供了依据。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish Third (revised) Edition [M]. Chichester, UK Praxis Publishing Ltd. 1999, 22—23, 81—84
- [2] Zheng D H, Mai K S. Review of studies on *Edwardsiella tarda* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2004, (1): 52—59 [郑大海, 麦康森. 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*) 研究概况. 海洋湖沼通报, 2004, (1): 52—59]
- [3] Yin Z, Xu B H. Studies on the bacteriosis of fishes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(1): 76—83 [殷战, 徐伯亥. 鱼类细菌性疾病的研究. 水生生物学报, 1995, 19(1): 76—83]
- [4] Takamitsu Sakai, Kinya Kanai, Kiyoshi Osatomi, *et al.* Identification of a 19.3-kDa protein in MRHA-positive *Edwardsiella tarda*: putative fimbrial major subunit [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 226: 127—133
- [5] Kim J & Marshall D L. Influence of catfish skin mucus on trisodium phosphate inactivation of attached salmonella *Typhimurium*, *Edwardsiella tarda* and *Listeria monocytogenes* [J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(7): 1146—1151
- [6] Gutierrez M A & Miyazaki T. Responses of Japanese eels to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formalin killed cells or lipopolysaccharide of the bacterium. [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1994, 6(2): 110—117
- [7] Fujiki K, Matsuyama H & Yano T. Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Fish Diseases*. 1994, 17(4): 349—355
- [8] Kim J & Marshall D L. Effect of lactic acid on *Listeria monocytogenes* and *Edwardsiella tarda* attached to catfish skin [J]. *Food Microbiology*, 2001, 18(6): 589—596
- [9] Salati, F, Kawai K. & Kusuda R. Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens [J]. *Fish Pathology*, 1983, 18(3): 135—141
- [10] Putanae S Srinivasa Rao, Tit Meng Lim, Ka Yin Leung. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis [J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1343—1351