

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)病原霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)的表型与分子鉴定*

邴旭文¹ 阎斌伦² 张晓君² 秦 蕾² 毕可然²

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081;
2. 淮海工学院海洋学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室 连云港 222005)

提要 从江苏连云港某养殖场养殖死亡的泥鳅肝脏、血液及腹水中分离出大量优势生长的细菌,人工感染试验证明其对泥鳅具有很强的致病性。采用表观分类学及分子生物学方法,对分离菌进行了形态特征、理化特性、胞外酶活性及溶血活性等生物学性状检验;用 PCR 方法同时扩增其 16S rRNA 和 *gyrB* 基因,分析了 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因序列的同源性,并构建了系统发生树,通过基因序列分析,比较了两种基因在相似细菌的检测和鉴定能力;基于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的系统发育学分析表明分离菌(LD081008B-1)所扩增的 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列均与 GenBank 数据库中霍乱弧菌具有较高的相似性,且 *gyrB* 基因用于细菌种间鉴定更具优越性;16S rRNA 基因序列长度为 1446bp (GenBank 登录号: GQ205447), *gyrB* 基因序列长度为 1207bp (GenBank 登录号: GQ205452);根据分离菌的表型特征及分子特征,判定病原菌为弧菌属(*Vibrio* Pacini 1854)的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)。胞外酶活性及溶血活性检测表明分离菌均具有蛋白酶、卵磷脂酶、淀粉酶、明胶酶及 DNA 酶活性,在含 7%家兔脱纤血液营养琼脂培养基上呈 β 型溶血。分离菌的耐药谱测定结果显示,除对供试 49 种抗菌药物中的杆菌肽耐药外,对其它 48 种药物敏感或高度敏感。

关键词 泥鳅, 霍乱弧菌, 生物学特性, 16S rRNA 基因, *gyrB* 基因
中图分类号 Q346

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 分类于弧菌科 (Vibrionaceae V é ron 1965)、弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854), 且为弧菌属的模式种 (type species), 该菌是引起人霍乱 (cholera) 的病原菌。其中的非 O1 群霍乱弧菌广泛分布于水环境, 已知有不少血清型株能引起水产动物感染发病。据 Muroga 等 (1979)、Kiiyukia 等 (1992) 报道, 该菌可引起日本 Amano 河的野生香鱼发生一种流行病; Reddacliff 等 (1993) 报道该菌在澳大利亚可引起金鱼发病; 郑国兴 (1986) 报道该菌曾引起上海市奉贤县养殖对虾发生被当地称为“瞎眼病”的流行病; 王立平等 (1997) 报道了在 1988—1989 年由该菌引起山东崂山对虾育苗场中国对虾糠虾幼体大量死亡; 翟子玉等 (1993) 报道非霍乱弧菌可引起鲢、

鳙鱼感染发病; 杨鸞劫等 (2006) 报道该菌可引起养殖暗纹东方鲀感染发病。但目前尚未见有该菌引起养殖泥鳅疾病的报道。此外, 非 O1 群霍乱弧菌有时可引起人散发胃肠炎, 在特殊条件下也可引起败血症、脑膜炎、伤口感染等肠道外感染, 是人和水产养殖动物共染的病原菌。

2008 年 10 月, 江苏连云港市东海县平明乡一水产养殖场所养泥鳅发生了严重的疾病, 通过对 3 口池塘的病死鱼进行病原检验, 发现其中 1 口池塘为弧菌属的霍乱弧菌感染。本文报告了养殖泥鳅的发病情况、所检病鱼的临床表现及主要病理变化、病原霍乱弧菌的主要生物学性状、毒力因子及耐药性等方面的研究, 同时进行了 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因序列的

* 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金资助, BZ2009-03 号; 连云港市科技攻关项目资助, CN0826 号。邴旭文, 研究员, E-mail: bingxw@ffrc.cn

