

奥尼罗非鱼无乳链球菌的鉴定、致病性及药物敏感性研究*

谭晶晶 陈昌福** 高宇 刘振兴 王美珍 李革雷

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 从海南省某水产养殖场患病奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*)中, 分离到1个编号为LFY-08-23的菌株。经过对分离菌株进行生理生化特性鉴定、Biolog系统鉴定以及利用原核生物16S rRNA基因通用引物进行16S rRNA基因的克隆及序列分析, 结果发现LFY-08-23菌株与无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的生理生化特性相似, 16S rRNA基因克隆及序列分析结果与*S. agalactiae* (EF092913, DQ303183, AF459432)自然构成一个分支, 相似性高达99.8%。用分离的*S. agalactiae* LFY-08-23菌株对异育银鲫和斑点叉尾鲴进行人工感染试验, 结果表明, 当注射菌浓度达到 1.0×10^9 cfu/mL时, 2种鱼全部死亡。*S. agalactiae* LFY-08-23菌株对头孢氨噻肟、丙氟哌酸、利福平等13种药物高度敏感, 对呋喃妥因、新生霉素、强力霉素等7种药物中度敏感, 对卡那霉素、链霉素、磺胺异恶唑等5种药物不敏感。

关键词 奥尼罗非鱼; 无乳链球菌; 鉴定; 系统发育分析; 人工感染; 药物敏感

中图分类号 R 378.1⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0745-07

近年来, 随着罗非鱼养殖规模逐渐扩大, 各种传染性疾病的发生与危害也呈现上升的趋势, 尤其是链球菌病(*Streptococcosis*)的大范围流行, 对罗非鱼的养殖造成了严重威胁^[1-2]。迄今为止的研究结果证明, 导致罗非鱼链球菌病的病原菌有所不同, 但是, 主要致病菌是无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和海豚链球菌(*S. iniae*), 2种致病菌所致疾病的共同症状是病鱼出现败血症、脑脊膜炎等, 并且根据菌落、菌体形态很难辨别这2种致病菌^[3]。笔者采取菌体形态观察、生理生化鉴定及16S rRNA基因序列分析等方法, 从患病奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*)中分离、鉴定了无乳链球菌(*S. agalactiae*), 并对分离的菌株进行了人工感染和药敏试验, 旨在为有效控制奥尼罗非鱼的链球菌病提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

脑心浸液培养基(BHI)购自美国BD公司; 血琼脂平板购自英国OXOID; Premix Taq酶、pMD-

18 T载体、DNA Marker DL2000、无DNase/RNase水购自大连宝生物(TaKaRa)公司; 胶回收试剂盒、DH5 α 感受态细胞购自北京原平皓公司; 引物fD₁(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), rD₁(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')由上海生工生物工程技术有限公司测序部合成; 微量鉴定管、药敏纸片购自杭州微生物有限公司。

1.2 病鱼来源及症状观察

海南省琼海市某水产养殖场饲养的奥尼罗非鱼成鱼出现大批死亡。取该渔场发病鱼塘里濒死的奥尼罗非鱼观察并记录其症状, 剖检典型病鱼记录其内脏病理变化。

1.3 病原菌分离和纯化

选取具有典型症状的濒死病奥尼罗非鱼, 在无菌条件下从鱼体表溃疡部、鳃丝、肝脏、脾脏、肾脏、腹水中分离细菌, 同时分别在BHI(BD)血琼脂平板上划线分离细菌。将平板置于28℃培养, 待长出菌落后, 挑选优势菌株进一步纯化。

