

太平洋双色鳗鲡(*Anguilla bicolor pacifica*)致病性类志贺邻单胞菌的鉴定和中药敏感性研究*

赖晓健^{1,2} 杨方园^{1,2} 李忠琴^{1,2}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心 厦门 361021)

摘要 从发病死亡的养殖太平洋双色鳗鲡(*Anguilla bicolor pacifica*)肝脏中分离到一株优势菌 AMSH1, 为研究其种属、毒力及中药敏感性, 结合 BIOLOG 微生物鉴定系统和 16S rDNA 序列分析对该菌株进行鉴定, 并通过人工回归感染试验确定其致病性。此外, 还研究了 10 味中药单用、10 种双联用和 4 种三联用对该菌株的体外抑菌作用。结果显示该菌株为类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)。经人工腹腔注射感染健康太平洋双色鳗鲡, 证实该菌具有致病性, 半致死量 LD₅₀ 为 3.2×10⁵CFU/g。药敏试验结果表明, 10 味中药均有较好的抑菌效果, 其中五倍子(*Galla chinensis*)、丁香(*Eugenia caryophyllata*)和生地榆(*Sanguisorba officinalis*)的效果最好, 7 种双联用复方和 1 种三联用复方均具有协同抑菌作用。本次引起太平洋双色鳗鲡发病的病原为类志贺邻单胞菌, 该菌对太平洋双色鳗鲡的致病性及其中药药敏的研究属首次报道。建议选用含五倍子的中药双联用复方或三联用复方进行防治, 皆绿色环保。

关键词 太平洋双色鳗鲡; 类志贺邻单胞菌; 病原菌; 药敏试验

中图分类号 S941 **doi:** 10.11693/hyhz20160400090

太平洋双色鳗鲡(*Anguilla bicolor pacifica*)隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鳗鲡目(Anguilliformes)、鳗鲡科(Anguillidae)、鳗鲡属(*Anguilla*), 主要分布于西太平洋的赤道地区, 其中从婆罗洲东海岸、新几内亚北部到菲律宾的吕宋岛分布最多, 在我国台湾地区也有发现(Han *et al*, 2001)。东南亚太平洋双色鳗鲡的苗种资源丰富, 鳗苗价格较日本鳗鲡(*A. japonica*)和美洲鳗鲡(*A. rostrata*)低, 而生长速度与日本鳗鲡和美洲鳗鲡接近, 具有较高的市场潜力。近年来我国各地陆续从菲律宾和印度尼西亚等地引进了鳗鲡苗种(主要是太平洋双色鳗鲡和花鳗鲡(*A. marmorata*))进行养殖, 取得了一定的效果。但太平洋双色鳗鲡的养殖技术还不成熟, 成活率不高, 且病害较多。目前, 国内外还未见关于太平洋双色鳗鲡细菌性病原的鉴

定和药物敏感性方面的报道。

本课题组前期对日本鳗鲡、欧洲鳗鲡(*A. anguilla*)和美洲鳗鲡的主要病原及防治药物进行了大量的基础研究(佟延南, 2009; 汪黎虹, 2010; 杨求华, 2012), 在此基础上针对鳗鲡养殖种类的变化, 逐步对新引进的花鳗鲡和太平洋双色鳗鲡的主要病原开展研究(杨方圆等, 2013)。

近年来, 由于中草药含具增强免疫功能的生物活性分子, 同时也有来源广泛、价格便宜和不易受生物排斥等不同于传统渔药和疫苗的优点, 其作为渔用药物已被广泛的研究 (Galina *et al*, 2009; Bulfon *et al*, 2015)。目前, 中草药的体外抑菌研究已在嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)和鳗弧

* 福建省自然科学基金项目, 2013J05052 号; 福建省科技厅区域发展项目, 2016N3002 号; 厦门市科技局项目, 3502Z20133015 号; 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金, RE201308 号; 福建省教育厅项目, JA15260 号。赖晓健, 博士, 助理研究员, E-mail: laixj@jmu.edu.cn

通讯作者: 李忠琴, 博士, 副教授, E-mail: zhqinli@jmu.edu.cn

收稿日期: 2016-04-26, 收修改稿日期: 2016-08-23

菌(*Vibrio anguillarum*)等常见水产病原菌中开展,研究表明五倍子(*Galla chinensis*)、石榴皮(*Runica Granatum*)和大黄(*Rheum palmatum*)等中药对常见的水产病原菌具有较好的体外抑杀效果(表 1)。

2012年5月,福清市某鳊鱼养殖厂养殖的太平洋

双色鳊鱼暴发疾病,病鳊漂浮于水面,死亡鳊鱼主要症状为肛门有黄色粘液流出,肠粘膜充血糜烂,肝脏肿胀。本文对该病病原进行了分离和鉴定,并研究了其毒力和中药敏感性,旨在为该病的防治提供参考依据。