收稿日期: 2008-12-15, 收修改稿日期: 2009-02-23

分子鉴定, 比较了两种基因序列在霍乱弧菌鉴定中的优越性, 旨在为对泥鳅疾病的有效检验与防治及对鱼类病原霍乱弧菌的进一步研究等提供参考。

1 材料与方法

1.1 发病情况调查及病鱼检验

对发病泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)在进行发病情况的调查后, 取濒死病鱼及刚刚病死鱼做眼观病变的检查; 再分别取其病变组织作抹片后, 以革兰氏染色镜检细菌。

1.2 细菌分离

以病死鱼肝脏、血液及腹水为材料, 用普通营养琼脂培养基做划线接种分离培养(28 培养 48h 检查)细菌, 取分离菌移接于普通营养琼脂斜面(28 培养 24h)做纯培养供检验用, 菌株编号: LD081008B-1—4。

1.3 人工感染试验

试验用鱼选用暂养 1 周后的健康泥鳅。将供试菌株 LD081008B-1 接种于普通营养肉汤, 28 过夜培养后作为供试菌液(调至 10^6 — 10^9 CFU/ml), 分别经腹腔及肌肉注射感染健康泥鳅, 每种浓度接种 6 尾, 每尾接种 0.2ml; 同时设立接种同剂量、同批无菌营养肉汤做对照; 均隔离养殖于试验水族箱中, 每天观察试验鱼感染后的发病与死亡情况, 以引起试验鱼发病死亡并能重新分离回收到原感染菌作为分离菌致病性的判定指标。

1.4 形态与菌落特征观察及理化特性检查

供试菌移接于普通营养琼脂斜面置 28 培养 20h, 制备涂片标本进行革兰氏染色做形态特征检查; 供试菌接种于半固体培养基, 置 28 培养 24h 后, 取菌悬浮于无菌蒸馏水中制成淡菌悬液作为供试菌液, 取此菌液 1 滴于经 Formvar 膜包被的铜网上, 静置 1min 左右后吸除菌液, 再以 0.5% 磷钨酸水溶液同样加 1 滴于铜网上负染 1min 左右, 吸除染液并待自然干燥后, 置 JEM-100CX 透射电子显微镜下检查。

供试菌接种于普通营养肉汤、普通营养琼脂及硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(TCBS)培养基, 置于 28 培养 24h, 检查生长情况。供试菌分别接种于细菌理化特性鉴定用培养基中, 按常规进行氧化酶、接触酶、糖(醇及苷)类代谢、 H_2S 、吲哚、MR、V-P 试验、硝酸盐还原、OF 试验、枸橼酸盐利用(Simmons)等较系统的理化特性测定, 主要参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)及《人及动

物病原细菌学》(杨正时等, 2003)进行。

1.5 胞外酶活性及溶血活性检测

分离菌的胞外蛋白酶活性、卵磷脂酶活性、脂酶活性、淀粉酶活性、尿素酶活性采用平板检验方法, 明胶酶活性采用试管液化方法。将处于对数生长期的 4 株供试菌株分别点种于含有脱脂牛奶(10%)、蛋黄液(10%)、吐温 80(1.0%)、淀粉(1%)、DNA (0.5%)的普通营养琼脂平板中, 将供试菌穿刺接种于含明胶(8%)的培养基试管, 于 28 恒温培养 24h 后观察。含脱脂牛奶、蛋黄液、吐温 80、DNA 的平板可以直接观察水解圈; 含淀粉的平板则在观察之前加入显色剂碘液。透明的水解圈区域显示有酶活。含明胶的培养基试管于 28 恒温培养 24h 后, 置于 4 冰箱中过夜后观察。

分离菌的溶血活性采用将菌株接种至血液琼脂(含 7% 家兔脱纤血的营养琼脂)培养基平板的方法, 将接种后的血液琼脂培养基平板置 28 恒温培养 24h 后观察菌株周围是否出现溶血圈。若出现溶血圈则为阳性, 表明该菌能分泌溶血毒素。

