

草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的 分离、鉴定与理化特性

邓国成¹ 江小燕¹ 叶星^{1*} 刘明智^{1,2} 许淑英¹ 刘礼辉¹ 白岳强¹ 罗霞¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广东 广州 510380)

(2. 上海海洋大学生命科学与技术学院 上海 201306)

摘要: 从患出血病草鱼的肝脏病灶中分离筛选出 2 株致病菌。取病鱼样品组织过滤液接种 CIK 细胞、培养, 电镜下观察到细胞质中含有草鱼呼肠孤病毒样颗粒和包涵体, 病毒颗粒大小 65 nm~70 nm, 包涵体 0.46 μm~1.81 μm。人工回归感染实验显示分离的菌株及细胞毒悬液均能使草鱼致病死亡。对分离菌株进行细胞形态学、理化特性分析及药敏试验, 初步判定所分离的 2 株菌均为嗜水气单胞菌。进一步对菌株进行 DNA 分子鉴定, 结果显示 2 株菌的 16S rRNA 基因、促旋酶亚单位蛋白(*gryB*)基因均与 GenBank 上的嗜水气单胞菌相应的基因具有较高的同源性。在根据已知序列分别构建的 2 个基因的分子系统进化树中 2 株菌均与嗜水气单胞菌聚类。同时 2 个菌株均可扩增到气溶素基因(*aerA*)和丝氨酸蛋白酶基因(*ahpA*), 提示它们均可能为嗜水气单胞菌强毒株。综合人工回归感染实验与毒力基因鉴定结果可认为所分析的草鱼出血病病例存在着病毒与嗜水气单胞菌的混合感染。

关键词: 草鱼, 出血病, 嗜水气单胞菌, 混合感染, 16S 核糖体基因, 促旋酶 B 亚单位蛋白基因, 气溶素基因, 丝氨酸蛋白酶基因

Isolation, Identification and Characterization of *Aeromonas hydrophila* from Hemorrhagic Grass carp

DENG Guo-Cheng¹ JIANG Xiao-Yan¹ YE Xing^{1*} LIU Ming-Zhi^{1,2}
XU Shu-Ying¹ LIU Li-Hui¹ BAI Yue-Qiang¹ LUO Xia¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380, China)

(2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Two strains of infectious bacteria and a GCRV-like virus were isolated from grass carp which seemed to be infected by both virus and bacteria in Guangdong and Fujian provinces. CIK cells were inoculated with tissue fluid filtrated from the diseased fish. GCRV-like virus particles and virus inclusion body were observed in the cytoplasm of the infected cells under electron microscope. Artificial infection experiments showed that healthy grass carp died after infected with both the bacteria strains and

基金项目: 广东省农业领域重点项目(No. 2008A020100016); 广东省海洋渔业科技项目(No. A200899F01); 国家科技基础条件平台建设
项目(No. 2006DKA30470-008)

* 通讯作者: Tel: 86-20-81617091; 邮箱: gzyexing@163.com

收稿日期: 2008-12-03; 接受日期: 2009-02-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

virus-infected cell culture supernatant. Bacteria morphology, characteristics, physiology and biochemistry assays were used to identify the isolated bacteria. The characteristics of the two strains isolated were in accordance with those of *Aeromonas hydrophila*. PCR was performed to identify the bacteria. Both 16S rRNA gene and *gyrB* gene of the two strains possessed high similarity with those of *A. hydrophila* registered in GenBank. *AerA* and *ahpA* genes could be amplified in both strains which indicated that both of them possessed strong pathogenicity. The two strains were therefore identified to be virulent strains of *A. hydrophila*. The diseased grass carp analyzed was supposed to be mixed infected by both *A. hydrophila* and virus.