收稿日期: 2010-05-03; 修回日期: 2010-09-12

* 国家“973”项目(2009CB118700)和农业公益性行业科研专项经费项目(200803013)资助

** 通讯作者。E-mail: chenchangfu@mail.hzau.edu.cn

谭晶晶, 女, 1984年生, 硕士研究生。研究方向: 水产动物疾病。E-mail: Tanjj@webmail.hzau.edu.cn

1.4 菌株形态观察与生理生化特性鉴定

取纯化后的菌落分别接种在普通营养琼脂、BHI 平板和血琼脂平板, 28 °C 培养 24 h 后, 观察菌落特征。取 BHI 平板培养 24 h 的培养物, 革兰氏染色, Olympus CX41 型显微镜观察菌体形态。依据文献[4-5]进行生理生化特征的测定, 包括接触酶实验、运动性实验、溶血性实验、生长实验、马尿酸钠水解实验、糖发酵产酸产气实验、淀粉水解实验、吡啶实验、V-P 实验等, 对编号为 LFY-08-23 的分离菌株进行初步鉴定; 并对该菌株进行适宜生长温度、盐度、pH 值的测定。

1.5 Biolog 系统鉴定方法

将纯培养的 LFY-08-23 划线接种到 BHI 培养平板上, 28 °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, 用移液枪将菌悬液转移至 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, 经 Microstation 仪自动读取细菌鉴定结果。

1.6 16S rRNA 基因序列鉴定和分析

将菌株接种在 BHI 平板中培养 24 h, 直接挑取 1 环分离菌株, 加入 200 μ L 无菌重蒸水, 漩涡混匀后, 沸水浴 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液作为 PCR 反应模板, ddH₂O 作为 PCR 模板阴性对照。采用 PCR 扩增 16S rRNA 引物, 其引物 fD₁ (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), rD₁ (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')[6]。PCR 反应体系 (50 μ L): 25 μ L Premix Taq, 20 mol/L 正向和反向引物各 0.5 μ L, 2 μ L 基因组 DNA, 22 μ L ddH₂O。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物按 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收和纯化, 将 PCR 产物连接到 pMD-18 T 载体上, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑, 扩大培养后将阳性菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.7 系统发育树的构建

将测定菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索和分析, 选用 Clustal W 法与已知的链球菌属 16S rRNA 基因序列进行同源序列分析

比对, 并用 MP (maximum parsimony, 最大简约法) 构建 11 个菌种系统发育树, 用自展法 (Bootstrap) 进行 1 000 次重复, 并用一致性指数 (consistency index, CI) 衡量分析结果的可靠性。

1.8 菌株毒力测定及其试验鱼

将 LFY-08-23 菌株在 BHI 液中 28 °C 培养 24 h, 用无菌生理盐水配制成 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 和 1.0×10^6 cfu/mL 的 4 种不同浓度的活菌液。腹腔注射质量 70 g 左右的异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和质量 100 g 左右的斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*), 每组 10 尾, 每尾注射 0.3 mL 活菌液。对照组则注射相同剂量的 0.65% 无菌生理盐水。将试验和对照鱼饲养在水温为 28 °C 左右的水族箱中, 观察试验鱼的发病情况, 连续观察 14 d。从濒死的试验鱼的肝脏、脾脏、肾脏等部位再次分离致病菌并进行鉴定。试验鱼在攻毒前暂养 7 d, 确认无任何疾病症状后用于人工感染试验。

1.9 药物敏感实验

取 BHI 液体 28 °C 下培养 24 h 的菌液 100 μ L 涂布在 BHI 平板上, 贴上药敏纸片, 每皿 4 片, 每种药物 2 片, 经 28 °C 培养 48 h 后, 测量药敏片周围的抑菌环直径大小。

2 结果与分析

2.1 菌株形态观察

将分离菌接种在绵羊血琼脂平板上, 28 °C 培养 48 h 后, 可长成直径为 0.5~1.0 mm 的菌落, 呈乳白色、圆形、突起、湿润、边缘整齐、 β 溶血, 有溶血环出现。该菌在普通营养琼脂平板上生长不良, 而在 BHI 平板上生长良好。分离纯化后的细菌革兰氏染色阳性, 油镜下可见 2~5 个菌体互相连接并形成短链, 也有 10 个以上菌体连接形成长链状的, 单个球形菌体直径为 1.0 μ m。分离菌的适宜生长盐度为 0%~4%, 适宜生长温度为 15~40 °C。

