

文章编号: 1674-7054(2018)02-0136-06

暹罗鳄致病性嗜水气单胞菌 嗜水亚种的分离鉴定

曾纪锋 蒲文渊 郭桂英 杨 诺 侯国锋 郑继平

(海南大学 热带农林学院, 海口 570228)

摘 要: 对海南陵水某鳄鱼养殖场发病死亡鳄鱼进行病理解剖和病原分离鉴定, 获得的分离菌株为革兰氏阴性杆菌, 其培养特性、生化反应等与嗜水气单胞菌嗜水亚种生化特性基本一致, 两者的 16S rRNA 基因序列同源性高达 99.9%, 在系统发育树中与嗜水气单胞菌嗜水亚种同属一发育分支。该菌的人工感染试验和药物敏感试验结果表明: 分离菌株对 NIH 小鼠的半数致死量 (LD_{50}) 为 2.5×10^5 /只, 具有较强的致病作用; 在耐药性上, 该菌株对丁胺卡那霉素、环丙沙星、氟苯尼考等 13 种抗生素敏感, 对红霉素、氨苄青霉素、青霉素、阿莫西林、链霉素、克林霉素及萘啶酸等 9 种抗生素有耐药性。

关键词: 嗜水气单胞菌嗜水亚种; 暹罗鳄; 鉴定; 药敏试验

中图分类号: S 858.9

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.02.002

鳄鱼隶属脊索动物门、脊椎动物亚门、爬行纲、鳄行目, 现存鳄类有 3 科 (鳄科 *Crocodylidae*、长吻鳄科 *Gavialidae*、鼈科或短吻鳄科 *Alligatoridae*) 8 属 23 种。鳄鱼主要分布于热带和亚热带地区, 为肉食性卵生脊椎类两栖爬行动物, 是与恐龙同时代的最古老爬行动物, 也是迄今活着的最原始动物之一。鳄鱼属濒危野生动物, 国际上被列为 I 类保护的濒危野生动植物。我国的扬子鳄 (*Alligator inensis*) 被列为国家一级野生保护动物, 国家林业局在 2003 年批准了尼罗鳄 (*Crocodylus niloticus*)、暹罗鳄 (*C. siamensis*) 和湾鳄 (*C. porosus*) 等 3 种鳄鱼列入首批 54 种可商业利用的野生动物^[1]。鳄鱼全身都是宝, 鳄鱼肉含有丰富优质的蛋白质、人体必需氨基酸、不饱和脂肪酸、各种维生素及微量元素, 有很高的营养价值和保健功能, 鳄鱼的其他组织器官也有不同的保健作用和开发利用价值, 如鳄鱼皮可制作高级皮革等。我国从 1993 年开始从国外引进不同鳄种并大量养殖, 逐渐成为主要的鳄鱼养殖和消费国之一^[2]。地处热带的海南, 由于优越的温热自然条件, 吸引了国内多家大型养鳄企业在海南养殖, 促进了海南养鳄业的快速发展。2016 年 4 月, 海南某鳄鱼养殖场 1 龄的鳄鱼发生了以腹部皮下、四肢以及内脏充血、出血为特征病变的感染, 引发幼年鳄鱼死亡, 给鳄鱼养殖场带来严重经济损失。笔者从病死鳄鱼肝组织内分离得到 1 株病原菌株, 采用细菌表型特征及生理、生化特性的测定方法, 并通过分子生物学 16S rRNA 基因序列的系统发育学分析方法对分离菌株进行鉴定, 此外, 还对该菌株进行人工感染试验和耐药性试验, 以确认该菌的致病性及筛选其敏感药物, 旨在为鳄鱼病原多样性研究与探索有效防治措施提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源及实验动物 病料样品采自海南陵水县某鳄鱼养殖场死亡的 1 龄暹罗鳄肝脏的组织; 实

收稿日期: 2017-07-24

修回日期: 2017-11-20

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目 (20153083); 海南省自然科学基金面上项目 (317071); 海南省自然科学基金创新研究团队项目 (2017CXTD005); 国家自然科学基金项目 (31460699)