表 1 中药对常见水产致病菌的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度(mg/mL)

Tab.1 Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Chinese herbs on common aquatic pathogenic bacteria (mg/mL)

| 致病菌 | 中药 | 最低抑菌浓度 MIC | 最低杀菌浓度 MBC | 参考文献 | |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|------------|-------------|------------|
| 嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>) | 五倍子 (<i>Galla chinensis</i>) | 0.125—0.25 | 0.25 | 李秋云等, 2014 | |
| | | 0.20 | — | 赵蓓蓓等, 2012 | |
| | | 7.813 | 7.813 | 罗新等, 2011 | |
| | 石榴皮(<i>Runica granatum</i>) | 7.81 | 15.63 | 苏振霞等, 2011 | |
| | | 0.75—1.5 | 1.5 | 李秋云等, 2014 | |
| | | 0.75 | 0.75 | 李秋云等, 2014 | |
| | 大黄(<i>Rheum palmatum</i>) | 31.25 | 31.25 | 李春涛等, 2012 | |
| | | 62.5 | 125 | 苏振霞等, 2011 | |
| | | 连翘(<i>Forsythia suspensa</i>) | 15.62 | 15.62—31.25 | 陈晓利等, 2014 |
| | | 诃子(<i>Terminalia chebula</i>) | 3.91 | 3.91 | 李春涛等, 2012 |
| 迟缓爱德华氏菌 (<i>Edwardsiella tarda</i>) | 诃子(<i>Terminalia chebula</i>) | 12.5 | 50 | 彭金菊等, 2009 | |
| | | 31.25 | 62.5 | 苏振霞等, 2011 | |
| | 檳榔(<i>Areca catechu</i>) | 62.5 | 125 | 李春涛等, 2012 | |
| | 五倍子(<i>Galla chinensis</i>) | 0.125—0.25 | 0.25 | 李秋云等, 2014 | |
| | 0.5 | 0.5 | 李忠琴等, 2011 | | |
| 维氏气单胞菌 (<i>A. veronii</i>) | 石榴皮(<i>Runica granatum</i>) | 1.5625 | 1.5625 | 陈言峰等, 2011 | |
| | | 0.78 | 25 | 陈言峰等, 2011 | |
| | 大黄 (<i>Rheum palmatum</i>) | 1.5 | 1.5—3 | 李秋云等, 2014 | |
| | 0.75 | 1.5 | 李秋云等, 2014 | | |
| | 连翘(<i>Forsythia suspensa</i>) | 3.75 | 7.5 | 张彬等, 2010 | |
| 鳊弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) | 五倍子(<i>Galla chinensis</i>) | 0.94 | 3.75 | 张彬等, 2010 | |
| | 五倍子(<i>Galla chinensis</i>) | 0.25 | 0.25 | | |
| 鳊弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) | 石榴皮(<i>Runica granatum</i>) | 0.375 | 0.75 | 李忠琴等, 2012 | |
| | 大黄(<i>Rheum palmatum</i>) | 1.5 | 3 | | |
| 鳊弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) | 五倍子(<i>Galla chinensis</i>) | 3.12 | 6.25 | 梁利国等, 2010 | |

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

健康太平洋双色鳊鱼购于某鳊鱼养殖厂,平均体重为(10±2)g,暂养于集美大学水产试验场,水温26—28℃,溶氧>5mg/L。

M-H 培养基(上海博微生物科技有限公司); BIOLOG 专用培养基(美国 BIOLOG 公司); GYZ-15eV 发酵型革兰氏阴性杆菌生化编码鉴定管(杭州滨和微生物试剂有限公司); 细菌基因组 DNA 快速提取试剂

盒(上海捷瑞生物工程有限公司)。

大黄、连翘(*Forsythia suspensa*)、诃子(*Terminalia chebula*), 产地福建; 石榴皮、肉桂(*Cinnamomum cassia*), 产地甘肃; 生地榆(*Sanguisorba officinalis*)、五倍子, 产地湖北; 丁香(*Eugenia caryophyllata*)、首乌藤(*Polygonum multiflorum*), 产地广西; 檳榔(*Areca catechu*), 产地海南。

1.2 病原菌的分离纯化和生理生化鉴定

取具有典型发病症状的病鳊鳃、体表粘液在显微镜下进行寄生虫和真菌排查,用 75%酒精棉球擦拭

体表消毒,于无菌条件下取肝脏组织,划线接种于 M-H 培养基,28 ℃ 培养 24h 后,出现大量菌落,挑取优势菌落,经 2 次纯化培养后,得到菌株 AMSH1。将分离所得菌株进行革兰氏染色、芽孢染色,根据结果,按照产品使用说明书运用 GYZ-15eV 生化检测试剂盒和 BIOLOG 自动微生物鉴定系统对该菌株进行鉴定。

