



患病泥鳅病原菌的分离及鉴定

卢艳敏, 林红军, 刘海鹏

(衡水学院 生命科学学院, 河北 衡水 053000)

摘要:为促进泥鳅养殖业的健康发展,分别挑选体表具有明显出血症状及体表溃烂症状的患病泥鳅对其进行解剖和观察。分离病原菌并进行纯培养,运用多种方法对病原菌进行鉴定,包括革兰氏染色法、三糖铁琼脂生化实验、PCR的扩增和测序等。结果表明:出血症致病菌为维氏气单胞菌,体表溃烂的致病菌为腐败希瓦氏菌。

关键词:泥鳅;体表出血;体表溃烂;病原菌;鉴定

泥鳅是一种杂食性小型鱼类,广泛分布于中国各地淡水水域中,由于味道鲜美,营养丰富,蛋白质含量高而脂肪含量低,且具有滋补药用功能,深受广大消费者的喜爱,市场需求不断增大,现已成为我国淡水养殖的主要品种之一^[1]。泥鳅繁殖能力强,饲料来源广,对水质要求较低,适应环境的能力很强,可以生存在各类水域,管理方便,养殖户往往用少量的投资就能获得较高的收益,所以泥鳅的养殖行业近几年发展非常迅速^[2]。

但随着泥鳅养殖规模的不断扩大,养殖密度过大,饲养管理不当,药物滥用,水体环境恶化等多种原因导致泥鳅发病率逐年增高,严重降低了泥鳅的成活率,使泥鳅产量不稳定,给养殖户带来了巨大的经济损失^[3]。在各种疾病之中最为常见的就是泥鳅在生长过程中发生的皮肤溃烂及体表出血,轻则导致泥鳅生长缓慢,个别死亡,重则传染整个养殖区域,造成了巨大的经济损失,严重影响了泥鳅产业的可持续性发展。

目前对泥鳅常见疾病的病原学研究相对薄弱,因此本研究对皮肤腐烂及体表出血泥鳅的病变部位进行了病原菌的分离与鉴定,对病原菌的生物学特性进行了初步研究,确定病原,为预防和治疗泥鳅皮肤溃烂及出血症提供理论依据,进而促进泥鳅养殖业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用泥鳅从众达养殖专业合作社获取。

LB培养基:酵母提取物 10 g;胰蛋白胨 5 g;

NaCl 10 g;Agar(琼脂) 15 g;蒸馏水 1 000 mL。三糖铁琼脂培养基:三糖铁琼脂培养基 63.5 g;蒸馏水 1 000 mL。碘液:碘 1 g,碘化钾 2 g,蒸馏水 300 mL。结晶紫染液:结晶紫 2 g,草酸铵 0.8 g,95%酒精 20 mL,蒸馏水 80 mL。番红染液:沙黄 0.25 g,95%乙醇 10 mL,蒸馏水定容至 100 mL。

供试试剂 dNTP、rTaq 购自上海生工生物工程有限公司,DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 泥鳅的解剖与观察 观察泥鳅的外部及内部器官的病变情况,拍照。

1.2.2 病原菌分离与纯培养 取患病泥鳅的病灶部位,划线接种于普通营养琼脂进行培养(37℃,12~24 h),做细菌分离;选取每种单菌落,分别移接于普通营养琼脂培养基斜面,纯培养(28℃,24 h)供鉴定用^[4]。

1.2.3 细菌的革兰氏染色及形态观察 在超净工作台中,将一滴生理盐水滴在干净的载玻片中央,向水滴中加入纯培养病原菌菌落少许,并涂布均匀,尽量涂开、涂薄,自然干燥;然后手持载玻片一端,使涂菌面向上,在酒精灯上方快速的来回几次;用结晶紫染液染色 2 min 后,用细流水冲洗,滴加少许碘液,静置 2 min 后再次用细流水冲洗,并用滤纸吸干载玻片上的残水;在白色背景下,加 95%的乙醇进行脱色,倾斜载玻片,使乙醇流出,当流出的乙醇无色时,立即水洗;最后用番红染液染色 2 min,用细流水冲洗后晾干^[5]。镜检时按照从低倍镜到高倍镜再到油镜的顺序观察。