1.6 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定与系统发育学分析

1.6.1 PCR 模板 DNA 的制备 取纯培养菌分别接种于 LB 肉汤中 28 培养 16h, 按少量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海赛百盛基因技术有限公司产)所述方法提取 DNA 作为 PCR 模板 DNA。

1.6.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序

16S rRNA 基因 PCR 扩增的两个引物分别为: 27F(正向引物): 5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3', 1492R(反向引物): 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Martin *et al*, 1998)。在 20 μ l 反应体系中含有: 无菌蒸馏水 14.4 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, 1.5mmol/L $MgCl_2$ 1.6 μ l, 4 \times dNTP 混合物 0.4 μ l, 引物各 0.2 μ l, 2.5U/ μ l 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ l, 模板 DNA 1 μ l。PCR 反应条件为: 95 预变性 3min、接 94 变性 1min、55 复性 1min、72 延伸 2min, 30 个循环后 72 温育 6min。PCR 扩增产物由上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

1.6.3 *gyrB* 基因序列的 PCR 扩增与测序 *gyrB* 基因 PCR 扩增的两个引物分别为: UP1(正向引物): 5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA-3', UP2r(反向引物): 5'-AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTCAT-3' (Yamamoto *et al*, 1995)。在 20 μ l

反应体系中含有:无菌蒸馏水 14.4 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ l, 1.5m mol/L MgCl₂ 1.6 μ l, 4 \times dNTP 混合物 0.4 μ l, 引物各 0.2 μ l, 2.5U/ μ l 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ l, 模板 DNA 1 μ l。PCR 反应条件为:94 预变性 5min, 接 94 变性 1min、57 复性 1min、72 延伸 2min、30 个循环, 然后 72 温育 7min。PCR 扩增产物由上海生物工程技术公司进行基因序列测定。

1.6.4 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列系统发育树构建

对分离菌的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行序列同源性分析, 并使用 Clustal X 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株的序列进行多序列匹配排列(Multiple Alignments), 采用 MEGA3(Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA)软件构建系统发生树, 采用邻接法(neighbor joining method)建树方法, 并通过 Bootstrap 法(1000 次重复)检验。

1.7 菌种分类位置确定

根据细菌形态、培养及理化特性测定的结果, 主要依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed》(Holt *et al*, 1994)、《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(Krieg *et al*, 1984)及有关资料, 并结合细菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因系统发育学分析的结果, 进行分离菌的种属分类位置判定。

1.8 耐药性测定

经鉴定后的菌株, 用常规琼脂扩散(K-B)法进行对 49 种抗菌类药物的敏感性测定, 以是否出现抑菌圈及抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标(叶应妩等, 1997)。药敏纸片为杭州天和微生物试剂公司产品。

2 结果

2.1 发病情况与主要病变

2008 年 10 月, 连云港市东海县平明乡某水产养殖场所养泥鳅发生严重的疾病。该场共养殖泥鳅 7 公顷左右水面, 放养量约为 22000kg/公顷, 为小土池养殖。2008 年 9 月中旬始见有发病死亡泥鳅, 以后每天均有病死泥鳅且日渐增多, 至送检时泥鳅已出现大量死亡, 每天死亡可达 40kg 左右。对送检的 3 口养殖塘的 38 尾濒死及新鲜死亡泥鳅进行了检验, 其中有 1 口池塘的病鱼表现为头、口、鳃盖、下颌、腹面等部位有不同程度的出血, 鳍及鳍基严重出血, 肌肉肿胀, 肛门呈红肿; 剖检见肠内无食物, 肝脏、脾脏

肿胀或有不同程度出血。

2.2 病变组织中的细菌与细菌分离

被检泥鳅的肝脏、血液及腹水抹片经革兰氏染色, 均存在大量革兰氏阴性、散在或成双排列、两端钝圆、无芽孢、大小多在(0.5—1.0) μ m \times (1.0—2.5) μ m 的杆菌。自被检泥鳅的肝脏、血液及腹水中均分离到了菌落特征一致的大量优势生长的细菌。菌落:圆形光滑、边缘整齐、较隆起、半透明、灰白色, 培养 24h 检查直径多在 1.0mm 左右、48h 多在 1.5mm 左右。