1.3 16S rDNA 基因序列测定与系统发育分析

按试剂盒的说明书提取细菌基因组 DNA,以此为模板,用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3'和 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACG ACTT-3'扩增细菌的 16S rDNA 基因片段。PCR 反应条件为: 94 ℃ 5min; 94 ℃ 1min, 53 ℃ 1min, 72 ℃ 2min, 33 个循环; 72 ℃ 10min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后,送上海生工生物工程技术公司测序。

将菌株 AMSH1 的 16S rDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行序列同源性分析,从中选取与所获序列同源性较高的同种细菌的 16S rDNA 基因序列,并从 GenBank 数据库中获得气单胞菌属(*Aeromonas* sp.),爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.)和弧菌属(*Vibrio* sp.)细菌的 16S rDNA 序列,采用 ClustalX 1.83 软件进行多序列匹配排列,利用 MEGA 5 采用邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树,通过自举分析进行置信度检测,自举数集 1000 次。

1.4 人工感染试验

将分离纯化的 AMSH1 菌株接种于 M-H 液体培养基中 37 ℃ 振荡培养 24h 后,4000g 离心 10min 沉淀菌体,无菌生理盐水清洗 3 次,McFarland 比浊法调节

菌悬液浓度为 1×10^9 CFU/mL,用无菌生理盐水 10 倍梯度稀释成浓度为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 CFU/mL 的菌悬液。健康太平洋双色鳗鲡随机分成 6 组,分 5 个菌悬液浓度组和 1 个对照组,每组设 2 个试验箱,每箱放鱼 5 尾,每尾鱼腹腔注射 0.1mL,对照组注射生理盐水。试验周期为 14d,期间持续充气、定时投喂和排污换水,水温 26—28 ℃。观察记录各组鱼的症状和死亡情况。对死亡鱼进行解剖和病原菌再分离、鉴定。根据 Reed-Muench 法测定半致死量(Wardlaw, 1985)。

1.5 中药药敏试验

将中药进行冷冻超微粉碎,加工方法参见李忠琴等(2012)。将中药超微粉以 1g/mL 浓度进行两倍梯度稀释,加入 M-H 培养基中,配制不同浓度的药敏培养基,每个药物浓度梯度设置 2 组平行,空白对照组 M-H 培养基不加中药。将菌悬液(浓度为 1×10^7 CFU/mL)接种于药敏培养基平板上,28 ℃ 恒温培养,观察菌落的生长情况。以 24h 无菌落形成的最低浓度为中药对该菌株的最低抑菌浓度(MIC),以 48h 无菌落形成的最低浓度为中药对该菌株的最低杀菌浓度(MBC)。双联用部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数计算: $FIC = MIC_{甲药联合} / MIC_{甲药单用} + MIC_{乙药联合} / MIC_{乙药单用}$; 三联用 $FIC = MIC_{甲药联合} / MIC_{甲药单用} + MIC_{乙药联合} / MIC_{乙药单用} + MIC_{丙药联合} / MIC_{丙药单用}$ 。双联用和三联用 FIC 判读标准见表 2。

表 2 双联用和三联用复方部分抑菌浓度(FIC)的判读标准

Tab.2 Benchmark for FIC (fractional inhibitory concentration) of double-compound and triple-compound prescriptions

| 部分抑菌浓度 FIC | 双联用 | | | | | 三联用 | | | | |
|---------------|------|-------|----|-----|----|------|-------|----|-----|----|
| | 0.5 | 0.5—1 | 1 | 1—2 | >2 | 0.5 | 0.5—1 | 1 | 1—3 | >3 |
| 结果 | 显著协同 | 协同 | 相加 | 无关 | 拮抗 | 显著协同 | 协同 | 相加 | 无关 | 拮抗 |

2 结果

2.1 菌株生理生化鉴定

从病鳗肝脏中分离得到的致病菌菌株 AMSH1,利用 GYZ-15eV 系统鉴定,结果显示该菌尿素酶、磷酸酶、二磷酸酶、柠檬酸盐、产 H₂S 试验和 V-P 试验均为阴性,鉴定结果为类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*),可信度为 10.66%。利用 BIOLOG 自动微生物系统进行鉴定,结果菌株 AMSH1 为类志贺邻单胞菌,鉴定结果相似性为 100%。该菌株能利用葡

萄糖、麦芽糖、果糖、海藻糖、肌醇、天冬氨酸、L-谷氨酸和 L-丝氨酸,不能分解乳糖、蔗糖、甘露糖、岩藻糖、D-丝氨酸、L-组氨酸、L-丙氨酸和 L-精氨酸。从人工感染死亡的太平洋双色鳗鲡再分离到的细菌的鉴定结果与菌株 AMSH1 的鉴定结果一致。