Keywords: Grass carp, Hemorrhage virus, *Aeromonas hydrophila*, Mixed infection, 16s rRNA, *gyrB*, *aerA*, *ahp*

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的淡水养殖鱼类。其养殖过程极易发生出血病, 可导致草鱼大量死亡, 给草鱼养殖业带来巨大损失。我国在 70 年代开展了病原方面的研究, 1980 年在病鱼的肾组织中发现病毒颗粒, 确认为草鱼出血病病原。1983 年根据病毒形态结构及理化特性将其定名为鱼呼肠孤病毒^[1]。1991 年国际病毒分类委员会将草鱼出血病病毒纳入呼肠孤病毒科中新增的水生呼肠孤病毒属, 并将其命名为草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)^[2]。目前除草鱼呼肠孤病毒感染草鱼引起出血病外, 未见有病毒和细菌混合感染的报导。在广东、福建等省草鱼主养区常通过注射组织浆灭活疫苗、细胞活疫苗或灭活疫苗预防草鱼出血病, 对防治草鱼出血病、提高草鱼的成活率有明显的效果。但最近几年在上述使用疫苗的地方渔农普遍反映, 草鱼出血病比以前严重、防治困难, 以往使用疫苗免疫草鱼后成活率达 70%~80%, 但现在注射疫苗后效果下降, 甚至无效果。针对此问题, 作者到广东、福建等省部分地区进行实地调查, 收集病症为肌肉严重充血, 肠道充血成紫红色、伴有腹水, 眼睛四周充血突出的病鱼进行病原分析, 以便为草鱼的危害防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

取自广东省江门市、福建省龙岩市养殖场的患典型出血病病鱼, 体重 150 g~200 g。症状为口腔、肌肉严重充血, 肠道充血成紫红色并伴有腹水, 眼睛四周充血突出。供感染的试验鱼为本所培育的健康草鱼, 规格 13 g~15 g。

1.2 细菌分离

在广东、福建两省各取 10 尾病鱼, 病鱼样本编

号为 ZC1-1 和 WP1-10。以无菌操作直接从肝脏组织取样进行琼脂平板划线分离, 所用培养基为普通营养琼脂培养基。28°C 恒温培养 24 h, 挑取占优势形态一致的单个菌落进行纯化培养, 纯化后的细菌用作感染和生理生化与分子鉴定。

1.3 人工回归感染实验

1.3.1 细菌感染实验: 离心收集培养 24 h 的菌体, 经 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成细菌悬液。人工注射感染实验设 3×10^9 CFU/mL、 3×10^8 CFU/mL、 3×10^7 CFU/mL 和 3×10^6 CFU/mL 4 个菌液浓度, 腹腔注射健康草鱼。每尾注射 0.2 mL, 每组 20 尾。对照组注射等量无菌生理盐水。

人工浸泡感染实验设 6×10^8 CFU/mL、 6×10^7 CFU/mL 和 6×10^6 CFU/mL 3 个菌液浓度。每组 20 尾, 浸泡 20 min 后移置另一水族箱中饲养。实验期间水温 25°C~28°C, 每天观察及记录实验鱼的症状和死亡情况, 连续观察 7 d。

重复分离和感染实验: 将从上述人工回归感染出现有明显症状的病鱼中再次分离菌株, 进行感染实验, 方法同上。

1.3.2 病毒感染试验: 根据细菌感染实验结果, 取分离到毒力较强的 WP3 菌株的病鱼样本的肝、脾、肾组织, 按 1:10(W/V) 加无血清的 MEM 细胞培养液, 冰浴中匀浆, 经 10000 r/min 离心 30 min, 以无菌操作吸取上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤器过滤, 滤液用无血清的 MEM 培养液以 1:500 的稀释浓度按吸附方法接种 CIK 细胞。28°C 培养 5 d 后收集接毒细胞病毒液, 再用 0.65% 生理盐水稀释 10 倍后注射感染草鱼。每尾注射 0.2 mL, 每组 10 尾鱼, 设重复组。对照组注射生理盐水。

1.4 细菌分类鉴定

1.4.1 常规的生化鉴定: 纯化后的细菌经 28°C 培养

表 1 基因扩增使用的引物及反应条件
Table 1 Primers and reaction conditions for gene amplifications

Gene	引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	PCR 扩增条件 Amplification conditions	GenBank 登录号 GenBank accession No.	
				ZC1	WP3
16S rRNA	F1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	94°C 3 min; 94°C 30 s, 50°C 1 min, 72°C 90 s, 32 个循环; 72°C 10 min	FJ515776	FJ515777
	R1	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA			
<i>gyrB</i>	F2	ACAACCTCTACAAGGTCTCCG	褪火温度为 55°C, 其余同上	FJ608553	FJ608552
	R2	TCAGCAGCAGGGTACGGATGT			
<i>aerA</i>	F3	CCARGGCTGCACA	94°C 5 min; 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, 31 个循环; 72°C 5 min	FJ608557	FJ608556
	R3	TTTCWCCGGTAACAGGATTG			
<i>ahpA</i>	F4	TACGTTCTCTACTCCAG	95°C 5 min; 94°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 35 s, 35 个循环; 72°C 10 min	FJ608555	FJ608554
	R4	CGGTTGTAGCCCATGTCAC			