1.2.4 三糖铁琼脂试验 按比例配制三糖铁琼脂培养基,高温灭菌之后,穿刺接种并涂布于表面,37℃培养 18~24 h,观察结果。根据结果判

收稿日期:2018-09-21

基金项目:河北省高等学校科学技术研究资助(ZD2017301)。

第一作者简介:卢艳敏(1977-),女,博士,副教授,从事动物学研究。E-mail:hsxylym@sina.com。

定该菌株有没有利用培养基中的葡萄糖、蔗糖和乳糖,是否产生二氧化碳和酸,若产生了二氧化碳,则二氧化碳就会将培养基推向试管口;如果产生了酸,由于培养基中含有酚红指示剂,产生的酸会使培养基由红色变为黄色;如果生成的是硫化氢,培养基底部就会变成黑色^[6-7]。

1.2.5 PCR 的扩增和测序 采用引物为细菌 16SrRNA 基因的通用引物: 16S27F(AG AGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 16S1492R(GG TTACCTTGTTACGACTT),引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。挑取纯培养菌落进行 PCR,反应体系: ddH₂O 18 μ L;10 \times PCR buffer 2.5 μ L; dNTP 2 μ L; 引物各 1 μ L; rTaq 0.5 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,将含有目的条带的扩增产物送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

2 结果及分析

2.1 泥鳅的解剖与观察

图 1 为正常泥鳅,图 2~4 依次为 1~3 号体表溃烂泥鳅,1 号溃烂泥鳅,观察后发现泥鳅表皮轻微溃烂,体表发红,内脏器官轻微腐烂,并伴有刺鼻气味。2 号溃烂泥鳅腐烂较重,表皮及肌肉溃烂且发红,内脏腐烂并存在积液,有刺鼻气味。3 号溃烂泥鳅,腐烂最为严重且发红,体壁及内脏器官均已经严重腐烂,伴有强烈刺鼻气味。



图 1 正常泥鳅
Fig. 1 Normal loach

从图 1 和图 5~6 比较来看,患病病体的泥鳅躯干部的侧面与腹部变为红色,或出现红色斑点,尾鳍、背鳍、胸鳍表面也出现红色斑点,解剖泥鳅后发现泥鳅的内脏也有明显的出血现象。



图 2 溃烂泥鳅(1号)
Fig. 2 Ulceration loach (No. 1)



图 3 溃烂泥鳅(2号)
Fig. 3 Ulceration loach (No. 2)



图 4 溃烂泥鳅(3号)
Fig. 4 Ulceration loach (No. 3)



图 5 体表出血泥鳅(4号)
Fig. 5 The body surface bleeding loach (No. 4)

2.2 病原菌的分离

图 7 所示分离株形态为圆形、边缘整齐、隆起、表面平滑、不透明的菌落,颜色为淡黄色,无特殊气味,菌落大小为 2 mm 左右。



图 6 体表出血泥鳅解剖(4号)

Fig. 6 Dissection of the body surface bleeding loach (No. 4)



图 9 溃烂泥鳅(2号)

Fig. 9 Ulceration loach(No. 2)



图 7 正常泥鳅

Fig. 7 Normal loach

图 8~10 所示分离株形态为圆形、边缘整齐、隆起、表面平滑、半透明的菌落,颜色为浅黄色,有特殊气味,菌落大小为 2 mm 左右。



图 10 溃烂泥鳅(3号)

Fig. 10 Ulceration loach(No. 3)

图 11~13 所示分离株形态为圆形、边缘整齐、隆起、表面平滑、浅黄色的菌落,有特殊气味,菌落大小为 2 mm 左右。



图 8 溃烂泥鳅(1号)

Fig. 8 Ulceration loach(No. 1)



图 11 出血泥鳅 4-1(肝脏)

Fig. 11 Bleeding loach No. 4-1(liver)



图 12 出血泥鳅 4-2(体腔液)
Fig. 12 Bleeding loach No. 4-2(coelomic fluid)



图 13 出血泥鳅 4-3(皮肤)
Fig. 13 Bleeding loach No. 4-3(skin)

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 细菌的形态观察-革兰氏染色 分离菌株革兰氏染色均为红色,为革兰氏阴性菌,无芽孢,形态为短杆状。