2.3 分离菌的致病性

供试菌株(LD081008B-1)在 10⁶—10⁹ CFU/ml 四种不同浓度的菌液经腹腔及肌肉注射感染泥鳅后, 均引起供试鱼在人工感染后 48h 内全部死亡, 并出现明显的头部、体表、鳍及鳍基出血。对照组泥鳅在 14 天观察期内均正常; 取感染死亡鱼进行细菌学检验, 结果均检验并分离到大量纯一的同供试菌株(LD081008B-1)在形态及菌落特征上相似的菌落。试验证明分离菌为本次引起泥鳅大量死亡的病原菌且具有相当强的致病性。

2.4 表型特征

供试纯培养菌经革兰氏染色镜检, 结果其形态与上述自肝脏、血液及腹水抹片中所检细菌特征一致。菌株(LD081008B-1)经 EM 负染色标本检查, 菌体为着生极端单鞭毛(图 1)。4 株分离菌在普通营养琼脂上的菌落特征与自肝脏、血液及腹水中直接分离菌一致; 在 TCBS 培养基上, 在培养 24h 后形成很小的绿色菌落, 48h 后形成黄色(分解蔗糖)、圆形光滑、湿润稍有隆起、边缘整齐、不透明、直径 1.0—1.5mm 的大菌落; 在普通营养肉汤培养基(管)中, 28 培养 24h 检查呈均匀混浊生长, 管底有点状菌体沉淀。酶

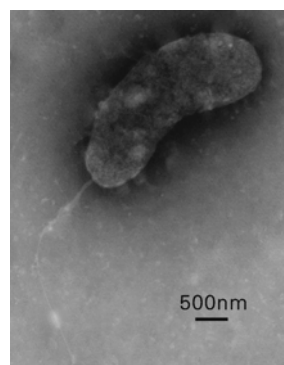


图 1 LD081008B-1 株电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of LD081008B-1

活性实验结果表明, 4 株纯培养菌的胞外产物均具有蛋白酶、卵磷脂酶、淀粉酶、明胶酶及 DNA 酶活性, 但不具有脂酶活性, 在含 7%家兔脱纤血液营养琼脂培养基上呈 β 型溶血, 其它主要理化性状的结果一致(表 1)。

2.5 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列与系统发育学

分离菌(LD081008B-1)所扩增的 16S rRNA 基因序

列长度为 1446bp(GenBank 登录号 :GQ205447); 所扩增的 *gyrB* 基因序列长度为 1207bp(GenBank 登录号 :GQ205452)。

将分离菌(LD081008B-1)所扩增的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 通过 Blast 进行同源性检索, 结果检索出的均为弧菌属细菌的 16S rRNA 基因序列, 主要包括霍乱弧菌(*V. cholerae*)及最小弧菌(*V. mimicus*), 相似性在 98%—99%; 另外是创伤弧菌(*V. vulnificus*)、河流弧菌(*V. fluvialis*), 相似性在 94%; 选择爱德华氏菌 16S rRNA 基因序列(登录号 :DQ233654)作为外围

菌进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 2 所示。

将分离菌(LD081008B-1)所扩增的 *gyrB* 基因序列在 NCBI 通过 Blast 进行同源性检索, 结果检索出的均为弧菌属细菌的 *gyrB* 基因序列, 主要包括霍乱弧菌(*V. cholerae*), 相似性在 97%—98%。另外检索出的有最小弧菌(相似性在 94%)、创伤弧菌(相似性在 82%—84%)、副溶血弧菌(相似性在 81%—82%)。选择嗜水气单胞菌 *gyrB* 基因序列(登录号 :FJ608552)作为外围菌进行系统发育学分析, 其系统发育树如图 3 所示。