2.2 16S rRNA 基因序列分析和系统进化树的构建

用通用引物扩增菌株 AMSH1 的 16S rDNA,测序获得长度为 1455bp 的片段。经过 GenBank 进行 Blast 同源性分析,结果表明,AMSH1 的 16S rDNA 与已登陆的类志贺邻单胞菌 16S rDNA 序列的同源性均

达到 99%。构建的系统进化树显示其与类志贺邻单胞菌聚为一支，且置信度高达 100%。菌株 AMSH1 与肠杆菌科的迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*, KC763831.1) 的亲缘关系比弧菌科的弧菌属 (*Vibrio* sp.) 和气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.) 的亲缘关系近(图 1)。

2.3 人工感染

通过腹腔注射健康的太平洋双色鳗鲡，菌株 AMSH1 在 1.0×10^6 CFU/mL 及以下浓度时，没有出现死

亡。 1.0×10^8 CFU/mL 和 1.0×10^7 CFU/mL 浓度组在 48—120h 出现死亡，累计死亡率分别为 80% 和 30%。注射最高浓度组 1.0×10^9 CFU/mL 的太平洋双色鳗鲡在 24h 后开始出现死亡，并在 96h 内全部死亡。对照组鱼未死亡(表 3)。依据人工感染试验结果，计算出该菌对太平洋双色鳗鲡的半致死量 $LD_{50} = 3.52 \times 10^5$ CFU/g。人工感染致死鳗鲡的症状为肛门有黄色粘液流出，肝脏肿胀，肠粘膜充血，与养殖厂发病鳗鲡的症状相同(图 2)。

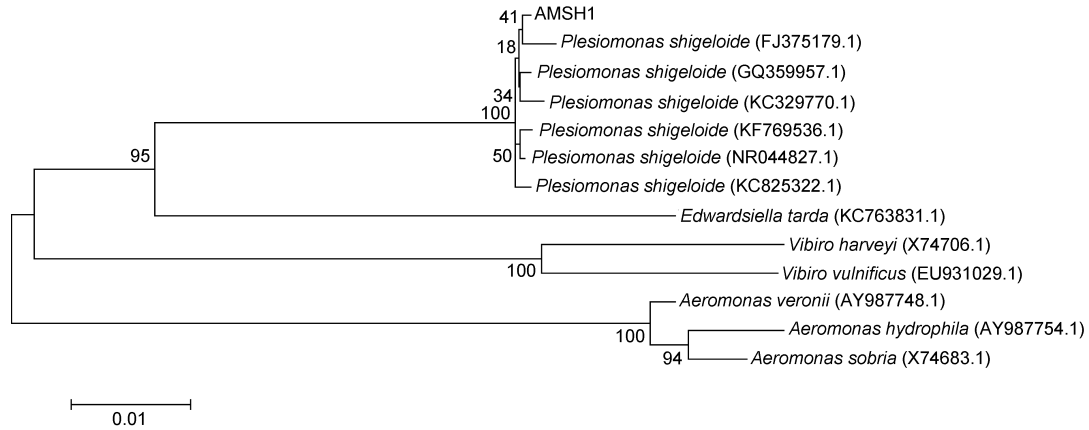


图 1 菌株 AMSH1 16S rDNA 基因序列的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene partial sequence of Strain AMSH1

表 3 菌株 AMSH1 人工感染太平洋双色鳗鲡试验

Tab.3 Results of artificial infection of Strain AMSH1 to healthy *A. bicolor pacifica*

| 菌液浓度 (CFU/mL) | 攻毒尾数(n) | 不同感染时间死亡数(n) | | | | | | | 累计死亡(n) | 死亡率(%) |
|-------------------|---------|--------------|-----|-----|-----|------|------|------|---------|--------|
| | | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h | 144h | 168h | | |
| 1.0×10^9 | 10 | 0 | 2 | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 1.0×10^8 | 10 | 0 | 0 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 8 | 80 |
| 1.0×10^7 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 30 |
| 1.0×10^6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1.0×10^5 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