2.2 生理生化特性检测

常规生理生化特性测定结果表明, 该菌株接触酶阴性, 无运动性, 在 10 和 45 °C 不生长, 在含有 6.5% NaCl 的培养基中不生长, β -溶血, 不水解淀粉, 水解马尿酸钠。能利用葡萄糖、草糖、麦芽糖、蔗糖、果糖等, 不能利用乳糖、棉子糖、阿拉伯糖、七叶苷、血清菊糖等, V-P 实验阴性, 吡啶实验阴性。根据上述特征, 该菌可鉴定为链球菌属 (表 1)。

表 1 LFY-08-23 菌株的主要生理生化特征¹⁾

Table 1 The main physiological and bio-chemical characteristics of the LFY-08-23 strain

项目 Items	LFY-08-23	项目 Items	LFY-08-23
革兰氏染色 Gram stain	+	霉菌 Fungi	+
接触酶 Peroxidase	-	山梨醇 Sorbitol	-
运动性 Motility	-	麦芽糖 Maltose	+
溶血性 Haemolysis	β	棉子糖 Raffinose	-
45℃下生长 Growth at 45℃	-	葡萄糖 Dextrose	+
10℃下生长 Growth at 10℃	-	β-半乳糖 β-Galactose	-
6.5% NaCl 下生长 Growth at 6.5% NaCl	-	D-核糖 D-ribose	+
水解 Hydrolysis of		阿拉伯糖 Arabinose	-
七叶苷 Esculin	-	蔗糖 Sucrose	+
精氨酸 Arginine	+	果糖 Fructose	+
尿素 Urea	-	血清菊糖 Seruminulin	-
马尿酸钠 Hippurate	+	木糖 Xylose	-
淀粉 Starch	-	其他 Others	
产酸 Acid from		赖氨酸 Lysine	-
水杨苷 Salicin	-	VP	-
甘露醇 Mannosidase	-	吲哚 Indole	-
乳糖 Lactose	-		

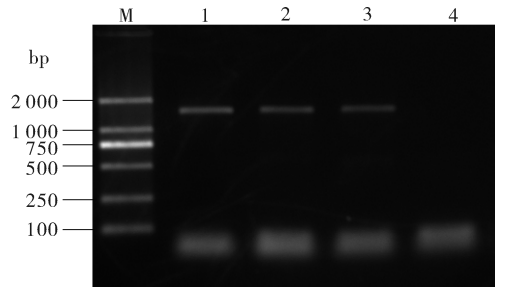
1) +: 阳性 Positive; -, 阴性 Negative.

2.3 Biolog 系统鉴定

经过 Biolog 系统鉴定, LFY-08-23 菌株对碳源的利用情况如表 2 所示。结果表明, LFY-08-23 菌株与 *S. agalactiae* (gpB) 最接近, 但是, 该方法鉴定结果的可靠性不高。其 SIM 值为 0.299, DIST 值为 4.316。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^[7]。