作者简介: 曾纪锋 (1963-) 男, 副教授, 研究方向: 动物病原微生物, E-mail: jifengzeng@126.com

通信作者: 郑继平 (1973-) 男, 教授, 研究方向: 微生物遗传, E-mail: jiping.zheng@hainu.edu.cn

验动物 NIH 小鼠购自广东省医学实验动物中心,体质量为每只 20~26 g。

1.2 试剂 Mueller-Hinton 琼脂培养基购自 OXIOD 公司;抗菌药物纸片和细菌生化微量鉴定管均购自杭州天和微生物试剂有限公司。细菌 DNA 提取试剂盒、DL2000Marker、*Taq* 酶、dNTP、10× 缓冲液、琼脂糖凝胶和 PCR 产物纯化试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.3 细菌的分离与纯培养 无菌操作采集死亡鳄鱼病变组织并接种于血琼脂平板,各置于厌氧及有氧环境下,37℃ 培养 24~48 h 后,观察细菌的生长状况,挑取形态一致的优势菌落进行培养,获得纯培养菌株,将分离的菌株命名为 HNE1。此外,将病变肝脏组织样品加入无菌生理盐水进行研磨,并反复冻融,经 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,吸取上清液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 细菌滤器过滤,滤液腹腔接种 NIH 小鼠,每只 0.2 mL。

1.4 形态观察及理化特性鉴定 取分离菌株 HNE1 接种于 TSA 琼脂培养基中,在 37℃ 培养 24 h,观察细菌的生长情况及菌落形态特征,并进行革兰氏染色镜检形态;按常规方法进行细菌的生理生化试验,将纯化 HNE1 菌株接种细菌生化微量管中,按常规方法进行细菌生化特性的测定,具体试验方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[3] 和文献 [4-5] 进行。

1.5 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建 依北京艾德莱生物科技有限公司 DNA 快速提取试剂盒所述方法,提取 HNE1 基因组 DNA,以提取的基因组 DNA 作为模板,采用细菌 16S rRNA 通用引物 F: GGGATAACTACTGGAAACGGTA 和 R: GAAGGCACTCCCGTATCTCTA 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:94℃ 预变性 3 min;93℃ 变性 30 s;54℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 1 min 30 s;30 个循环;最后 72℃ 终延伸 10 min;PCR 产物经割胶回收纯化后,送上海生工生物工程股份有限公司测序。

将分离菌 16S rRNA 测序结果与 GenBank 中相关序列进行同源性分析,并选择 RefSeq Representative Genome Database 对 HNE1 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析,并收集生成的菌株基因组信息,然后采用 MAGA7.0.18 软件,通过 Neighbor-Joining 方法,构建 HNE1 进化树。

1.6 人工感染试验 将纯化菌株 HNE1 接种于营养琼脂斜面,37℃ 恒温培养 20~24 h,灭菌生理盐水洗下菌苔,用菌落计数法测定菌悬液浓度,用生理盐水将菌悬液 10 倍稀释调整其浓度至 $1.6\times 10^8\sim 1.6\times 10^3\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,取各稀释度腹腔注射 NIH 小鼠,剂量为每只 0.2 mL,每组 10 只小鼠,对照组每只腹腔注射 0.2 mL 的生理盐水。观察 7 d,采集死亡小鼠肝脏、心血等病料对病原细菌进行再次分离,同时进行染色和形态观察及生理生化特性测定,并采用改良寇氏法计算其半数致死量^[6]。

1.7 药物敏感试验 采用改良 Kirby-Bauer 法^[7]对纯化的 HNE1 株细菌进行药物敏感试验,对照杭州天和微生物试剂有限公司《药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准》判定该菌的抗菌药物敏感程度。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离及形态观察 将死亡鳄鱼进行病理剖检,从肝组织病料中,分离纯化获得 1 株优势菌 HNE1,在血平板培养基上呈 β 溶血,TSA 琼脂培养基上形成圆形菌落、表面光滑湿润、边缘整齐、中央隆起、灰白色、不透明;革兰染色检查见革兰阴性杆菌,菌体短小,多为单个排列,无芽孢,无荚膜。病变组织滤液接种 NIH 小鼠,未发现发病死亡现象。

2.2 病原菌的生理生化测定 分离菌株 HNE1 的生理生化测定结果见表 1,参照文献 [3-5] 的标准,其生理生化特性与嗜水气单胞菌基本一致,依据其能发酵阿拉伯糖和蔗糖并水解七叶苷,可初步确定 HNE1 为嗜水气单胞菌嗜水气亚种。

2.3 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建 分离菌株 HNE1 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增后获得的片段为 1 495 bp,与预期大小一致(图 1)。选择 RefSeq Representative Genome Database 对 HNE1 16S rRNA 基因序列进化 BLAST 分析,并收集生成的菌株基因组信息,然后采用 MAGA7.0.18 软件,通过 Neighbor-Joining 方法,构建 HNE1 进化树(图 2)。菌株 HNE1 在系统发育树中与 *Aeromonas hydrophila* 嗜水气单胞菌位于同一进化分支。经 Mega7.0.18 软件计算,分离菌株 HNE1 的模式菌株 ATCC7966(嗜水气单胞菌嗜水气亚种 *Aeromonas hydrophila* spp. *hydrophila*) 同源性为 99.9%。