表 1 分离菌的理化特性结果
Tab.1 The physiological and biochemical characteristics of isolates

特性	分离菌	霍乱弧菌 ^a	特性	分离菌	霍乱弧菌 ^a
37 生长	+	+	β-半乳糖苷酶	+	+
氧化酶	+	+	丙二酸盐利用	-	-
接触酶	+	+	枸橼酸盐利用	+	d
O-F 试验	F	F	醋酸盐利用	-	.
动力	+	+	葡萄糖酸盐	+	+
葡萄糖: 产酸	+	+	酒石酸盐利用	-	+
产气	-	-	黏液酸盐利用	-	-
乳糖	-	-	苯丙氨酸脱氨酶	-	-
麦芽糖	+	+	蕈糖	+	+
甘露醇	+	+	棉子糖	-	-
甘露糖	+	d	果糖	+	.
蔗糖	+	+	蜜二糖	-	-
阿拉伯糖	-	-	纤维二糖	-	-
阿拉伯醇	-	-	甲基红	-	+
木糖	-	-	V-P 试验	-	d
半乳糖	+	+	葡萄糖铵	+	.
山梨醇	-	-	H ₂ S 产生	-	-
山梨糖	-	.	乙酰胺酶	-	.
卫茅醇	-	-	硝酸盐还原	+	+
赤鲜醇	-	-	α-甲基-D-葡萄糖苷	-	-
苦杏仁苷	-	.	吲哚	+	+
鼠李糖	-	-	NaCl 中生长: 0%	+	+
糊精	+	.	1%	+	+
肌醇	-	-	3%	+	.
侧金盏花醇	-	-	6%	-	d
水杨苷	-	-	O/129 敏感性: 10μg	S	S
胆汁七叶苷	-	-	150μg	S	S

注: “+” 示阳性, “-” 示阴性, “F” 示发酵型, “S” 示敏感, “d” 示 11%—89% 的菌株为阳性, “.” 示在原文中无记载。上角“a”指表中数据取自《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.》(Holt *et al*, 1994)和《Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish》(Austin *et al*, 1999)

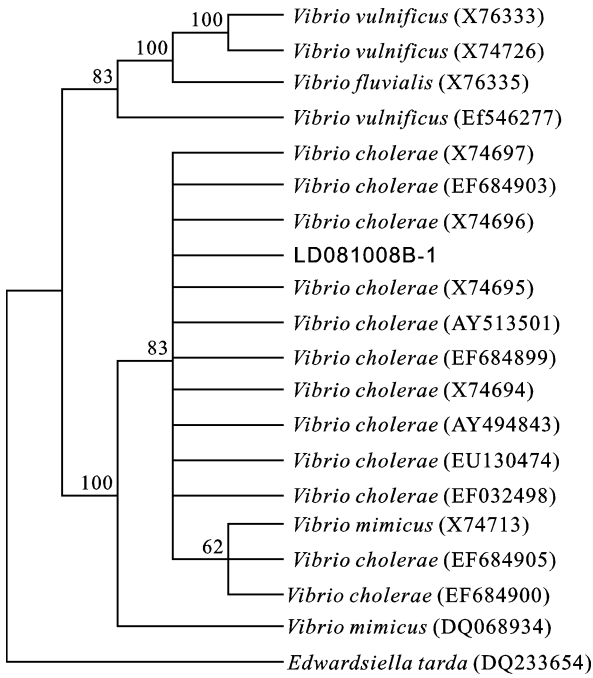


图 2 LD081008B-1 株 16S rRNA 基因序列系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree based on LD081008B-1 16S rRNA gene sequences

注：图中 EF684899—DQ233654 为菌株在 NCBI 的登录号，数字为自举值

2.6 菌种分类位置

结合形态观察、普通的生理生化特征、16S rRNA 及 *gyrB* 基因的分子鉴定结果，判定分离菌为弧菌属 (*Vibrio* Pacini 1854)的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)。