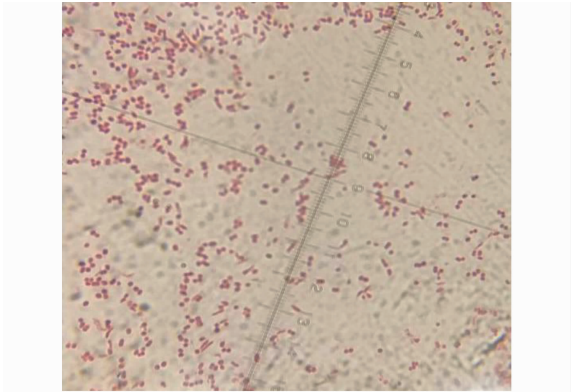


图 14 正常泥鳅
Fig. 14 Normal loach

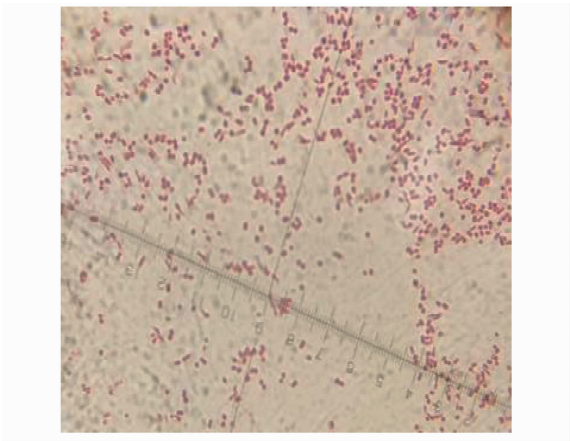


图 15 溃烂泥鳅(1号)
Fig. 15 Ulceration loach(No. 1)

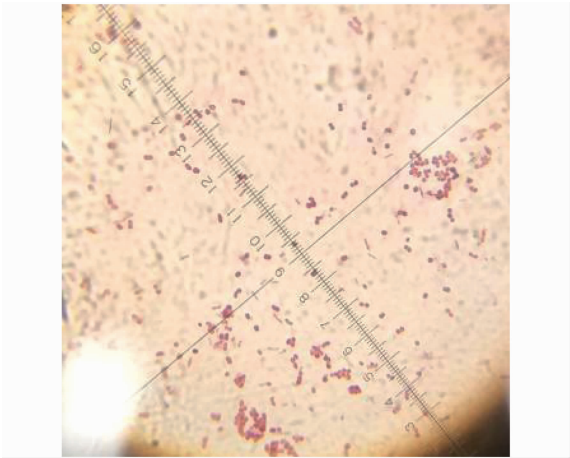


图 16 溃烂泥鳅(2号)
Fig. 16 Ulceration loach(No. 2)

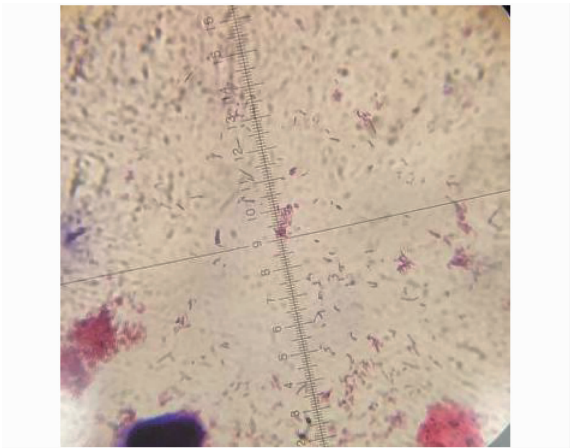


图 17 溃烂泥鳅(3号)
Fig. 17 Ulceration loach(No. 3)

2.3.2 三糖铁琼脂生化试验 从表 1 可以看出,除 4-2 产生了 H_2S , 未产生 CO_2 和酸。其他菌株均产生了 CO_2 和酸,未产生 H_2S 。

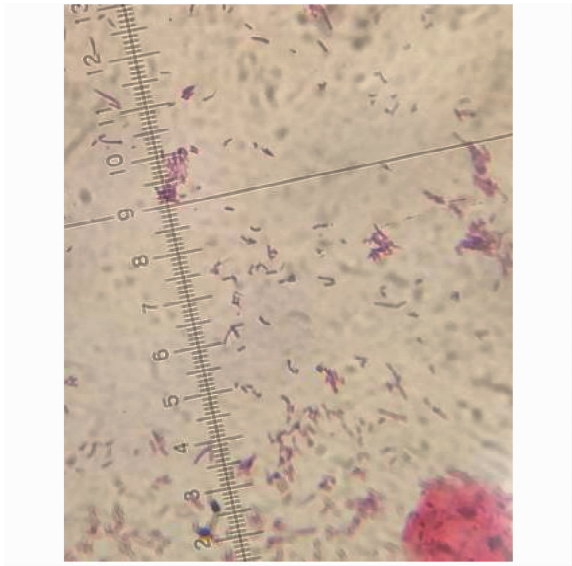


图 18 出血泥鳅 4-1(肝脏)
Fig. 18 Bleeding loach No. 4-1(liver)