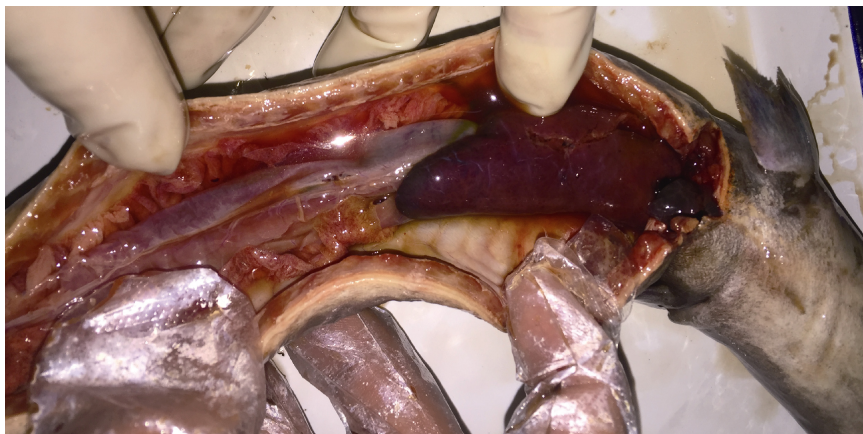


图 2 病鳗肝脏肿胀，肠粘膜充血糜烂

Fig.2 Congestive and anabrotic intestinal mucosa, oncotic liver of diseased eel

2.4 中药敏感性

试验结果表明, 10 味中药对菌株 AMSH1 均有较好的抑制效果, MIC 和 MBC 范围为 2—24mg/mL。其中五倍子、丁香和生地榆的抑菌效果最好, MIC 范围为 2—4mg/mL(表 4)。在 10 味中药中选取 5 味效果较好的单方组合成 10 种双联用复方进行试验, 发现其

中有 7 种双联用复方对菌株 AMSH1 具有协同抑菌作用, 含有五倍子的 4 种双联用复方均有协同抑菌作用(表 5)。4 种三联用复方仅五倍子复方 A 具有协同抑菌作用, 另外 3 种均为相加抑菌作用(表 6)。中药敏感性试验表明五倍子的抑菌效果最显著, 含有五倍子的 4 种双联用复方和 1 种三联用复方均有协同抑菌效果。

表 4 10 味中药对菌株 AMSH1 的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度(mg/mL)

Tab.4 The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of 10 Chinese herbs on AMSH1 (mg/mL)

| 中药 | 五倍子 (<i>Galla chinensis</i>) | 石榴皮 (<i>Punica granatum</i>) | 首乌藤 (<i>Polygonum multiflorum</i>) | 大黄 (<i>Rheum palmatum</i>) | 肉桂 (<i>Cinnamomum cassia</i>) |
|------------|--|-------------------------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|
| 最低抑菌浓度 MIC | 2 | 24 | 16 | 12 | 8 |
| 最低杀菌浓度 MBC | 2 | 24 | 16 | 24 | 8 |
| 中药 | 丁香 (<i>Eugenia caryophyllata</i>) | 连翘 (<i>Forsythia suspensa</i>) | 生地榆 (<i>Sanguisorba officinalis</i>) | 柯子 (<i>Terminalia chebula</i>) | 槟榔 (<i>Areca catechu</i>) |
| 最低抑菌浓度 MIC | 4 | 16 | 4 | 16 | 8 |
| 最低杀菌浓度 MBC | 4 | 16 | 8 | 16 | 8 |

表 5 10 种中药双联用复方对菌株 AMSH1 的抑菌效果(mg/mL)

Tab.5 The inhibitory effect of 10 double-compound prescriptions on AMSH1 (mg/mL)

| 双联用复方 | 最低抑菌浓度 MIC | 部分抑菌浓度 FIC | 结果 |
|--|------------|------------|------|
| 五倍子复方 1(Compound 1 with <i>Galla chinensis</i>) | 0.25+4 | 0.25 | 显著协同 |
| 五倍子复方 2(Compound 2 with <i>Galla chinensis</i>) | 0.25+4 | 0.375 | 协同 |
| 五倍子复方 3(Compound 3 with <i>Galla chinensis</i>) | 0.5+2 | 0.75 | 协同 |
| 五倍子复方 4(Compound 4 with <i>Galla chinensis</i>) | 1+6 | 0.75 | 协同 |
| 石榴皮复方 1(Compound 1 with <i>Punica granatum</i>) | 12+0.5 | 0.625 | 协同 |
| 石榴皮复方 2(Compound 2 with <i>Punica granatum</i>) | 6+8 | 0.75 | 协同 |
| 生地榆复方 1(Compound 1 with <i>Sanguisorba officinalis</i>) | 1+2 | 0.75 | 协同 |
| 丁香复方 1(Compound 1 with <i>Eugenia caryophyllata</i>) | 2+8 | 1 | 相加 |
| 生地榆复方 2(Compound 2 with <i>Sanguisorba officinalis</i>) | 4+12 | 1.75 | 无关 |
| 石榴皮复方 3(Compound 3 with <i>Punica granatum</i>) | 24+2 | 2 | 无关 |

表 6 4 种中药三联用复方对菌株 AMSH1 的抑菌效果(mg/mL)