24 h 作革兰氏染色。生理生化特性测定采用细菌生化微量鉴定管和 ATB Expression 自动细菌鉴定仪 ID 32 E 试剂条进行测定(法国 Bio-merieux 公司), 参考文献[3,4]方法进行鉴定。

细菌形态观察: 取营养肉汤培养 18 h 的菌株, 经 2%磷钨酸负染, 在 PHILIPS CM10 型透射电镜观察菌体形态及大小。

1.4.2 药物敏感性试验: 采用纸片法, 将纯化培养 24 h 的细菌, 均匀涂布于普通营养琼脂平板上, 同时粘帖药敏纸片, 培养 24 h 后观察并记录抑菌圈, 药敏试纸购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.4.3 16S rRNA, *gyrB*, *aerA* 和 *ahpA* 基因的扩增与同源性分析: 将纯化细菌接种于营养肉汤培养基, 摇床 28°C 过夜培养, 4000 r/min 离心 25 min 收集菌体。使用试剂盒 Wizard genomic DNA purification kit (Promega 公司) 并按其操作说明提取细菌基因组 DNA。根据 GenBank 上已知基因的序列保守区设计引物。扩增 16S rRNA 基因使用 F1 和 R1; 扩增 *gyrB* 基因使用引物 F2 和 R2; 扩增气溶素基因 A(*aerA*) 使用引物 F3 和 R3; 扩增 *ahpA* 基因使用引物 F4 和 R4。引物由上海生工生物技术有限公司合成。对照菌为本实验分离、人工感染不致病的嗜水气单胞菌菌株。

PCR 反应结束后, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测与回收, 并克隆到 T 载体(Promega)中, 挑选重组子送上海英骏公司测序。Vector NTI suite 9.0 软件和 Blast 程序进行序列同源性分析。

1.5 电镜超薄切片观察

收集培养 5 d 的接毒 CIK 细胞, 2000 r/min 离心 15 min, 吸去上清液, 细胞用戊二醛固定、包埋, 超薄切片, 染色后在 PHILIPS CM10 型电子显微镜下进

行观察。

2 结果与分析

2.1 细菌分离与人工回归感染实验

从病鱼样品中各分离出 10 个菌株, 分别进行人工注射感染实验。其中 ZC1 和 WP3 菌株感染浓度为 3×10^9 和 3×10^8 时, 均导致草鱼在 24 h 内 100% 死亡。浸泡感染则在 72 h 内 100% 死亡。主要症状表现为肌肉和内脏充血并糜烂, 有腹水, 肠道严重充血呈紫红色。从感染死亡的草鱼体内再次分离出 2 个菌株 RZC1 和 RWP3 进行感染实验, 均获得与初次分离的菌株相似的感染结果, 空白对照组鱼均健康存活(表 2 和表 3)。

2.2 细胞病毒液感染实验

试验鱼感染细胞毒的第 7 天开始发病, 主要症状为口腔、下颌、鳃盖和鳍条出血, 肌肉和肠道出血, 其症状与自然发病鱼的出血病症状相似, 15 d 内的死亡率为 30%。对照组正常。

2.3 细菌分类鉴定

2.3.1 细菌形态特性: ZC1 和 WP3 菌株在普通营养琼脂平板 28°C 恒温培养 24 h 后菌落均为圆形, 直径为 1.5 mm~3.0 mm, 中央隆起, 表面光滑, 边缘整齐, 半透明, 呈灰白色。在血液琼脂平板上显示 β 溶血圈。经革兰氏染色, 2 株菌株均为阴性。电镜下观察, 菌体大小约为 $(0.4\sim 0.6) \mu\text{m} \times (2.3\sim 2.5) \mu\text{m}$, 两端钝圆, 短杆状, 极端单鞭毛(图 1)。

2.3.2 细菌生理生化特性: 生理生化测定显示, ZC1 和 WP3 两株菌的最适生长温度为 25°C~28°C, 4°C 和 40°C 能生长; 在无 NaCl 的胨水中生长良好; 生长适宜 pH 范围 5.5~10。