图 19 出血泥鳅 4-2(体腔液)
Fig. 19 Bleeding loach No. 4-2(coelomic fluid)

2.3.3 PCR 扩增和测序 扩增得到的片段大小为 1 400 bp 左右的条带,与预期大小一致。

将测序结果在 Genbank 中进行比对,发现 1 号为 *Acinetobacter*(不动菌属),2、4、5 均为 *Shewanella putrefaciens*(腐败希瓦氏菌),7、10 为 *Aeromonas veronii* strain(维氏气单胞菌),其他未测出。

Acinetobacter(不动菌属)为水体常见微生物;*Shewanella putrefaciens*(腐败希瓦氏菌)为泥鳅腐烂的致病菌;*Aeromonas veronii* strain(维氏气单胞菌)为泥鳅出血的致病菌。

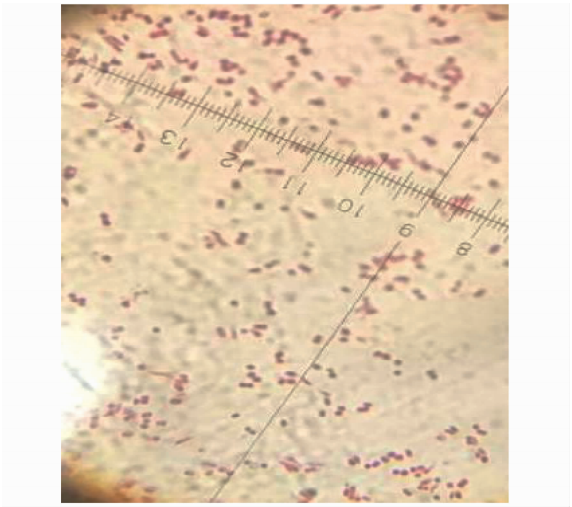
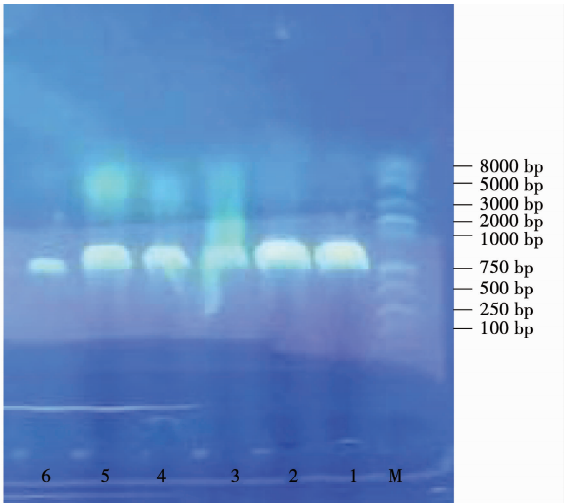


图 20 出血泥鳅 4-3(皮肤)
Fig. 20 Bleeding loach No. 4-3(skin)

表 1 三糖铁琼脂生化试验结果
Table 1 Biochemical test results of iron trisaccharide agar

分离株 Isolate	产酸 Produce acid	产气 Aerogenesis	产 H ₂ S Produce H ₂ S
正常	+	+	-
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4-1	+	+	-
4-2	-	-	+
4-3	+	+	-

“+”为阳性;“-”为阴性。
+ is positive; - is negative.



1:正常泥鳅; 2:溃烂泥鳅; 3、4:溃烂泥鳅2号; 5、6:溃烂泥鳅3号。
1:Normal loach; 2:Ulceration loach; 3,4:Ulceration loach No.2; 5,6: Ulceration loach No.3.