2.4 LFY-08-23 菌株的 16S rRNA 基因序列分析

通过对 LFY-08-23 菌株的基因组 DNA 进行 PCR 反应, 得到一段长度序列为 1 500 bp 的 PCR 扩增产物(图 1)。



M. DL 2000 DNA marker; 1, 2, 3. LFY-08-23; 4. Negative control.

图 1 菌株 LFY-08-23 的 PCR 扩增产物图谱

Fig. 1 Electrophoresis picture of LFY-08-23 after PCR amplification

表 2 Biolog 鉴定结果¹⁾

Table 2 Results of Biolog identification

反应项目 Reaction items	结果 Results	反应项目 Reaction items	结果 Results
A1: 水 Water	对照 CK	E1: p-羟基苯乙酸 p-Hydroxy phenylacetic acid	N
A2: 环糊精 α-Cyclodextrin	B	E2: 衣康酸 Itaconic acid	N
A3: 糊精 Dextrin	P	E3: α-酮丁酸 α-Keto butyric acid	N
A4: 淀粉 Glycogen	P	E4: α-酮戊二酸 α-Keto glutaric acid	B
A5: 吐温 40 Tween 40	N	E5: α-酮戊酸 α-Keto valeric acid	N
A6: 吐温 80 Tween 80	N	E6: D,L-乳酸 D,L-lactic acid	N
A7: N-乙酰基-D-半乳糖胺 N-acetyl-D-galactosamine	P	E7: 丙二酸 Malonic acid	N
A8: N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	N	E8: 丙酸 Propionic acid	N
A9: 侧金盏花醇 Adonitol	L	E9: 奎尼酸 Quinic acid	N
A10: L-阿拉伯糖 L-arabinose	P	E10: D-葡糖二酸 D-saccharic acid	N
A11: D-阿拉伯糖 D-arabitol	P	E11: 癸二酸 Sebacic acid	N
A12: D-纤维二糖 D-cellobiose	N	E12: 琥珀酸 Succinic acid	N
B1: 赤藻糖醇 I-erythritol	N	F1: 溴丁二酸 Bromo succinic acid	P
B2: D-果糖 D-fructose	N	F2: 琥珀酰胺酸 Succinamic acid	N
B3: L-果糖 L-fucose	N	F3: 葡糖醛酰胺 Glucuronamide	N

续表 Continued from Table 2

反应项目 Reaction items	结果 Results	反应项目 Reaction items	结果 Results
B4: D-半乳糖 <i>D-galactose</i>	MN	F4: L-丙氨酸胺 <i>L-alaninamide</i>	N
B5: 龙胆二糖 <i>Gentiobiose</i>	P	F5: D-丙氨酸 <i>D-alanine</i>	N
B6: α -D-葡萄糖 α - <i>D-glucose</i>	P	F6: L-丙氨酸 <i>L-alanine</i>	N
B7: m-肌醇 <i>m-Inositol</i>	P	F7: L-丙氨酰甘氨酸 <i>L-alanyl-glycine</i>	N
B8: α -D-乳糖 α - <i>D-lactose</i>	N	F8: L-天冬酰胺酸 <i>L-asparagine</i>	N
B9: 乳果糖 <i>Lactulose</i>	N	F9: L-天门冬氨酸 <i>L-aspartic acid</i>	N
B10: 麦芽糖 <i>Maltose</i>	B	F10: L-谷氨酸 <i>L-glutamic acid</i>	N