表 1 分离菌株 HNE1 的生化试验结果

Tab. 1 Main biochemical characteristics of the isolate HNE1

测定项目	结果	测定项目	结果
Items	Results	Items	Results
氧化酶 Oxidase	+	D - 半乳糖 D-galactose	+
接触酶 Catalase	+	蔗糖 Sucrose	+
O/F	发酵型	甘露醇 Mannitol	+
吲哚试验 Indole test	+	阿拉伯糖 Arabinose	+
甲基红 M. R Methyl red	+	乳糖 Lactose	+
V-P	-	D - 山梨醇 D-sorbitol	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	棉子糖	-
精氨酸双水解酶 Aginine dehydrolase	+	蜜二糖 Melibiose	+
液化明胶 Liquefied gelatin	+	半乳糖 Galactose	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	葡萄糖 Glucose	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	水杨苷 Salicin	+
麦芽糖 Maltose	+	七叶苷 Esculin hydrate	+

因此 结合菌株的表型特征、生理生化特性鉴定与 16S rRNA 序列分析 ,可以认定菌株 HNE1 为嗜水气单胞菌嗜水气亚种(*Aeromonas hydrophila* spp. *hydrophila*)。

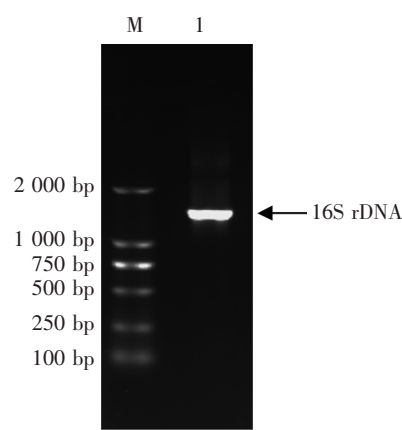


图 1 分离株 HNE1 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of 16S rRNA gene fragments from isolate HNE1

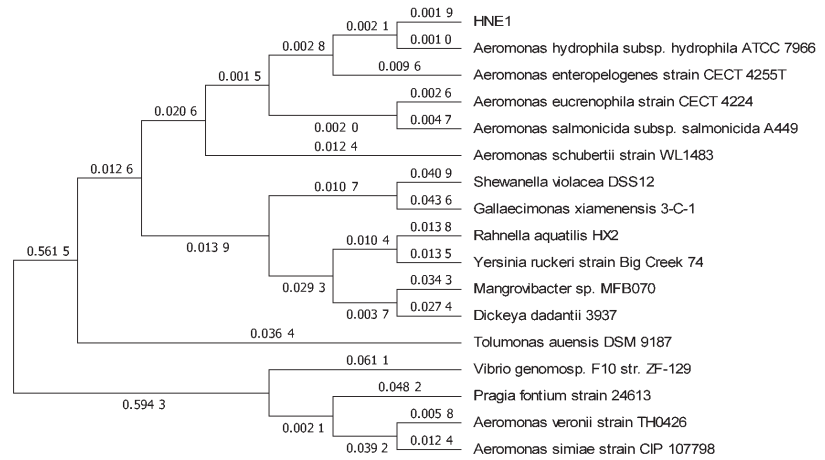


图 2 依据菌株 HNE1 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence of HNE1

2.4 致病性试验 分离的 HNE1 菌株接种 NIH 小鼠多在 24 ~ 48 h 内死亡 ,对 NIH 小白鼠有较强的致病性 ,解剖可见肝脏和肺充血、出血 ,心包积多量液体 ,肾脏充血肿大 ,从死亡小鼠中进行病原再次分离培养 ,可分离到病原菌 ,经形态和生理生化特征鉴定与 HNE1 株特征一致。采用改良寇氏法计算 ,分离菌株 HNE1 对 NIH 小白鼠的 LD_{50} 为 2.5×10^5 cfu/只 (表 2)。

2.5 药敏试验结果 从表 3 可知 ,分离菌 HNE1 对丁胺卡那霉素、环丙沙星、对氟苯尼考、庆大霉素、氧氟沙星、多粘菌素、新霉素、头孢哌酮和左氧沙星等 13 种抗生素敏感 ;对卡那霉素、罗红霉素、氟哌酸、四环素和利福平等 5 种抗生素中度敏感 ,对红霉素、氨苄青霉素、青霉素、阿莫西林、链霉素、克林霉素和萘啶酸等 9 种抗生素有耐药性。