Tab.6 The inhibitory effect of 4 triple-compound prescriptions on AMSH1 (mg/mL)

| 三联用复方 | 五倍子复方 A | 五倍子复方 B | 五倍子复方 C | 石榴皮复方 A |
|------------|----------|----------|---------|---------|
| 最低抑菌浓度 MIC | 0.25+6+1 | 0.5+12+1 | 0.5+2+2 | 6+2+2 |
| 部分抑菌浓度 FIC | 0.625 | 1 | 1 | 1 |
| 结果 | 协同 | 相加 | 相加 | 相加 |

3 讨论

本试验中, 从太平洋双色鳗鲡病鱼肝脏中分离得到的病原菌株经回归感染证实具有很强的致病性, 半致死量 LD₅₀ 为 3.2×10⁵CFU/g。运用 BIOLOG 自动微生物系统鉴定结果显示该菌株为类志贺邻单胞菌, 且相似性为 100%。鉴定结果发现该菌株能利用葡萄

糖, 不能分解蔗糖和甘露糖, 此特征与从鲟鱼(*Huso huso* ♀ × *Acipenser ruthenus* ♂) (王小亮等, 2013)和尼罗罗非鱼(*Tilapia*) (刘志刚等, 2015)中分离得到的类志贺邻单胞菌菌株一致。通过测序比对分析该菌株的 16S rDNA 基因序列与 6 株类志贺邻单胞菌的相似性高达 99%, 同时构建的进化树也表明与这 6 株类志贺邻单胞菌聚合为一支, 因此可判定该菌株为类志

贺邻单胞菌。

类志贺邻单胞菌是一种革兰氏阴性短杆菌，能运动，需氧或兼性厌氧，曾归属于弧菌科，后研究发现其在分子水平跟邻单胞菌和变形杆菌属更为接近，归入肠杆菌科，邻单胞菌属(Ruimy *et al*, 1994)。类志贺邻单胞菌广泛存在于自然界，可引起人的急性腹泻和食物中毒等疾病。该菌作为病原菌可单独或混合感染水生动物，已在日本鳗鲡等养殖鱼类中发现(Cruz *et al*, 1986; 陈林等, 2009; 陆文浩等, 2009; Joh *et al*, 2012; 王小亮等, 2013; 刘志刚等, 2015)，但目前还没有感染并导致养殖太平洋双色鳗鲡死亡的报道。

本实验室从各地鳗鱼养殖厂取样检测的结果表明，类志贺邻单胞菌在 0—100g/ind 的小规格太平洋双色鳗鲡中的检测较高，100g/ind 规格以上的太平洋双色鳗鲡中未检测到该菌。同时类志贺邻单胞菌的发病具有明显的季节性，夏季水温较高的时候发病率高于水温较低的春季和秋季。另外，在与太平洋双色鳗鲡同池养殖的花鳗鲡中未检测到类志贺邻单胞菌。Joh 等(2012)对日本鳗鲡的病原调查发现在日本鳗鲡中类志贺邻单胞菌的检出率为 2.2%，低于太平洋双色鳗鲡中的检出率。太平洋双色鳗鲡作为新的鳗鲡养殖种类，主要分布于热带，对其细菌性病原的研究很少。同时，对类志贺邻单胞菌感染鱼类的报道集中在温水性鱼类(Cruz *et al*, 1986; 陈林等, 2009; 陆文浩等, 2009; Joh *et al*, 2012; 王小亮等, 2013)。因此，研究从太平洋双色鳗鲡分离的类志贺邻单胞菌菌株的毒性及其对药物的敏感性显得更有意义。

中药敏感性试验表明，10 味中药对类志贺邻单胞菌均有抑菌和杀菌效果，MIC 和 MBC 范围为 2—24mg/mL。其中五倍子的效果最好，其次是丁香和生地榆。五倍子对类志贺邻单胞菌的 MIC 为 2mg/mL，与弧菌属的致病菌较为接近(梁利国等, 2010)，但高于嗜水气单胞菌和迟缓爱德华氏菌(李忠琴等, 2011)。五倍子中鞣质可能通过与类志贺邻单胞菌体内蛋白质的结合，凝固微生物体内原生质(Sotohy *et al*, 1995)，进而达到抑杀作用。鞣质在酸性条件下水解可得到没食子酸。五倍子中所含的没食子酸也具有较好的抑菌活性(郑曙明等, 2010)。丁香中的主要抑菌成分为丁香酚(南京中医药大学, 2005)。地榆的主要药用化学成分为皂苷、鞣质和黄酮类(夏红旻等, 2009)，其中皂苷有止血和造血作用(Sun *et al*, 2012; 邹文俊等, 2012)。