2.7 耐药性

分离菌对供试 49 种抗菌类药物敏感性试验结果见表 2。

3 讨论与结语

泥鳅为温水性底层鱼类，是我国主要淡水经济鱼类之一，其肉质鲜嫩，营养丰富，高蛋白低脂肪，深受消费者的青睐。近年来，由于出口创汇，泥鳅人工集约化养殖迅速发展，尤其是在苏北地区已形成了大规模养殖，但随之而来的病害问题已严重制约了泥鳅养殖业的发展。有记述维氏气单胞、创伤弧菌、泥鳅气单胞菌等均可引起泥鳅发生细菌性疾病(杨鸢劫等, 2004; 房海等, 2006; 秦蕾等, 2008)。本次通过对病死泥鳅肝脏、肌肉溃疡部位等抹片直接染色发现细菌，有规律地自肝脏、血液及腹水分离到形态特征一致的优势生长的细菌，对健康泥鳅进行人工感染试验，48h 即可引起试验鱼的全部死亡并回收到原感染菌，表明霍乱弧菌对于泥鳅具有非常强的致病性，

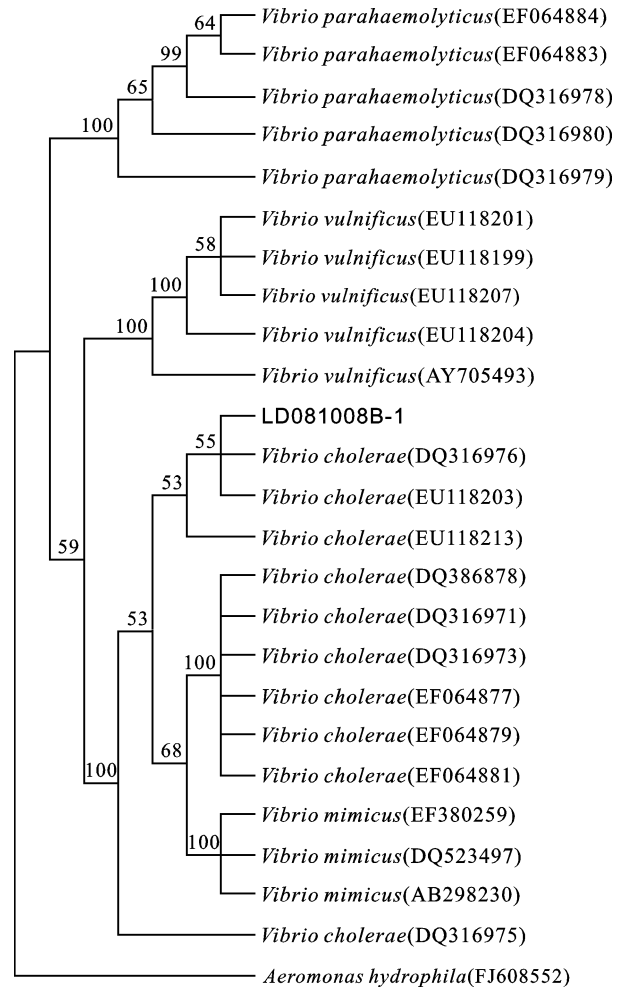


图 3 LD081008B-1 株 *gyrB* 基因序列系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on LD081008B-1 *gyrB* gene sequences

注：图中 EF064881—FJ608552 为菌株在 NCBI 的登录号，数字为自举值

可引起养殖泥鳅发生以体表出血为特征的疾病，并导致病鱼大量死亡。

本次对于分离菌的鉴定，在进行常规的形态特征、理化特性等生物学性状检验的基础上，用 PCR 方法同时进行了 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的分子鉴定，比较了 16S rRNA 和 *gyrB* 两种基因对霍乱弧菌的鉴别能力。通过 Blast 同源性检索表明 *gyrB* 基因与霍乱弧菌的相似性在 97%—98%，能够达到种的要求，而与其它弧菌的相似性均在 94%以下，未能达到种的要求；而分离菌的 16S rRNA 基因序列与霍乱弧菌和最小弧菌的相似性均在 98%—99%，均达到了种的要求，结果表明 *gyrB* 基因较 16S rRNA 基因在霍乱弧菌的鉴定中更具优越性。该项研究不仅丰富了霍乱弧菌的表型及分子特性，而且对于同类研究具有一定的