B11: D-甘露醇 <i>D-mannitol</i>	N	F11: 甘氨酸-L-天门冬氨酸 <i>Glycyl-L-aspartic acid</i>	N
B12: D-甘露糖 <i>D-mannose</i>	N	F12: 甘氨酸-L-谷氨酸 <i>Glycyl-L-glutamic acid</i>	B
C1: D-蜜二糖 <i>D-melibiose</i>	P	G1: L-组氨酸 <i>L-histidine</i>	N
C2: β -甲基-D-葡萄糖苷 β -methyl- <i>D-glucoside</i>	P	G2: 羟基-L-脯氨酸 <i>Hydroxy-L-proline</i>	L
C3: 阿洛酮糖 <i>D-psicose</i>	P	G3: L-亮氨酸 <i>L-leucine</i>	N
C4: D-棉子糖 <i>D-raffinose</i>	P	G4: L-鸟氨酸 <i>L-ornithine</i>	N
C5: L-棉子糖 <i>L-rhamnose</i>	P	G5: L-苯丙氨酸 <i>L-phenylalanine</i>	L
C6: D-山梨醇 <i>D-sorbitol</i>	N	G6: L-脯氨酸 <i>L-proline</i>	N
C7: 蔗糖 <i>Sucrose</i>	N	G7: L-焦谷氨酸 <i>L-pyroglutamic acid</i>	N
C8: D-海藻糖 <i>D-trehalose</i>	N	G8: D-丝氨酸 <i>D-serine</i>	P
C9: 松二糖 <i>Turanose</i>	P	G9: L-丝氨酸 <i>L-serine</i>	N
C10: 木糖醇 <i>Xylitol</i>	P	G10: L-苏氨酸 <i>L-threonine</i>	P
C11: 甲基丙酮酸 <i>Methyl pyruvate</i>	N	G11: D, L-肉碱 <i>D, L-carnitine</i>	N
C12: 单甲基琥珀酸 <i>Mono methyl succinate</i>	N	G12: γ -氨基丁酸 γ -amino butyric acid	P
D1: 乙酸 <i>Acetic acid</i>	N	H1: 尿刊酸 <i>Urocanic acid</i>	N
D2: 顺-乌头酸 <i>Cis-aconitic acid</i>	L	H2: 肌苷 <i>Inosine</i>	N
D3: 柠檬酸 <i>Citric acid</i>	N	H3: 尿苷 <i>Uridine</i>	N
D4: 甲酸 <i>Formic acid</i>	N	H4: 胸腺嘧啶核苷 <i>Thymidine</i>	N
D5: D-乳糖酸内酯 <i>D-galactonic acid lactone</i>	P	H5: 苯乙胺 <i>Phenylethylamine</i>	P
D6: D-半乳糖醛酸 <i>D-galacturonic acid</i>	B	H6: 丁二胺 <i>Putrescine</i>	B
D7: D-葡萄糖酸 <i>D-gluconic acid</i>	P	H7: 2-氨基乙醇 <i>2-aminoethanol</i>	N
D8: D-葡萄糖胺酸 <i>D-glucosaminic acid</i>	N	H8: 2,3-丁二醇 <i>2,3-butanediol</i>	N
D9: D-葡萄糖酸 <i>D-glucuronic acid</i>	L	H9: 丙三醇 <i>Glycerol</i>	N
D10: α -羟基丁酸 α -hydroxy butyric acid	B	H10: D, L- α -磷酸甘油 <i>D, L-α-glycerol phosphate</i>	B
D11: β -羟基丁酸 β -hydroxy butyric acid	B	H11: 1-磷酸葡萄糖 <i>Glucose-1-phosphate</i>	P
D12: γ -羟基丁酸 γ -hydroxy butyric acid	B	H12: 6-磷酸葡萄糖 <i>Glucose-6-phosphate</i>	N