10 种中药双联用复方的体外抑菌效果研究表明，

有协同作用的复方有 7 种。进一步研究 4 种中药三联用对类志贺邻单胞菌的体外抑菌效果，其中 1 种三联用复方有协同的抑菌作用，另外 3 种三联用复方有相加的抑菌作用。表明中药的合理联用在一定程度上可以提高药物之间的协同作用，降低单味中药的使用量，增加药效，比如五倍子复方 A 中三味中药的剂量比单用时分别降低了 87.5%，75%和 75%。双联用五倍子复方 1 有显著协同作用。五倍子复方 1 中两味中药主要抗菌成分不同，分别为鞣质和皂苷，它们的抗菌机理也不相同，将这两味中药进行联用就可以多位点、多途径攻击致病细菌的细胞，提高药物的杀伤力，同时加快修复受损的组织和器官(李忠琴等, 2012)，这样不仅可以提高每味中药的抗菌活性，而且在较低浓度下就能够起到抑制或杀灭细菌的作用。而三联用五倍子复方 A 相比双联用五倍子复方 1 添加了石榴皮，石榴皮中的主要成分为鞣质，安石榴苷(Punicalagin)是石榴皮鞣质的主要成分(朱静, 2009)。鞣质成分的增加，起到了协同抑菌作用。复方不但能够有效降低单味中药的使用剂量，降低经济成本，而且可以达到更好的抑菌效果。中药复方相对西药具有药残小、天然、环保和不易产生耐药性等众多优点，已成为水产养殖动物病害防治研究中的热点。同时中药的推广使用是符合目前健康养殖新形势和无公害水产品开发的要求的。

4 结论

本研究从发病的鳗鲡养殖新种类太平洋双色鳗鲡中分离得到一株优势菌 AMSH1。经 BIOLOG 微生物鉴定系统和 16S rDNA 序列分析鉴定该菌株为类志贺邻单胞菌，通过人工回归感染试验表明该菌株具有致病性，半致死量 LD₅₀ 为 3.2×10⁵CFU/g。中药敏感性研究表明含有五倍子成分的 4 种中药双联用复方和 1 种三联用复方对类志贺邻单胞菌有较好的协同抑制作用。本研究结果可为太平洋双色鳗鲡类志贺邻单胞菌病的防治提供参考。

参 考 文 献

- 王小亮, 徐立蒲, 曹 欢等, 2013. 鲟致病性类志贺邻单胞菌的鉴定及药物敏感性. 微生物学报, 53(7): 723—729
- 朱 静, 2009. 石榴皮中生物活性成分的提取纯化. 北京: 北京化工大学硕士学位论文
- 刘志刚, 王小丽, 卢迈新等, 2015. 尼罗罗非鱼致病性类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)的分离鉴定及其病理学观察. 微生物学报, 55(1): 96—106
- 苏振霞, 肖 辉, 陈列欢等, 2011. 中药单味药及复方对嗜水