表 2 分离菌株对小鼠人工感染实验结果

Tab. 2 Results of healthy mice infected with HNE1 strain

组别 Group	菌液浓度/(cfu·mL ⁻¹) Concentration	小鼠数量/只 Number of mice	死亡数/只 Number of the dead	死亡率/% Mortality
1	3.2×10 ⁸	10	10	100
2	3.2×10 ⁷	10	10	100
3	3.2×10 ⁶	10	8	80
4	3.2×10 ⁵	10	6	60
5	3.2×10 ⁴	10	2	20
6	3.2×10 ³	10	0	0
对照组 Control	0	10	0	0

表 3 分离菌株 HNE1D 的药敏试验结果

Tab. 3 Drug susceptibility test of the isolate HNE1

抗菌药物 Antibacterials	抑菌圈直径/ mm Inhibition zone	敏感性 Sensitivity
卡那霉素 Kanamycin	14.6	I
丁胺卡那霉素 Amikacin	19.2	S
红霉素 Erythromycin	9.6	R
罗红霉素 Roxithromycin	12.2	I
环丙沙星 Ciprofloxacin	23.5	S
氟哌酸 Norfloxacin	16.8	I
庆大霉素 Cidomycin	22	S
氨苄青霉素 Ampicillin	9.2	R
青霉素 G Penicillin	8.4	R
氧氟沙星 Ofloxacin	16.4	S
多粘菌素 Polymyxin	20	S
四环素 Tetracycline	14.6	I
阿莫西林 amoxicillin	7	R
链霉素 Streptomycin	9.4	R
新霉素 Novomycin	20.4	S
壮观霉素 Spectinomycin	19.6	S
复方新诺明 Selectrin	20.5	S
头孢哌酮 Cefoperazone	22.4	S
头孢氨苄 Cefalexin	16.2	S
头孢拉定 Cefradine	8.6	R
氟苯尼考 Florfenicol	26.2	S
妥布霉素 Tobramycin	20.6	S
克林霉素 Clindamycin	8.6	R
氯霉素 Chloromycin	9.2	R
左氟沙星 Levofloxacin	25.6	S
利福平 Rifampicin	15	I
萘啶酸 Nalidixic acid	8.4	R

R: 耐药 (10 mm > 抑菌圈直径 ≥ 0 mm) ; I: 中度敏感 (15 mm ≥ 抑菌圈直径 ≥ 10 mm) ; S: 敏感 (抑菌圈直径 > 15 mm)

R: Resistant (10 mm > zone diameter ≥ 0 mm) ; I: intermediately sensitive (15 mm ≥ zone diameter ≥ 10 mm) ; S: Sensitive (Zone diameter > 15 mm)

3 讨 论

嗜水气单胞菌属于弧菌科,气单胞菌属,革兰阴性,多为单个存在,少数双个排列,通常菌体有单鞭毛,个别种长有周鞭毛,兼性厌氧,氧化酶阳性,无荚膜,不形成芽孢,最适生长温度 22~35℃,分布于淡水、污水、淤泥以及土壤中。嗜水气单胞菌有广泛的致病性,能感染多种水生动物、爬行类、两栖类、鸟类及人类,导致败血症或溃疡等局部感染^[8-9],是鱼类最常见的致病菌,常引起淡水养殖鱼类爆发性传染病,给水产养殖业带来了巨大经济损失^[10-13]。鳄鱼在国内人工养殖时间不长,鳄鱼病害罕见报道,周煜华^[14]从病死的入境鳄鱼中,分离出 1 株温和气单胞菌;何成伟^[15]对养殖鳄鱼“皮肤红点病”的病原进行分离,获得 1 株嗜水气单胞菌,1 株豚鼠气单胞菌和 3 株温和气单胞菌,经人工感染试验,显示很强致病性。笔者从幼龄鳄鱼分离到的 1 株嗜水气单胞菌,同样具有很强的致病性,表明气单胞菌属的嗜水气单胞菌等能引起鳄鱼严重感染,应引起鳄鱼养殖业重视。

细菌的鉴定主要采用形态生化特性鉴定和分子遗传学鉴定,形态生化特性鉴定是最常用的分类鉴定方法,主要根据 Garrity 等^[4]编写的《系统细菌学手册》等进行鉴定,但存在耗时长、工作量大、敏感度低、技术及经验要求高等缺点。细菌 16S rRNA 基因因其高度保守性,被认为最适合细菌分类及鉴定^[16],但对亲缘关系比较近的属内的种之间的分辨率不高,还需 DNA-DNA 杂交等试验来确定种间差异。本实验采用生理生化特性测定与 16S rRNA 基因序列的测定分析方法进行细菌分类鉴定,两者相互印证,从而确认引起鳄鱼患病的病原菌为嗜水气单胞菌嗜水亚种。