表 2 菌株人工注射感染草鱼
Table 2 Grass carp infected by intraperitoneal injection of bacteria

菌株 Strains	项目 Items	菌液感染浓度(CFU/mL) Bacteria concentrations for injection			空白对照 Control
		3×10^8	3×10^7	3×10^6	
		ZC1	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	
	死亡率 Death rate (%)	100	60	20	0
WP3	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	13/20	5/20	0
	死亡率 Death rate (%)	100	65	25	0
RZC1	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	11/20	3/20	0
	死亡率 Death rate (%)	100	55	15	0
RWP3	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	10/20	4/20	0
	死亡率 Death rate (%)	100	50	20	0

表 3 菌株人工浸泡感染草鱼
Table 3 Grass carp infected by bath exposure of bacteria

菌株 Strains	项目 Items	菌液感染浓度(CFU/mL) Bacteria concentrations for injection			空白对照 Control
		6×10^8	6×10^7	6×10^6	
		ZC1	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	
	死亡率 Death rate (%)	100	95	40	0
WP3	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	18/20	7/20	0
	死亡率 Death rate (%)	100	90	35	0
RZC1	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	19/20	9/20	0
	死亡率 Death rate (%)	100	95	45	0
RWP3	死亡数/总数(尾) Number of infected fish died/ fish tested	20/20	18/20	6/20	0
	死亡率 Death rate (%)	100	90	30	0

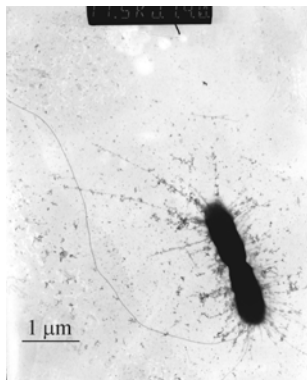


图 1 正在分裂的细菌(ZC1 株) (×11500)

Fig. 1 Cell division of the bacteria strain ZC1 (×11500)

两株菌均为氧化酶、精氨酸双水解酶和赖氨酸脱

羧酶阳性; 鸟氨酸脱羧酶阴性; 阿拉伯糖、蔗糖、水杨苷和 V.P 阳性; 葡萄糖产酸产气; 弧菌抑制剂 O/129 不敏感(表 4)。根据伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)^[3], 判定 ZC1 和 WP3 属弧菌科(Vibrionaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*)的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

2.3.3 细菌药敏试验: 2 个菌株对喹诺酮类药物(环丙沙星、诺氟沙星和氧氟沙星等)高度敏感, 对氨基糖苷类抗生素(链霉素、新霉素和壮观霉素等)敏感, 对青霉素类抗生素(青霉素 G、阿莫西林和羧苄青霉素等)不敏感(表 5)。

2.3.4 基因克隆与序列同源性分析: ZC1 和 WP3 菌株间基因序列具有很高同源性, 16S rRNA 基因、促旋

表4 两菌株的生理生化特性
Table 4 Physiology and biochemistry features of ZC1 and WP3

鉴定项目 Identified items	ZC1	WP3	<i>A. hydrophila</i>	鉴定项目 Identified items	ZC1	WP3	<i>A. hydrophila</i>
葡萄糖产酸 Glucose, acid	+	+	+	氧化酶 Oxidase	+	+	+
葡萄糖产气 Glucose, gas	+	+	+	西蒙氏枸橼酸盐 Citrate, Simmons	-	-	d
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-	甘露醇 Mannitol	-	-	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	+	D-阿拉伯糖醇 D-Arabitol	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+	d	肌醇 Myoinositol	-	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+	+	侧金盏花醇 Adonitol	-	-	-
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	+	+	水杨苷 Salicin	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	-	-	+	七叶苷 Esculin hydrolysis	+	+	+
海藻糖 Trehalose	+	+	+	V.P Voges-Proskauer	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	M.R Methyl red	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	吲哚产生 Indole production	+	-	+
O/129 Sensitivity	-	-	-	溶血 Hemolysis			

注：“+”：阳性反应；“-”：阴性反应；“d”：种间存在差异；“-”：-溶血。

Note: “+”: Positive control; “-”: Negative control; “d”: Significant difference; “-”: Refers to -hly.