- 气单胞菌的体外抑菌作用. 中国兽医杂志, 47(11): 52—54
- 李忠琴, 关瑞章, 汪黎虹等, 2012. 六种中药及其复方对鳗鲡致病性气单胞菌的体外抑制作用. 水生生物学报, 36(1): 85—92
- 李忠琴, 关瑞章, 韩金钢等, 2011. 五倍子对鳗鲡 4 株常见病原菌的体外抗菌后效应. 中国兽药杂志, 45(5): 1—4
- 李春涛, 陈 霞, 张其中等, 2012. 100 种中草药体外抑杀嗜水气单胞菌的药效研究. 淡水渔业, 42(2): 27—34
- 李秋云, 李忠琴, 张 坤等, 2014. 5 种中药和 28 种抗生素对养殖鳗鲡致病菌的抑制作用. 中兽医医药杂志, 33(3): 9—12
- 杨方园, 关瑞章, 李忠琴等, 2013. 花鳗鲡病原菌弗氏柠檬酸杆菌的鉴定. 集美大学学报(自然科学版), 18(2): 81—87
- 杨求华, 2012. 养殖鳗鲡致病性气单胞菌的分离与鉴定. 厦门: 集美大学硕士学位论文
- 佟延南, 2009. 养殖鳗鲡病原菌快速诊断试剂盒研制及其应用. 厦门: 集美大学硕士学位论文
- 邹文俊, 刘 芳, 吴建明等, 2012. 地榆总皂苷促进造血细胞增殖效应研究. 中草药, 43(5): 929—933
- 汪黎虹, 2010. 养殖鳗鲡主要病原菌中西药复方的筛选. 厦门: 集美大学硕士学位论文
- 张 彬, 黄 婷, 陈 明等, 2010. 致病性鳗爱德华氏菌药敏及中草药体外抑菌作用研究. 水产科技情报, 37(6): 282—286
- 张海宾, 杨桂芳, 2006. 12 种中草药对嗜水气单胞菌杀伤能力的研究. 水产科学, 25(1): 16—18
- 陆文浩, 杨家新, 陈 辉, 2009. 异育银鲫类志贺邻单胞菌的鉴定. 淡水渔业, 39(2): 48—53
- 陈 林, 谭爱萍, 邹为民, 2009. 斑点叉尾鲷致病菌株的鉴定及特性. 大连水产学院学报, 24(3): 200—205
- 陈言峰, 邹记兴, 2011. 20 种中草药对迟缓爱德华氏菌的体外抑菌试验. 水生态学杂志, 32(5): 110—113
- 陈晓利, 彭 彬, 占爱思等, 2014. 黄鳝源嗜水气单胞菌的体外中药药敏试验. 淡水渔业, 44(2): 43—46
- 罗 新, 张其中, 2011. 42 种中草药对嗜水气单胞菌的体外抑菌试验. 淡水渔业, 41(3): 61—65
- 郑曙明, 黄建军, 吴 青等, 2010. 复方五倍子有效成分的分离鉴定及抑菌活性研究. 水生生物学报, 34(1): 57—64
- 赵蓓蓓, 赵 晶, 王志铮等, 2012. 10 种常见中草药水提物对嗜水气单胞菌 ZHYZ-1 的体外抑菌效果研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 31(4): 316—320
- 南京中医药大学, 2005. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 15
- 夏红旻, 孙立立, 孙敬勇等, 2009. 地榆化学成分及药理活性研究进展. 食品与药品, 11(4): 67—69
- 梁利国, 阎斌伦, 张晓君等, 2010. 常用中草药对 4 种病原弧菌体外抗菌效果的研究. 渔业科学进展, 31(2): 114—119
- 彭金菊, 马 驿, 罗伟英等, 2009. 32 种中药及其复方对嗜水气单胞菌体外抑菌效果. 中兽医医药杂志, 28(6): 5—7
- Bulfon C, Volpatti D, Galeotti M, 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. Aquaculture Research, 46(3): 513—551
- Cruz J M, Saraiva A, Eiras J C *et al*, 1986. An outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 6(1): 20—22
- Galina J, Yin G, Ardo L *et al*, 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. Fish Physiology and Biochemistry, 35(4): 669—676
- Han Y S, Chang C W, He J T *et al*, 2001. Validation of the occurrence of short-finned eel *Anguilla bicolor pacifica* in natural waters of Taiwan. Acta Zoologica Taiwanica, 12(1): 9—19
- Joh S J, Ahn E H, Lee H J *et al*, 2012. Bacterial pathogens and flora isolated from farm-cultured eels (*Anguilla japonica*) and their environmental waters in Korean eel farms. Veterinary Microbiology, 163(1—2): 190—195
- Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P *et al*, 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 44(3): 416—426
- Sotohy S A, Müller W, Ismail A A, 1995. “*In vitro*” effect of Egyptian tannin-containing plants and their extracts on the survival of pathogenic bacteria. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 102(9): 344—348
- Sun W, Zhang Z L, Liu X *et al*, 2012. Terpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their hemostatic activities. Molecules, 17(7): 7629—7636
- Wardlaw A C, 1985. Practical Statistics for Experimental Biologists. Chichester: John Wiley and Sons

PATHOGENIC *Plesiomonas shigelloides* ISOLATED FROM *Anguilla bicolor pacifica*: IDENTIFICATION AND SENSITIVITY TO CHINESE HERBS

LAI Xiao-Jian^{1,2}, YANG Fang-Yuan^{1,2}, LI Zhong-Qin^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Modern Industrial Technology for Eel, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

Abstract In May, 2012, a massive mortality of *Anguilla bicolor pacifica* broke out in an aquaculture farm in Fuqing, Fujian Province. Symptoms included congestive and anabrotic intestinal mucosa, and oncotoc liver. We isolated pathogenic bacterium, named AMSH1, from the liver of diseased *A. bicolor pacifica*, on which the classification, virulence, and sensitivity of the bacterium to Chinese herbs were studied. The strain was identified by BIOLOG identification system and molecular phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequences, and the pathogenicity was investigated in a recursive infection experiment by intraperitoneal injection with bacteria suspension. Ten Chinese herbs were screened in attempt to test their inhibitory effects, from which ten double- and four triple-compound prescriptions were formulated and tested. Results show that the causative strain was *Plesiomonas shigelloides*, and the LD₅₀ was 3.2×10⁵ CFU/g. Study on antimicrobial susceptibility showed that the ten Chinese herbs had good antibacterial effect on the bacterium. *Galla chinensis*, *Eugenia caryophyllata*, and *Sanguisorba officinalis* showed better antibacterial activity than others did. Seven double- and one triple-compound prescriptions showed synergistic inhibitory effect; prescriptions with *Galla chinensis* showed good control on pathogen *P. shigelloides*, and shall be recommended for protection and prevention, green and safe to the environment.

Key words *Anguilla bicolor pacifica*; *Plesiomonas shigelloides*; pathogenic bacterium; antimicrobial susceptibility test