表 2 药敏纸片名称和规格及病原霍乱弧菌的药物敏感性
Tab.2 Name and type of discs and antimicrobial sensitivity of pathogenic *V. cholerae*

序号	名称	规格($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径 (mm)	药物敏感性	序号	名称	规格($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈直径 (mm)	药物敏感性
1	青霉素 G	10	25	HS	26	新生霉素	30	35	HS
2	氨苄青霉素	10	24	HS	27	万古霉素	30	17	S
3	羧苄青霉素	100	28	HS	28	头孢噻吩	30	35	HS
4	苯唑青霉素	1	10	S	29	强力霉素	30	32	HS
5	先锋	30	30	HS	30	四环素	30	35	HS
6	先锋必	30	38	HS	31	氯霉素	30	40	HS
7	复达欣	30	36	HS	32	红霉素	15	30	HS
8	麦迪霉素	30	25	HS	33	痢特灵	300	28	HS
9	林可霉素	2	13	S	34	头孢拉定	30	30	HS
10	呋喃妥因	300	30	HS	35	氧氟沙星	5	46	HS
11	氟罗沙星	5	44	HS	36	壮观霉素	100	26	HS
12	菌必治	30	42	HS	37	氟哌酸	10	44	HS
13	复方新诺明	1.25/23.75	46	HS	38	环丙沙星	5	48	HS
14	洛美沙星	10	40	HS	39	利福平	5	30	HS
15	氨曲南	30	30	HS	40	链霉素	10	24	HS
16	舒普深	75/75	36	HS	41	卡那霉素	30	27	HS
17	阿奇霉素	15	34	HS	42	阿米卡星	30	24	HS
18	克拉霉素	15	30	HS	43	头孢氨苄	30	26	HS
19	左氟沙星	5	48	HS	44	阿洛西林	75	35	HS
20	克林霉素	2	22	HS	45	罗红霉素	15	26	HS
21	依诺沙星	10	42	HS	46	恩诺沙星	10	32	HS
22	杆菌肽	0.04	0	R	47	甲氧胺嘧啶	5	35	HS
23	庆大霉素	120	28	HS	48	阿莫西林	10	20	HS
24	妥布霉素	10	27	HS	49	米诺环素	30	30	HS
25	新霉素	30	30	HS					

指导意义。此外,非 O1 群菌与 O1 菌群有 DNA 同源性,16S rRNA 和 *gyrB* 基因的分子鉴定达不到血清分型要求,非 O1 群菌基本生物学特性与 O1 群菌相同,主要的不同点是非 O1 群菌与 O1 群菌“O 抗原”的多价抗血清不凝集,本次没有对分离菌进行血清分型研究,分离菌的血清分型有待进一步检验。

本次以 49 种抗菌类药物对分离鉴定的霍乱弧菌进行了耐药性测定,结果表明分离菌对环丙沙星等 45 种药物均高度敏感(抑菌圈直径为 22—48mm),表明一些常用药物还未引起该菌产生耐药性,这在选择用药治疗该菌引起的泥鳅疾病具有十分重要的意义,生产上用药时应注意严禁使用违禁药物,同时注意药物的使用剂量和使用时间,尽可能地避免使该菌出现耐药变异。