表5 两菌株的药敏试验结果
Table 5 Sensitivity of the two strains to antibacterial agents

抗菌药物 Antibacterial agents	含药量(μg/片) Content (μg/disc)	抑菌圈(mm)		抗菌药物 Antibacterial agents	含药量(μg/片) Content (μg/disc)	抑菌圈(mm)	
		ZC1	WP3			ZC1	WP3
苯唑青霉素 Oxacillin	1	0	0	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	36	36
羧苄青霉素 Carbenicillin	100	0	0	罗美沙星 Lomefloxacin	10	34	32
氨苄青霉素 Ampicillinum	10	0	0	诺氟沙星 Norfloxacin	10	36	33
青霉素 G Penicillin G	10	0	0	恩诺沙星 Baytril	5	36	32
哌拉西林 Piperacillin	100	18	0	氧氟沙星 Ofloxacin	5	40	38
阿莫西林 Amoxicillin	10	8	0	依诺沙星 Enoxacin	10	28	34
先锋 V Cefazolinum naticum	30	9	0	氟罗沙星 Fleroxacin	10	34	34
先锋必 Cefoperazone	75	30	28	萘啶酸 Nalidixic acid	30	32	38
链霉素 Streptomycini	10	22	24	麦迪霉素 Midecamycin	15	22	0
新霉素 Neomycin	10	24	22	罗红霉素 Roxithromycin	15	21	17
庆大霉素 Gentamicin	10	26	16	阿米卡星 Amikacin	30	22	25
妥布霉素 Tobramycin	10	20	20	菌必治 Ceftriaxone	30	32	32
壮观霉素 Spectinomycin	100	28	30	红霉素 Erythromycin	15	20	21
四环素 Teracycline	30	22	24	杆菌肽 Bacitracinum	0.04	0	0
林可霉素 Lincomycinum	2	12	0				

酶亚单位蛋白 B(*gyrB*)、气溶素(*aerA*)和丝氨酸蛋白酶(*ahpA*)基因的同源性分别为 99.7%、98.3%、99.3% 和 100%。基因序列均已登录 GenBank(Accession Nos 见表 1)。Blast 分析显示 ZC1 和 WP3 的序列与 GenBank 上登录的嗜水气单胞菌相应基因均有很高的同源性。两菌株的 16S rRNA 基因与已知嗜水气单

胞菌的同源性高于 99.5%，与同属的其它种的同源性高于 98.7%，与 *E. coli* 的也高达 89.8%。ZC1、WP3 的 *gyrB* 与已知嗜水气单胞菌的同源性高于 98.1%，与同属不同种的同源性高于 92.1%，与 *E. coli* 的同源性较低，分别为 46.8%和 44.7%。2 菌株均可扩增至 *aerA* 基因和 *ahpA* 基因，*aerA* 基因与嗜水气单胞菌的

同源性高于 93.0%, *ahpA* 基因与嗜水气单胞菌的同源性均高于 94%。对照菌株(非致病菌株)二个基因的扩增均没有特异性条带(图 2)。

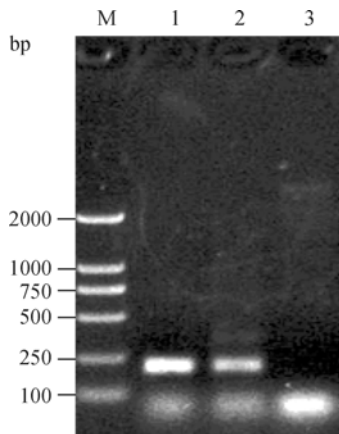


图 2 分离菌株 *aerA* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of *aerA* gene for the isolated bacteria

Note: M: DNA marker; 1~3: Strains of ZC1, WP3 and control strain.

根据两菌株 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列与 GenBank 已登录的其它嗜水气单胞菌序列分别建立系统进化树, 两个菌株均与嗜水气单胞菌聚类。图 3 是根据 *gyrB* 基因序列建立的系统进化树。