图 21 分离菌株的 PCR 的扩增结果
Fig. 21 PCR amplification of isolated strains

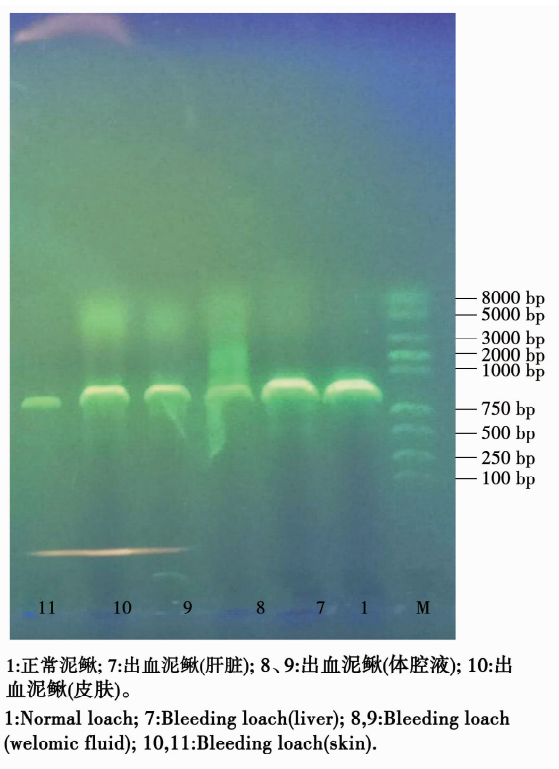


图 22 分离菌株的 PCR 扩增结果
Fig. 22 PCR amplification of isolated strains

3 结论

体表腐烂与出血症是水产养殖过程中常见的病症,有时两者也会同时出现,有关其病因的研究较少,且研究结果不统一^[6-11]。本研究发现,*Shewanella putrefaciens* (腐败希瓦氏菌)为泥鳅腐

烂的致病菌;*Aeromonas veronii* strain(维氏气单胞菌)为泥鳅出血的致病菌。下一步对两种病原菌进行深入研究,为这两类病症的诊断和防治提供理论支撑。

参考文献:

- [1] 潘绪伟,薛学坤,吴琼,等. 连云港市泥鳅产业发展的思考[J],水产养殖,2017(12):25-27.
- [2] 李楠,江森,姜志飞,等. 泥鳅的养殖技术研究进展[J],河北渔业,2016(3):58-60.
- [3] 李濛,柏如发,邓燕飞. 泥鳅养殖病害的综合预防技术[J],水产养殖,2014(5):45-46.
- [4] 仲崇艳. LB 培养基在鱼类致病菌药敏试验中的应用研究[J]. 现代农业科技,2014(13):290-292.
- [5] 林芝源,张一峰,苏应为,等. 革兰氏快速染色法的探讨[J]. 广西预防医学,2000(3):180.
- [6] 何智. 黄鳝出血病病原菌的分离和鉴定和组织病理学观察[D]. 雅安:四川农业大学,2009.
- [7] 王旭. 中国大鲵腐皮病病原学及组织病理学研究[D]. 雅安:四川农业大学,2011.
- [8] 黎炯,叶星,卢迈新. 罗非鱼维氏气单胞菌的分离鉴定和药敏实验[J]. 水生生态学杂志,2011,32(3):132-136.
- [9] 姜娜,马志宏,李铁梁. 锦鲤溃疡病病原菌的分离及 16SrRNA 鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(2):174-177.
- [10] 张晓君,邝旭文,姚东瑞. 泥鳅溃疡病及病原温和气单胞菌生物学及分子特征研究[J]. 水产科学,2010,29(12):696-702.
- [11] 林锋,刘莉,包成荣,等. 患体表出血症的泥鳅病原菌的鉴定与生物特性分析[J]. 安徽农业大学学报,2017,44(3):367-372.

Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria from Diseased Loach

LU Yan-min, LIN Hong-jun, LIU Hai-peng

(Department of Life Sciences, Hengshui College, Hengshui 053000, China)

Abstract: In order to promote the healthy development of loach breeding industry, we selected the diseased loaches with the body surface has obvious bleeding symptoms or the body surface has the symptoms of ulceration for anatomy and physiological observation. The pathogenic bacteria were isolated and purified, various methods were used to identify the pathogens, including Gram staining, three sugar iron agar biochemical experiment, PCR amplification and sequencing. The results showed that the pathogenic bacteria of bleeding symptoms was *Aeromonas veronii*, and the pathogenic bacteria of body surface ulceration was *Shewanella putrefaciens*.

Keywords: loach; body surface bleeding; body surface ulceration; pathogenic bacteria; identification