参 考 文 献

王立平,张晓华,刘 镁等,1997. 中国对虾糠虾幼体病原菌

(非 O1 群霍乱弧菌)的研究. 中国水产科学, 4(1): 45—51
东秀珠,蔡妙英,2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 106—120
叶应妩,王毓三,1997. 全国临床检验操作规程(第二版). 南京: 东南大学出版社, 553—562
杨正时,房 海,2003. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1550—1610
杨鸷劫,陈 辉,金日奉等,2004. 泥鳅溃疡病的病原菌分离和组织病理学观察. 集美大学学报(自然科学版), 9(1): 22—25
杨鸷劫,俞菊华,陈 辉等,2006. 暗纹东方鲀非 O1 霍乱弧菌的鉴定及毒力基因检测. 水产学报, 30(4): 525—530
郑国兴,1986. 养殖对虾弧菌病致病菌——非 O1 群霍乱弧菌的生物学性状与致病性. 水产学报, 10(2): 195—203
房 海,陈翠珍,张晓君等,2006. 泥鳅气单胞菌感染的检验与分析. 中国人兽共患病学报, 22(11): 1065—1069
秦 蕾,徐 静,张晓君,2008. 泥鳅的凡隆气单胞菌感染. 中国人兽共患病学报, 24(2): 1100—1102
翟子玉,陈慧达,俞豪祥等,1993. 团头鲂、鲫鱼出血性败血病

- 的研究. 水产科技情报, 20(3): 105—108
- Austin B, Austin D A, 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 30: 111—112
- Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 190—191, 253—274
- Kiiyukia C, Nakajima A, Nakai T *et al*, 1992. *Vibrio cholera* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3078—3082
- Krieg N R, Holt J G, 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. London: Williams and Wilkins, Baltimore, 545—548
- Martin F Polz, Collen M Cavanaugh, 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol, 64(10): 3724—3730
- Muroga K, Takahashi S, Yamanoi H, 1979. Non-cholera *Vibrio* isolated from diseased ayu. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45: 829—834
- Reddacliff G L, Hornitsky M, Carson J *et al*, 1993. Mortalities of goldfish, *Carassius auratus* (L.), associated with *Vibrio cholera* non-O1. Journal of Fish Diseases, 16: 517—520
- Yamamoto S, Harayama S, 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl and Environ Microbiol, 61(3): 1104—1109

PHENOTYPIC AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF PATHOGENIC *VIBRIO CHOLERAE* ISOLATED FROM *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS*

BING Xu-Wen¹, YAN Bin-Lun², ZHANG Xiao-Jun², QIN Lei², BI Ke-Ran²

(1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi, 214081; 2. College of Ocean, Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, 222005)

Abstract A serious mortality of cultured loach *Misgurnus anguillicaudatus* occurred in some farms in Donghai County, Jiangsu Province in October 2008. Syndrome included bleeding in head, opercula, lower jaw, fins, and fin bases, swollen muscle, anus, liver, and spleen, and empty intestines. Tissues were sampled from liver, bleed, and ascitic fluid of diseased fish, from which the pathogen were isolated, and the biological characteristics were examined, including characteristics in morphology, physiology, and biochemistry, as well as the activity of extracellularase and hemolysin. The 16S rRNA and *gyrB* were amplified by PCR, with which sequences deposited in databases were compared, and molecular phylogenetic trees were constructed. The result indicates high homogeneity between the isolates and *Vibrio cholerae* from GenBank database, showing that *gyrB* gene analysis is a more useful tool. The sequenced 16S rRNA gene of strain LD081008B-1 (GenBank accession No.GQ205447) is 1446bp in length, the sequenced *gyrB* gene of strain LD081008B-1 (GenBank accession No.GQ205452) is 1207bp in length. The isolates were identified as *V. cholerae* (Pacini 1854) in terms of phenotypic and molecular characteristics. Detection of the activity of extracellularase and hemolysin shows that the isolates could produced proteinase, diastase, lecithinase, gelatinase, and DNase, and exhibited α -haemolysis on agar plates containing 7% defibrinated rabbit blood. Drug resistance of isolates to 49 antimicrobial agents was detected. The results show that isolates were sensitive or highly sensitive to all agents, except for bacitracin.

Key words *Misgurnus anguillicaudatus* L., *Vibrio cholerae*, Biological characteristics, 16S rRNA gene, *gyrB* gene