2.4 病毒电镜观察

接种 5 d 后细胞质中电镜观察到病毒颗粒和包涵

体。病毒颗粒大小一致, 直径约 65 nm~70 nm。病毒包涵体直径约 0.46 μm ~1.81 μm (图 4)。

3 讨论

本实验从具有典型出血病症状的草鱼体上分离到 2 个具有强致病力的菌株。两株菌的主要生理生化指标均与嗜水气单胞菌的相符, 初步鉴定为弧菌科、气单胞属中的嗜水气单胞菌。本实验进一步采用 DNA 序列分析方法对此两菌株进行鉴定。细菌 16S rRNA 基因具有高度保守性而被广泛地应用于细菌鉴定。但同属不同种间的 16S rRNA 基因通常具有很高的同源性, 因此适用于属及属以上分类单位的亲缘关系鉴定, 对于亲缘关系较近的细菌常因分辨率不够而较难区分^[5]。本实验 16S rRNA 基因的分析结果也出现这种现象: 2 菌株的 16S rRNA 的序列与已知的嗜水气单胞菌的同源性在 99.5% 以上, 但与同属不同种的同源性也高于 98.7%, 因此本实验进一步分析 *gyrB* 基因序列。*gyrB* 是编码 DNA 促旋酶亚单位蛋白的基因之一, 与 16S rRNA 基因相比具有较高的替换率, 且遗传密码子由于兼并性发生的碱基替换通常并不改变编码的氨基酸, 因此适合亲缘关系较近的菌种的鉴别^[6,7,8]。两菌株的 *gyrB* 基因序列与已知的嗜水气单胞菌的同源性达 98.1% 以上, 与同属不同种

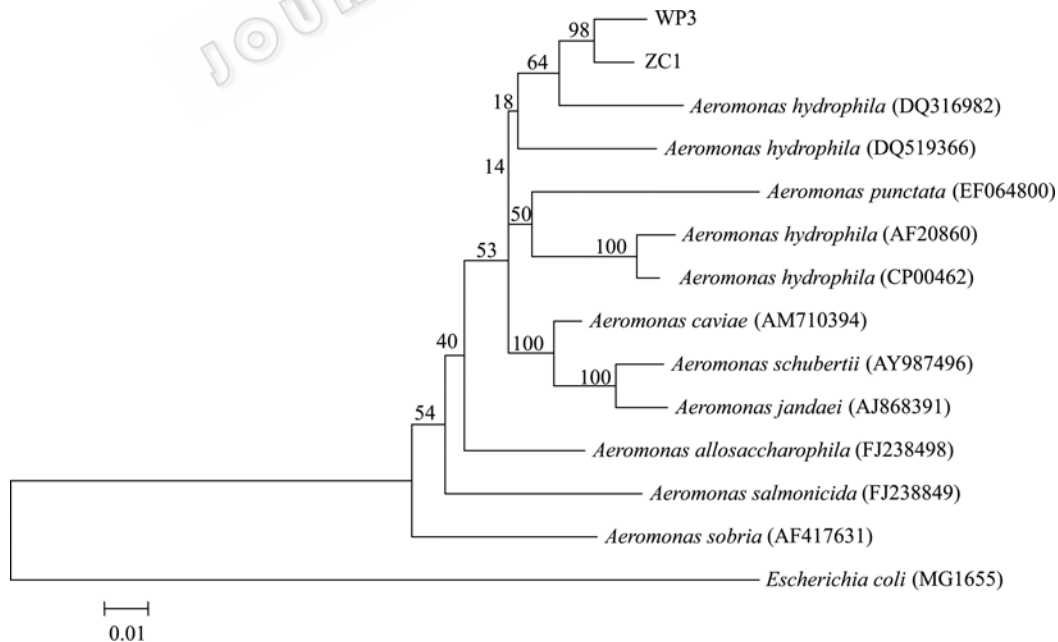


图 3 根据细菌 *gyrB* 基因序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on sequences of *gyrB* genes

注: 括号内的数字为 GenBank 序列号; 结点处数字为 bootstrap 值。

Notes: Numbers in parenthesis represented GenBank accession nos; Numbers at the branch points indicated the Bootstrap values.