药敏试验结果表明,分离菌 HNE1 对环丙沙星、氟苯尼考和多粘菌素等 13 种抗生素药物敏感,但对红霉素、氨苄青霉素、青霉素、阿莫西林、链霉素、克林霉素和萘啶酸等 9 种抗生素产生耐药。水产养殖生产中抗生素的使用是预防病原菌感染的经济实用方式,然而抗生素的广泛使用甚至滥用会导致药物残留、养殖环境污染及细菌耐药性等问题的出现,将给养殖业造成了严重危害。因此,在水产养殖过程选用药物时,应结合药敏试验,针对性地选择敏感性抗菌药物以及交替使用不同类别的抗生素药物,尽量避免病原细菌快速产生耐药性。

参考文献:

- [1] 李海航,罗嘉玲,倪贺. 鳄鱼资源开发和生物活性物质研究进展 [J]. 华南师范大学学报(自然科学版) 2014, 46(3): 10-17.
- [2] 周敏. 鳄鱼养殖与经营利用产业在我国的发展研究 [J]. 福建林业科技 2002, 29(3): 92-95.
- [3] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京:科学出版社 2001:106-120.
- [4] Garrity G, Brenner D J, Krieg N R. Manual of systematic bacteriology [M]. 2nd. New York: Springer, 2005:557-578.
- [5] Abbott S L, Cheung W K W, Janda J M. The genus *Aeromonas* biochemical characteristics, atypical reaction, and phenotypic identification schemes [J]. JCM. 2003, 41 (6): 2348-2357.
- [6] 孙瑞元. 简捷实用的半数致死量综合算法 [J]. 药学报 1963, 10(2): 65-74.
- [7] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程 [M]. 2 版. 南京:东南大学出版社, 1997:553-562.
- [8] Cahill M M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1990, 69(1): 1-16.
- [9] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clin Microbiol Rev., 2010, 23 (1): 35-73.
- [10] 吴倩,闫芳,刘风波. 嗜水气单胞菌的研究进展 [J]. 畜禽业 2010(2): 28-31.
- [11] 陈怀青,陆承平. 家养鲤科鱼爆发性传染病的病原研究 [J]. 南京农业大学学报, 1991(4): 87-91.
- [12] 曹青,张向阳,庞茂达,等. 南京地区某渔场嗜水气单胞菌流行菌株的鉴定及分子分型 [J]. 水产学报, 2017, 41(1): 134-140.
- [13] 龙苏,韩书煜,牛志伟,等. 胡子鲶致病性气单胞菌的分离鉴定及其致病力与毒力基因型相关性 [J]. 水产学报 2016, 40 (3): 308-317.
- [14] 周煜华,陈武恒,何成伟,等. 进境柬埔寨暹罗鳄温和气单胞菌疫病诊断及防治 [J]. 广西畜牧兽医 2003, 19 (2): 82-84.
- [15] 何成伟,唐慧英,陆云高,等. 暹罗鳄鱼“皮肤红点病”的病原分离与鉴定 [J]. 中国兽医科技 2004, 34 (7): 72-73.
- [16] 陈文新. 细菌系统发育 [J]. 微生物学报, 1998, 38(3): 240-243.

Isolation and Identification of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* spp. *hydrophila* from *Crocodylus siamensis*

ZENG Jifeng ,PU Wenyan ,GUO Guiying ,YANG Nuo ,HOU Guofeng ,ZHENG Jiping

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: A dominant bacterial strain isolated from the lesion tissues of the inspected dead *Crocodylus siamensis* in Lingshui , Hainan Province was identified via morphological observation , and physiological and biochemical test. The results showed that this isolated strain was gram-negative and was almost identical in characteristics to *Aeromonas hydrophila*. The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences further indicated that the isolate was clustered in the genus *Aeromonas* , with its sequence having the maximum similarity (99.9%) with that of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila*. The artificial infection test showed that the isolate was highly morbidogenic to NIH mice with the half median lethal dose of 2.5×10^5 cfu $\cdot$ mL⁻¹. The sensitivity tests of this isolate with 27 antibiotics demonstrated that the isolate was sensitive to 13 antibiotics , such as amikacin , ciprofloxacin , cefoperazone , etc , and resistant to 9 antibiotics such as erythromycin , ampicillin , streptomycin etc.

Keywords: *Aeromonas hydrophila* spp. *hydrophila*; *Crocodylus siamensis*; identification; drug sensitivity test

(责任编辑: 潘学锋)