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

将 LFY-08-23 菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank, 在 GenBank 中进行 BLAST 搜索并根据 LFY-08-23 菌株的 16S rRNA 序列与已报道的链球菌属的 16S rRNA 基因序列进行比较分析, 并构建系统发育树(图 2)。从图 2 可以看出, 菌株 LFY-08-23 与 *S. agalactiae*(EF092913, DQ303183, AF459432)自然构成一个分支, 相似性高达 99.8%, 说明 LFY-08-23 菌株与 *S. agalactiae* 亲缘关系最近。

2.5 分离菌株的致病力

LFY-08-23 菌株对异育银鲫和斑点叉尾鲴的感染结果见表 3。由表 3 可见, 分离菌株对 2 种鱼均有比较强的致病力。注射菌液浓度为 1.0×10^9 cfu/mL 的活菌后, 分别于第 2 天和第 3 天供试鱼就全部死亡, 死亡前 2 种鱼均出现不安、狂游的状况。但是, 鱼体却没有出现腹部出血、眼球突出等典型症状。其他试验组和对照组在观察 14 d 的时间里, 无死鱼出现, 也无明显疾病症状。从感染后死鱼的肝

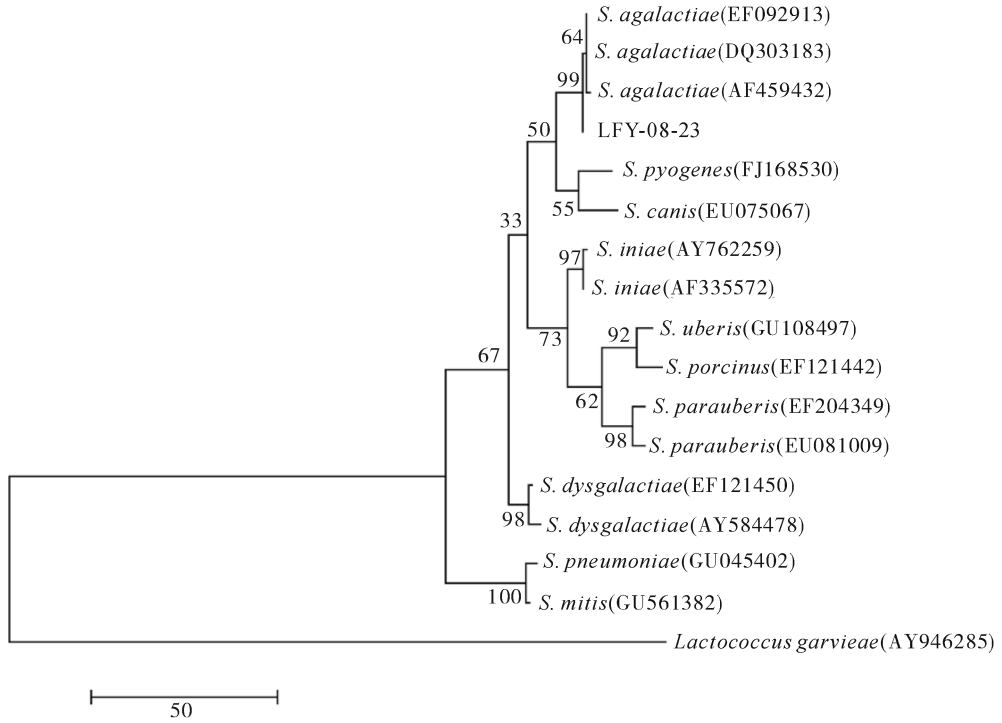


图 2 基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal RNA sequences

表 3 人工感染试验结果

Table 3 Results of artificial infection experiment

试验鱼 Fish	菌液浓度/(cfu/mL) Concentration	剂量/mL Injected volume	试验组/尾 Test group	不同时间的死亡数 No. of death at different time							死亡率/% Mortality
				1 d	2 d	3 d	4 d	6 d	8 d	14 d	
异育银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>	1.0×10 ⁶	0.2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10 ⁷	0.2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10 ⁸	0.2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10 ⁹	0.2	10	0	10	0	0	0	0	0	100
	生理盐水 Physiological saline	0.2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	1.0×10 ⁶	0.3	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10 ⁷	0.3	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10 ⁸	0.3	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0×10 ⁹	0.3	10	0	0	10	0	0	0	0	100
	生理盐水 Physiological saline	0.3	10	0	0	0	0	0	0	0	0

脏、脾脏和肾脏中分离得到的 JY-12-02 和 BD-04-12 菌株与原感染菌形态、生化特征完全相同,说明供试鱼死亡是由于人工攻毒所引起的。

2.6 分离菌株的药物敏感性

LFY-08-23 菌株对 26 种药物的敏感性测定结果如表 4 所示。供试菌株对头孢氨噻肟、丙氟哌酸、

利福平、氧氟沙星、先锋必、头孢唑啉、头孢拉定、头孢呋肟、洁霉素、红霉素、青霉素、阿莫西林、左氟沙星等 14 种药物高度敏感;而对呋喃妥因、新生霉素、强力霉素、四环素、万古霉素、麦迪霉素、氟苯尼考等 7 种药物敏感;对卡那霉素、链霉素、庆大霉素、磺胺异恶唑、复方新诺明等 5 种药物不敏感。

表 4 LFY-08-23 菌株对药物敏感性的试验结果

Table 4 Antibiotic susceptibility test of LFY-08-23 strain

抗菌药物 Chemotherapeutants	每片含药量 Each drug content/ μg	抑菌圈直径 Diameter/mm	抗菌药物 Chemotherapeutants	每片含药量 Each drug content/ μg	抑菌圈直径 Diameter/mm
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	21	麦迪霉素 Medemycin	30	20
头孢氨噻肟 Cefotaxime	30	31	氧氟沙星 Ofloxacin	5	26
卡那霉素 Kanamycin	30	9	氟苯尼考 Florfenicol	75	24
丙氟哌酸 Ciprofloxacin	5	20	红霉素 Erythromycin	15	26
新生霉素 Albamycin	30	21	青霉素 Penicillin	10	28
强力霉素 Doxycycline	30	22	头孢拉啶 Cefazolin	30	26
四环素 Tetracycline	30	19	阿莫西林 Amoxicillin	10	35
万古霉素 Vancomycin	30	18	磺胺异恶唑 Gantrisin	300	6
利福平 Rifampicin	5	25	左氟沙星 Levofloxacin	5	24
链霉素 Streptomycin	25	8	头孢呋肟 Zinacef	30	30
庆大霉素 Gentamicin	10	10	复方新诺明 Cotrimoxazole	30	8
先锋必 Cefobid	75	35	头孢唑啉 Ampicillin	30	36
洁霉素 Jiemycin	2	28	头孢氨苄 Cephalexin	10	28