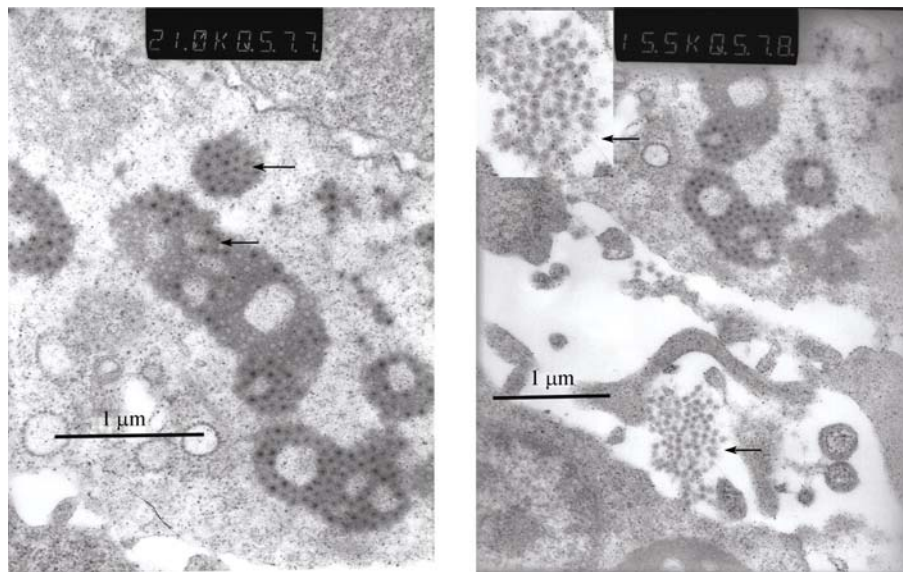


图 4 感染细胞的细胞质中的病毒包涵体和病毒颗粒

Fig. 4 Virus particles and virus inclusions in the cytoplasm of the infected cells

注: 箭头示病毒包涵体(左图)和病毒颗粒(右图)。

Note: Arrows indicated the virus inclusions (left) and virus particles (right).

的则低于 92.7%, 显示出较高的分辨率。结合生化特性的分析与 16s rRNA 和 *gyrB* 基因序列分析, 可判定所分离的两菌株均为嗜水气单胞菌。

嗜水气单胞菌有致病菌株和非致病菌株之分, 而嗜水气单胞菌的致病性与胞外产物密切相关^[9,10]。嗜水气单胞菌分泌的胞外产物有多种, 其中气溶素、溶血素和蛋白酶是嗜水气单胞菌的重要致病因子, 与致病性相关^[11,12,13]。Gonzalez-Serrano 等对多株分离自淡水鱼和一株分离自腹泻病人的嗜水气单胞菌以及 3 株维隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)进行蛋白酶活性、溶血活性、细胞毒活性和肠毒活性毒力因子的检测, 并结合 *aerA* 和 *hlyA* 基因的 PCR 扩增, 结果发现所检测的 12 株嗜水气单胞菌均有 *aerA*, 大部分都有 *hly* 基因(10/12); 所有检测菌株对鲤细胞均具有细胞毒活性, 提示它们可能是的鱼致病菌^[14]。饶静静等在嗜水气单胞菌的非致病性分离株中均未扩增到毒力基因 *aerA* 和 *hlyA*, 在致病性分离株则至少扩增到 *aerA* 或 *hlyA* 基因的一种^[15]。朱大玲等的研究则显示大部分嗜水气单胞菌菌株均可检测到 *hlyA* 基因, 但该基因与致病力并没有相关关系, 而 *ahpA* 阳性的菌株皆为有毒株, 认为该基因的存在与毒株的毒力相关, 且 *aerA*+ *ahpA*+ 基因型的菌株可能是强毒株^[16]。王远微等检测嗜水气单胞菌的 *aerA* 和 *ahpA* 基因, 发现只有致病性嗜水气单胞菌呈阳性扩增^[17]。本实验选择了 *aerA* 和 *ahpA* 两个毒力相

关基因对分离到的两菌株进行检测, 结果显示两个菌株均可扩增到此两个基因。由于细菌人工回归感染实验证实此两个菌株均具有强致病力, 且在血液琼脂平板上均能形成产毒菌株所具有的 β 溶血圈, 因此可判定此两菌株均为嗜水气单胞菌致病菌株。至于两菌株基因序列间存在的差异可能与菌株分别分离至广东和福建不同地区、存在不同的分型有关。

嗜水气单胞菌对淡水鱼类有广泛的致病性, 且近年来由嗜水气单胞菌引发的淡水鱼暴发性出血病有增多的趋势。除感染草鱼外, 嗜水气单胞菌也可感染其它养殖鱼类, 如鳙(*Aristichthys nobilis*)、白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、白鲫(*Carassius auratus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲟(*Acipenser baerii*)等^[18-21]。贺路等对湖北沙市地区池坊养殖鱼类暴发性传染病病原进行研究, 用分离到的嗜水气单胞菌感染草鱼证实其具有相当强的毒力^[22]; 何利君也曾报导嗜水气单胞菌感染草鱼引起草鱼暴发性出血病并大量死亡^[23]。但上述草鱼细菌感染病例中未有混合感染病毒的描述。本研究从福建收集的 WP3 样品中, 观察到接毒的 CIK 细胞质中含有病毒颗粒和包涵体, 健康草鱼感染细胞毒后出现死亡, 且症状与自然发病的草鱼病毒性出血病相似。综合本实验的研究结果可认为所检测的草鱼病鱼样品中存在病毒和嗜水气单胞菌的合并感染。从病毒的形态、颗粒大小以及细胞毒悬液

人工回归感染出现的出血病相似病症, 初步认为样品中的病毒为呼肠孤病毒。最近已克隆到该病毒两个基因的部分片段, Blast 显示分别与 GenBank 上的草鱼呼肠孤病毒的 RNA 聚合酶和鸟苷酸基/甲基转移酶基因具有一定的同源性, 可确认为草鱼呼肠孤病毒。鉴于养殖草鱼可能存在病毒和细菌合并感染的情况, 建议在开春放养鱼种时注射含有草鱼出血病病毒和嗜水气单胞菌的二联疫苗, 同时养殖过程应加强对水质的管理调控, 发病季节定期对养殖水体进行消毒以达到较好的预防效果。

参 考 文 献

- [1] 陈燕新, 江育林. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究. 科学通报, 1983, 28: 1138-1140.
- [2] Franki RIB, Fanquet CM, Knudson DL, et al. Classification and nomenclature of virus. Fifth report of the international committee on taxonomy of virus. Arch Virol, 1991(Suppl), 2: 186-192.
- [3] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, p.195-256.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, p.353-398.
- [5] Stackbrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: A willey-interscience publication, 1991, p.115-175.
- [6] Young JP, Downer HL, Eardly BD. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. J Bacteriol, 1991, 173(7): 2271-2277.
- [7] Kupfer M, Kuhnert P, Korczak B M, et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(12): 2743-2751.
- [8] 李献梅, 王小芬, 杨红岩, 等. 促旋酶(*gyrB*)B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706.
- [9] Pollard DR, Johnson, WM, Lior H, et al. Detection of the aerolysin Gene in *Aeromonas hydrophila* by PCR. Clinical Microbiology, 1990, 28(11): 2477-2481.
- [10] 林天龙, 陈日升, 董传甫, 等. 欧鳊嗜水气单胞菌的分离、鉴定和特性分析. 福建农业学报, 2001, 16(4): 35-40.
- [11] Buchley JT, Howerd SP. The Cytotoxic Entenotoxin of *Aeromonas hydrophila* is Aerolysin. Infect and human, 1999, 6(1): 466-467.
- [12] Chopra AK, Houston CW, Peterson JW, et al. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolitic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. Can J Microbiol, 1993, 39(5): 513-523.
- [13] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌 J-1 株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析. 水产学报, 2004, 28(1): 84-88.
- [14] Gonzalez-Serrano CJ, Santos JA, Garcia-Lopez ML, et al. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar sobria isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. J Applied Microbiology, 2002, 93: 414-419.
- [15] 饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立. 中国水产科学, 2007, 14(5): 749-755.
- [16] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性. 中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82-85.
- [17] 王远徵, 汤 承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌. 微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.
- [18] 张晓君, 陈翠珍, 房 海. 草鱼肠炎嗜水气单胞菌分离株的主要特性及系统发育学分析. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(4): 334-337.
- [19] 陆承平. 兽医微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2007, 4: 127-131.
- [20] 沈锦玉, 陈月英, 沈智华, 等. 浙江养殖鱼类暴发性流行病原的研究: I 嗜水气单胞菌的分离、致病性及生理生化特性. 科学通报, 1993, 9(6): 397-401.
- [21] 李圆圆, 曹海鹏, 何 珊, 等. 鲟源致病性嗜水气单胞菌 X1 的分离、鉴定与药敏特性研究. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1186-1191.
- [22] 贺 路, 左文功, 蔡传奇, 等. 沙市地区暴发性传染病病原的研究. 淡水渔业, 1992, 3: 13-16.
- [23] 何利君. 草鱼暴发性出血病病因的研究. 四川畜牧兽医学院学报, 2001, 15(1): 27-30.