3 讨论

S. agalactiae 和 *S. inae* 是引起鱼类链球菌病的 2 个主要病原^[8-9], 由于菌株经常出现表型表达不稳定, 传统的细菌鉴定方法很难将它们区分开来, 为确保鉴定结果的可靠性, 本研究采用生理生化和分子鉴定结合的方法, 最终将其确定为 *S. agalactiae*。同时尝试用 Biolog 系统对其进行鉴定, 其结果与 *S. agalactiae* 最为接近, 但是可信度不高, 只能作为一种参考, 这可能是由于缺少鉴定为无乳链球菌的主要碳源利用项目。虽然 16S rRNA 系统发育分析已成为目前细菌分类和鉴定的重要手段之一, 但是截止到 1996 年只测定了 3 500 余种细菌的完整 16S rRNA 序列, 若没有生化鉴定结果作为佐证, 便可能无法得出正确的结论^[10]。

本研究通过形态学、生理生化试验和 Biolog 系统将从患病奥尼罗非鱼中分离的 LFY-08-23 菌株初步鉴定为链球菌属的 *S. agalactiae*, 为进一步验证, 利用了 16S rRNA 系统发育分析方法, 通过测定比较后发现 LFY-08-23 菌株在系统发育树上与 *S. agalactiae* 聚为一簇, 并与 *S. agalactiae* (EF092913, DQ303183, AF459432) 同源性最高, 达到 99.8%, 因此, 将 LFY-08-23 菌株鉴定为 *S. agalactiae* 的结果应该是可靠的。

可感染链球菌病的鱼类很多^[11-14], 本文选取异育银鲫和斑点叉尾鲴作为测定分离菌株致病力的供试鱼^[12], 旨在确定本次分离菌株是否具有致病力, 结果表明只有菌液浓度均达到 1.0×10^9 cfu/mL, 并且对每尾鱼注射 0.3 mL 才具有致病力, 是否因为 *S. agalactiae* 经过一段时间保存之后毒力有所

下降^[15], 还是因为不同的鱼类对 *S. agalactiae* 的敏感程度有所不同, 有待深入研究。因为感染后供试鱼呈现急性暴发性死亡, 且死亡之前狂游不止, 却并未发现突眼、眼膜浑浊, 腹部出血等鱼类链球菌病的典型症状^[16-18]。

近年来, 南方部分地区人工养殖奥尼罗非鱼产业发展十分迅速, 由于大多实施高密度养殖、天然饲料缺乏以及水环境恶化等原因, 奥尼罗非鱼的链球菌病问题不断发生, 已经造成了重大的经济损失, 也严重制约了罗非鱼养殖业的健康发展。有关链球菌病的治疗主要还是抗生素防治的手段, 但是, 依靠药物防治疾病会使病原体产生耐药性, 不利于水产养殖业的健康发展, 因此, 开展免疫防治技术研究将成为今后研究罗非鱼链球菌病的热点^[19]。

S. agalactiae 是牛乳房炎的常见病原菌^[20], 同时也可以感染人类^[21]。目前, 人兽共患病原已引起了国内外学者的重视, 并成为公共卫生防御的国际研究热点。因此, 对于 *S. agalactiae* 尚有进一步深入研究的必要。

参 考 文 献

- [1] 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(1): 18-20.
- [2] 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 772-778.
- [3] WEINSTEINE M R, LITT M, KERTESZ D A, et al. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus inae* [J]. Engl J Med, 1997, 337: 589-594.
- [4] HOLT J G, KRIEG N B, SNEATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th ed. Baltimore:

- Williams & Wilkins, 1994.
- [5] 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: 259-266.
- [6] WILIAM G W, SUSAN M B, DALE A P, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703.
- [7] 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.
- [8] MIAN G F, GODOY D T, LEAL C A G, et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia[J]. Vet Microbiol, 2009, 136: 180-183.
- [9] FEGRUSON H W, MORALES J A, OSTLAND V E. Streptococcosis in aquarium fish [J]. Dis Aquat Org, 1994, 19(1): 1-6.
- [10] SALLEN B, RAJOHARION A, DESVARENNE S. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of listeria species [J]. Jut J Sys Bacterilo, 1996, 46(3): 669-674.
- [11] ROY P E Y, RUTH F F. Streptococcal infections of fish[J]. Circular, 2006, 57: 1-6.
- [12] 余晓丽, 陈明, 李超, 等. 斑点叉尾鲷暴发性海豚链球菌病的研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 185-191.
- [13] 沈智华, 钱冬, 许文军, 等. 红拟石首鱼海豚链球菌分离、鉴定及致病性研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 678-683.
- [14] 周素明, 李安兴, 马跃, 等. 养殖鱼类链球菌病原的分离鉴定及其 16S rDNA 分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(2): 68-71.
- [15] 尤敏, 管福来, 王萍, 等. 医学微生物教学用菌种保存方法的比较[J]. 潍坊医学院学报, 2004, 26(1): 27-28.
- [16] 张生, 曾中良, 王凡, 等. 暖水鱼类链球菌病研究概况[J]. 水产科技, 2007(2): 1-6.
- [17] 刘堂水, 樊海平, 陈昌福. 罗非鱼突眼病细菌性病原的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(4): 538-541.
- [18] NAJIAH M, LEE S W, NADIRAH M, et al. Streptococcosis in red hybrid tilapia commercial farms in Malaysia [J]. Aquac Res, 2009, 40: 630-632.
- [19] 汪成竹, 陈昌福. 免疫多糖对受免草鱼免疫应答的调节作用[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 495-499.
- [20] 王冬梅, 刘磊, 王胜利. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2005, 26(6): 81-83, 94.
- [21] PEREIRA U P, MIAN G F, OLIVEIRA I C M, et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia [J]. Vet Microbiol, 2010, 140: 186-192.

Identification, Pathogenicity and Drug Sensitivity of *Streptococcus agalactiae* from Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*

TAN Jing-jing CHEN Chang-fu GAO Yu LIU Zhen-xing WANG Mei-zhen LI Ge-lei
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The dominant bacterial strain, designated as LFY-08-23, was isolated from the diseased hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus* in Hainan Province. The biochemical and physiological characteristics of the isolates were studied by using conventional method and Biolog System. The test showed that the isolates were Gram-positive cocci arranging in chains, catalase negative, β-haemolytic on 5% sheep blood agar and serogroup B. According to their 16S rRNA gene sequence and molecular phylogenetic dendrogram, the strain LFY-08-23 was most close to *Streptococcus agalactiae* with a similarity of 99.8%. The virulent test was carried out by using the pure culture of the bacteria artificially infected *Ictalurus punctatus* and *Carassius auratus gibelio*. The two species of experimental fish all died at bacterial concentration of 1.0×10^9 cfu/mL. The morphological and biochemical characteristics of the re-isolated bacteria from the artificially infected diseased fish were the same as those of the original infected bacteria. The susceptibility test to antibiotics demonstrated that the isolate strain LFY-08-23 was sensitive to most of the tested antibiotics, especially highly sensitive to 13 kinds of antibiotics, such as Cefotaxime, Ciprofloracin, Rifampicin, and resistant to 5 antibiotics, such as Kanamycin, Streptomycin, Gantrisin.

Key words hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*); *Streptococcus agalactiae*; identification; phylogenetic analysis; artificial infection; chemotherapeutant sensitivity

(责任编辑:边书京)